

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Histologische Veränderungen nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis
communis der Ratte und Wirkung einer pharmakologischen Inhibition der
Proteinkinasen MEK und p38 auf die Neointimabildung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Robert Real
aus Bremen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski
 2. Prof. Dr. med. A. R. Pries
 3. Prof. Dr. med. M. Böhm

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 5 |
| 1.1 | Zur koronaren Herzkrankheit, Koronarangiographie und perkutanen transluminalen Koronarangioplastie in Deutschland | 5 |
| 1.2 | Die Morphologie der Arteria carotis communis der Ratte | 6 |
| 1.3 | Die Morphologie der menschlichen Koronararterie | 7 |
| 1.4 | Die Neointimaformation im Tiermodell | 7 |
| 1.5 | Die Atherosklerose und Neointimabildung in Koronararterien des Menschen | 8 |
| 1.6 | Pathogenese der Neointimaformation nach mechanischer Gefäßmanipulation | 10 |
| 1.7 | Intrazelluläre Signaltransduktionswege als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli | 11 |
| 1.8 | Die ERK1/2-Kinase-Kaskade | 12 |
| 1.9 | Die p38-Kinase-Kaskade | 13 |
| 1.10 | PD098059 | 15 |
| 1.11 | SB203580 | 15 |
| 1.12 | PD09059 und SB203580 in in vitro- und in vivo-Studien | 16 |
| 2. | FRAGESTELLUNGEN | 17 |
| 3. | METHODEN UND MATERIALIEN | 18 |
| 3.1 | MATERIALIEN | 18 |
| 3.1.1 | Materialien zur Operation | 18 |
| 3.1.1.1 | Instrumente und Geräte | 18 |
| 3.1.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 18 |
| 3.1.1.3 | Reagenzien und Chemikalien | 18 |
| 3.1.2 | Materialien für die Histologie und Immunhistologie | 19 |
| 3.1.2.1 | Instrumente und Geräte | 19 |
| 3.1.2.2 | Antikörper | 19 |
| 3.1.2.3 | Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 3.1.3 | Materialien für die Zellkultur | 20 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.3.1 | Instrumente und Geräte | 20 |
| 3.1.3.2 | Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 3.1.4 | Materialien für den Western blot | 21 |
| 3.1.4.1 | Instrumente und Geräte | 21 |
| 3.1.4.2 | Reagentien, Lösungen und Chemikalien | 21 |
| 3.1.4.3 | Verbrauchsmaterialien | 22 |
| 3.2 | METHODEN | 22 |
| 3.2.1 | Zellkulturexperimente | 22 |
| 3.2.2 | Aufarbeitung von Zellen und Geweben zur weiteren Verarbeitung | 23 |
| 3.2.3 | Die quantitative Proteinbestimmung | 24 |
| 3.2.4 | Western blot | 24 |
| 3.2.5 | Tierhaltung, Tierantrag | 26 |
| 3.2.6 | Operationsmethode der Ballonkatheterverletzung | 26 |
| 3.2.7 | Herstellung und Lagerung des Pluronic Gel | 30 |
| 3.2.8 | Herstellung der Stammlösungen von SB203580 und PD098059 und der wirkstoffhaltigen Gele | 30 |
| 3.2.9 | Entnahme und Konservierung der Arterien zur weiteren Verarbeitung | 30 |
| 3.2.10 | Histologie und Färbungen | 31 |
| 3.2.11 | Histomorphometrie | 32 |
| 3.2.12 | Immunhistologie | 32 |
| 3.2.13 | Statistische Auswertung | 33 |
| 4. | ERGEBNISSE | 34 |
| 4.1 | Die frühe Aktivierung von p38 und p42/44 in vitro | 34 |
| 4.2 | Lichtmikroskopische Untersuchungen der Neointimabildung zu unter- schiedlichen Zeitpunkten nach Ballonkatheterverletzung | 36 |
| 4.3 | Histomorphometrische Analysen am Gefäßpräparat | 43 |
| 4.3.1 | Veränderungen der Tunica media nach Ballonkatheterverletzung | 43 |
| 4.3.2 | Betrachtungen der Neointima nach Ballonkatheterverletzung | 45 |
| 4.3.3 | Veränderungen in Bezug auf das Lumen nach Ballonkatheterverletzung | 47 |
| 4.4 | Western blots nach Ballonkatheterverletzung | 48 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| | | 4 |
| 5. | DISKUSSION | 51 |
| 5.1 | Anmerkungen zur Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis der Ratte | 51 |
| 5.2 | Ist der beobachtete Effekt auf die Neointimareduktion hämodynamisch relevant? | 53 |
| 5.3 | Dosis und Applikationsform von SB203580 und PD098059 im Vergleich mit verwandten Studien | 54 |
| 5.4 | Überlegungen zum paradoxen Ergebnis der geringeren Neointimahemmung bei der Kombination der Substanzen PD098059 und SB203580 | 56 |
| 5.5 | Kann das angewandte Tiermodell auf den Menschen übertragen werden? | 57 |
| 5.6 | Bisheriger klinischer Einsatz anderer MAP-Kinase-Inhibitoren | 60 |
| 5.7 | Mögliche klinische Bedeutung einer pharmakologischen MAP-Kinase-Inhibition bei der Prävention der In-stent-Restenose | 62 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 64 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS | 65 |
| 8. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 75 |
| 9. | VERÖFFENTLICHUNGEN | 80 |
| 9.1 | Publikationen | 80 |
| 9.2 | Poster, Präsentationen | 80 |
| 9.3 | Abstracts | 81 |
| 10. | LEBENS LAUF | 82 |
| 11. | DANKSAGUNG | 83 |
| 12. | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | 84 |

1. EINLEITUNG

1.1 Zur koronaren Herzkrankheit, Koronarangiographie und perkutanen transluminalen Koronarangioplastie in Deutschland

Neben dem apoplektischen Insult ist der plötzliche Myokardinfarkt in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste unmittelbare Todesursache. Jeder neunte Bundesbürger verstirbt daran. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 330 pro 100.000 / Jahr (Herold, „Innere Medizin“, 2002). Insgesamt sterben in Deutschland mehr Menschen am akuten Herzinfarkt und dessen Folgen, als an Tumoren der Lunge, des Magens, des Dickdarmes und der Brust zusammengenommen (Lippert H et al., 1990). Bei einer Koronarinsuffizienz, ausgelöst z. B. durch einen ischämischen Myokardinfarkt, kann eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) lebensrettend sein. Auch die Ballondilatation eines peripheren Gefäßes durch perkutane transluminale Angioplastie (PTA) vermag, eine hämodynamische Verbesserung hervorzurufen. Sowohl bei der PTCA, als auch bei der PTA kann wahlweise ein Stenting erfolgen, um ein stenosiertes Gefäß dilatiert zu halten und/oder eine Restenosierung zu vermeiden. In Deutschland wurden im Jahr 1999 561.623 Linksherzkatheteruntersuchungen und 166.132 Interventionen im Sinne einer PTCA vorgenommen (Silber S, 2001). Während eine Hauptstammstenose oder die 2 - oder 3 - Gefäßkrankheit eine Operationsindikation für einen aortokoronaren bzw. Mammaria interna - Bypass darstellt, werden mehr und mehr Koronarstenosen durch die PTCA und ggf. Stenting behandelt. Hierbei gilt, dass die interventionelle Akutkoronarangiographie noch vor der Lysetherapie den heutigen Standard der Therapie des akuten Myokardinfarktes darstellt.

Atherosklerotische Gefäßerkrankungen sind mit einer vermehrten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen innerhalb der Intima dieser Gefäße verbunden (Schwartz SM et al., 1986). Tritt ein ischämischer Myokardinfarkt durch Koronargefäßthrombose ein, sind bei 30 % der Patienten nach zunächst erfolgreicher Revaskularisation mittels PTCA ein *elastic recoil*, weiterhin die Proliferation glatter Muskelzellen, die sogenannte Neointima, ebenso wie ein Remodeling und auch die Synthese extrazellulärer Matrix verantwortlich für die Restenosierung eines Gefäßes (Popma JJ et al., 1991). Das Remodeling kann durch die Implantation eines Stents verhindert werden. Jedoch bildet

sich auch bei 10 % bis 50 % der Patienten, die mit einem koronaren Stent versorgt wurden, eine symptomatische bzw. interventionsbedürftige sogenannte in-Stent-Restenose durch Neointimaprolieration aus (Lowe HL et al., 2005). Gründe für die Neointimabildung sind die mechanische Schädigung der Arterienwand infolge Überdehnung durch den Ballonkatheter, in Verbindung mit einer Endothelschädigung. (McBride W et al., 1988). Diese Neointima wird im Laufe von Wochen bis Monaten durch Migration von Endothelzellen zwar wieder reendothelialisiert. Das neue Endothel scheint allerdings in der Funktion alteriert zu sein (Fournet-Bourguignon MP et al., 2000, Köhler R et al., 2003). Somit entstehen im manipulierten Gefäß Probleme, die zu späteren Komplikationen führen können im Sinne einer lumeneinengenden Neointimabildung durch Gefäßmuskelzellproliferation. Zur Verhinderung der In-Stent-Restenosen wurden u. a. radioaktive Stents verwendet, welche einen kontraproduktiven Effekt hatten. Intrakoronare Brachytherapie mit β - oder γ - Strahlern (Strahlendosis zwischen 7-56 Gy) konnten hoffnungsvollere Ergebnisse bezüglich der Neointimabildung und damit der in-Stent-Restenosegefahr beim Menschen erzielen mit einer Reduktion der Restenoserate auf 8% bis 33% versus 39 % bis 64 % in der Placebogruppe und einer Reduktion der klinischen Ereignisse wie Angina pectoris oder Myokardinfarkt auf 19% - 50% versus 29% - 79 % in der Placebogruppe (Sheppard R et al., 2003). Eine Verbesserung der In-stent-Restenose erbrachten Stents, die mit Medikamenten beschichtet waren, sogenannte *Drug-eluting-Stents* (DES). 2006 waren 33% der 250000 in Deutschland implantierten Stents solche DES. Diese waren überwiegend mit Sirolimus (Rapamycin) oder Paclitaxel beschichtet. Hierunter senkte sich die Restenoserate von circa 25% auf 3% (19. Herzbericht der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2006).

Als Forschungsgrundlage zur Bearbeitung dieser Aufgabe wurde ein Tiermodell verwandt, an dem man die Neointimaformation im manipulierten Gefäß und die biochemische und morphologische Wirkung von topisch eingebrachten Substanzen auf diese Proliferation studieren kann.

1.2 Die Morphologie der Arteria carotis communis der Ratte

Die Arteria carotis communis (ACC) der Ratte gehört zu den Arterien des elastischen Typs. Sie besteht aus den drei Schichten: Tunica intima, Tunica media und Tunica

externa (entspricht der Tunica adventitia). Die Intima besteht aus einer einzelligen Schicht von Endothelzellen und einem subzellulären Spalt mit Bindegewebe, welches aus einzelnen Kollagenfasern und elastischen Strukturen besteht (s. Abb. 11, 12, 15). Die Intima wird von der Media durch die Lamina elastica interna (LEI) getrennt und beträgt 1 μm (s. Abb. 15). Die LEI weist elektronenmikroskopisch einige Lücken auf (Pinto YM et al., 1998). Die Media weist drei bis vier elastische Laminae auf, wobei die äußerste Lamina elastica externa (LEE) genannt wird. Diese Laminae haben im Gegensatz zur LEI elektronenmikroskopisch keine Lücken. Zwischen den elastischen Laminae spannen sich die schräg verlaufenden glatten Gefäßmuskelzellen des kontraktiven Typs aus und sind mit ihren Fortsätzen überwiegend direkt ohne eine eigene Basalmembran an den elastischen Laminae fixiert. Außerhalb der LEE schließt sich die Adventitia an, welche aus Bündeln von Kollagenfibrillen, Fibrozyten, Nerven und kleinen Gefäßen besteht (s. Abb. 11 und 15).

1.3 Die Morphologie der menschlichen Koronararterie

Die Koronararterie des Menschen gehört zum muskulären Typ und teilt auch die Aufteilung in die drei Schichten Tunica intima, media und externa (= adventitia). Insbesondere Intima und Media von ACC und Koronararterie unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Im Vergleich zur ACC ist die Media der Koronararterie bedeutend vielschichtiger. Während die Intima der ACC der Ratte nur aus der Endothelzellschicht besteht, ist die Intima der menschlichen Koronararterie durch mehrere Schichten vielreihiger glatter Gefäßmuskelzellen gekennzeichnet und ist auch von der Media nicht so scharf abgegrenzt.

1.4 Die Neointimaformation im Tiermodell

Das Modell der Neointimaprolieration durch Ballonkatheterverletzung innerhalb der rechten ACC der Ratte dient dazu, den Reparaturprozess innerhalb der Gefäßwand besser zu verstehen. Um Rückschlüsse auf das Problem der Restenose nach PTA / PTCA beim Menschen ziehen zu können, müssen jedoch viele Unterschiede beachtet werden, auf die in der Diskussion noch näher eingegangen wird. Das Modell der Ballonkatheterverletzung wurde bereits in vielen verschiedenen Spezies etabliert

(neben der Ratte bei Maus, Kaninchen, Schwein, Hund und Primaten). Das Rattenmodell ist vielfach untersucht und in verschiedener Hinsicht vorteilhaft (relativ geringe Haltungskosten, niedriger Aufwand bezüglich Tierhaltung und OP, geringer Zeitaufwand, lange Arterie ohne Seitenäste) und wurde deshalb ausgewählt. Die postoperative Neointimabildung in dem Modell der Ratte lässt sich schließlich in drei Entwicklungsstadien aufteilen (Clowes AW et al., 1989, Clowes AW et al., 1983, Schwartz SM et al., 1995):

Nach dem Entfernen des Endothels durch den Ballon wird die Gefäßläsion innerhalb weniger Minuten mit Thrombozyten und Fibrin bedeckt (Reidy MA, 1995). Im Stadium 1 wird die nach 24 Stunden einsetzende Muskelzellproliferation folgendermaßen erklärt: Durch die Überdehnung der Arterienwand kommt es zu einem Absterben von Muskelzellen und dadurch zur Freisetzung von Mediatoren, die die Proliferation von Muskelzellen anregen. Die Migration von glatten Muskelzellen über die LEI hinaus in die Intima nach vier Tagen (Stadium 2) wird dadurch erleichtert, dass die LEI durch die Gefäßwandüberdehnung rupturiert, so dass die Muskelzellen die Intima invadieren können. Im Stadium 3 setzt ab etwa Tag 4 schließlich die Proliferation der in die Intima migrierten glatten Gefäßmuskelzellen ein, die etwa 4 Monate anhält (Neointimabildung). Die Reendothelialisierung des Gefäßlumens wird wahrscheinlich nie ganz abgeschlossen. Zumindest konnte bisher nur eine kurze Strecke der Reendothelialisierung von beiden Seiten aus beobachtet werden, während die Mitte frei von Endothel blieb (Clowes AW et al., 1983). Neuere Untersuchungen weisen auf eine Reendothelialisierung durch im Knochenmark residenten und dann im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen hin (Seeger FH et al., 2005 und Fadini GP et al., 2007).

1.5 Die Atherosklerose und Neointimabildung in Koronararterien des Menschen

Am Anfang der koronaren Atherosklerose steht ein geschädigtes Endothel. Diese Schädigung kann durch metabolische und/oder mechanische Belastungen hervorgerufen werden. Es bildet sich eine endotheliale Dysfunktion aus, welche mit veränderten antikoagulativen und antiinflammatorischen Eigenschaften, einer veränderten Angiogenese und einer Dysregulation des vaskulären Tonus assoziiert ist (Gimbrone MA Jr. Et al., 2000). Die endotheliale Dysfunktion geht einher mit einer

Proliferation neointimaler glatter Gefäßmuskelzellen, die vermehrt extrazelluläre Matrix bilden, und einer Migration von zirkulierenden Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren und cholesterinhaltige Lipoproteine aufnehmen und metabolisieren. Durch Überlastung der Makrophagen transformieren diese in sogenannte Schaumzellen und es bildet sich ein atherosklerotischer Plaque (Griendling KK et al., 1994). Bei symptomatischer KHK wird eine Koronarangiographie und ggfs. eine PTCA notwendig. Diese bewirkt eine Lumenvergrößerung an der ehemaligen Engstelle und stellt einen verbesserten Blutfluss wieder her. Allerdings findet eine direkte mechanische Schädigung der Endothelzellen dieser Region statt. Die Endothelverletzung führt zu einer Ablagerung von Thrombozyten und Fibrin im Gefäßlumen (Indolfi C et al., 2000). Durch die aktivierten Thrombozyten werden Adhäsionsmoleküle ausgebildet, an welchen zirkulierende Leukozyten mit Rezeptoren anheften (Welt FG und Rogers C, 2002). Die Migration von Leukozyten wird durch Zytokine aus vaskulären Muskelzellen und residenten Leukozyten vermittelt. Nun werden von Leukozyten, Thrombozyten und Myocyten Wachstumsfaktoren freigegeben. Diese Substanzen induzieren eine Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (Indolfi C et al., 2003). Es findet ein switch der glatten Gefäßmuskelzellen von einem kontraktilen Phänotyp zu einem synthetischen Phänotyp statt, welches als Dedifferenzierung bezeichnet wird. Die Myocyten invadieren aus der Media in die Intima und bilden eine Neointima aus (Sata M et al., 2002). Initial stellt die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen einen Heilungsprozeß dar, welcher aber bei verzögerter Reendothelialisierung überschießend für die Neointimaformation verantwortlich ist. Außerdem kommt es zur Dilatation der Gefäßwand und der dadurch zuvor schon beschriebenen konsekutiven Freisetzung von Mediatoren. Einen ebenfalls negativen Einfluss üben Intima- / Mediadissektionen und Plaque-Rupturen aus, da sie wiederum stark thrombogen wirken (Farb A et al., 1990). So kommt es durch die Ausbildung einer Neointima in ca. 35% der Fälle nach erfolgreicher PTCA zu einer Restenose. Der Restenoseverlauf erfolgt in drei Stufen. In der ersten Phase (1 bis 14 d) kommt es aufgrund der Gefäßwandelastizität nach Dilatation zu Rückstellbewegungen, welche als „elastic recoil“ bezeichnet werden. Zusätzlich kommt es zur Produktion extrazellulärer Matrix und Bildung von Proteoglykanen innerhalb der Intima mit verstärktem Plaquewachstum (Ip JH et al., 1991, Forrester JS et al., 1991). Die zweite Phase (2 bis 12 Wochen) wird bestimmt durch eine verstärkte Muskelzellreplikation innerhalb der Media und der Migration von

Fibroblasten und Gefäßwandmyozyten aus der Media in die Intima (Bauriedel G et al., 1995 und Machnig T et al., 1997). In der letzten Phase kommt es zum Abbau von Proteoglykanen und einem endgültigen Umbau der extrazellulären Matrix, dem sogenannten pathologischen Gefäßumbau (Grewe PH et al., 2000). Innerhalb der menschlichen vorgeschädigten Koronararterie spielt außerdem eine pathologische Angiogenese eine wichtige Rolle bei der Plaque-Expansion und der Entstehung einer Restenose. Plaques benötigen Kapillaren zur Aufrechterhaltung der Nährstoffzufuhr. Dieses Einsprießen von Kapillaren ist notwendig für die Entwicklung, Erhaltung und Expansion der Neointima. Für atherosklerotische Plaques und die Neointima entspringen diese einsprießenden Kapillaren aus der Tunica adventitia (Moulton KS, 2001 und Fuchs S et al., 2001).

1.6. Pathogenese der Neointimaformation nach mechanischer Gefäßmanipulation

Die Erhaltung der Gefäßwandhomöostase benötigt ein komplexes Zusammenspiel zwischen den zellulären Komponenten, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen. Gefäßverletzung durch endoluminale Eingriffe wie zum Beispiel PTA / PTCA oder offene chirurgische Interventionen wie z. B. ACVB unterbricht die Gefäßintegrität und verursacht einen Endothelzellschaden und Endothelzelldenudierungen (Shirotani M et al., 1993). Dieses setzt die subendotheliale Schicht (die Basallamina, Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten) dem Blutstrom aus und verursacht die Freilassung von Cytokinen und Wachstumshormonen, welche einen signifikanten Umbau der Zytoarchitektur der Gefäßwand bewirken. Frühe Ausschüttung von Thrombin (führt zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen) induziert die lokale Thrombozytenaggregation (Sharony R et al., 2006). Dieses führt zur Ablagerung eines Thrombozyten-Fibrinschorfs im beschädigten Areal des Gefäßes. Aktivierte Blutplättchen exprimieren dann pro-entzündliche Mediatoren, führen zur vermehrten Bildung von Zelladhäsionsmolekülen, schütten angiogenetische Wachstumsfaktoren aus und induzieren eine Leukozytenanlockung (Pintucci G et al., 2002). Die zwangsläufig hervorgerufenen Veränderungen durch Endothelzellschädigung bzw. –verlust, aktivierten Thrombozyten und Leukozyten produzieren eine Fülle von Molekülen innerhalb der Gefäßwand. Diese Moleküle beinhalten Enzyme (Matrixmetalloproteinasen = MMP, Thrombin), Wachstumsfaktoren (basic fibroblast

growth factor = FGF-2, transforming growth factor beta = TGF- β , platelet-derived growth factor = PDGF, insulin-like-growth-factor = IGF-1) und Zytokine (tumor necrosis factor- α = TNF- α , Interleukin-1). All diese Faktoren zusammen spielen eine maßgebliche Rolle bei der phänotypischen Umwandlung der Gefäßmuskelzellen vom kontraktilen zum synthetischen Typ. Die entstandenen *synthetischen* Muskelzellen sind nun in der Lage, vermehrt Wachstumsfaktoren und Zytokine sowohl in autokriner als auch parakriner Weise zu bilden, um eine Transformation von Gefäßmuskelzellen und eine Leukozyten-Chemotaxis aufrechtzuerhalten. Innerhalb von Wochen formiert sich durch Proliferation und Migration von synthetischen Gefäßmuskelzellen eine *Neointima*, in der vermehrt Komponenten extrazellulärer Matrix (Kollagen, Proteoglykane, Elastin) produziert und abgelagert werden (MacLeod DC et al., 1994). Im Rahmen der weiteren „Reparaturmechanismen“ findet eine Reendothelialisierung statt, welche sowohl durch im Knochenmark residente und dann im Blut zirkulierende endotheliale Progenitorzellen als auch durch kontinuierliches Einwachsen von Endothelzellen von intakten Endothelschichten proximal und distal der Läsion her vermittelt wird. Die lückenlose Ausbildung einer intakten Endothelzellschicht bildet dann die Voraussetzung für ein Ende der Neointimabildung. (Seeger FH et al., 2005 und Fadini GP et al., 2007).

1.7 Intrazelluläre Signaltransduktionswege als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli

Zellen eines vielzelligen Organismus sind darauf angewiesen, sich miteinander „auszutauschen“, um ihre Entwicklung und Organisation zu Gewebeverbänden zu regulieren, um ihre Proliferation, Teilung, Differenzierung, Dedifferenzierung etc. zu kontrollieren und ihre verschiedenartigen „Aktivitäten“ zu koordinieren. Um all dies zu bewerkstelligen, muss ein extrazelluläres Signal über intrazelluläre Signaltransduktion durch die Zellwand hindurch in den Nukleus weitergeleitet werden. Hierfür stehen unterschiedlichste Mechanismen zur Verfügung, um letztlich eine Veränderung der Genexpression hervorzurufen. Während z. B. Steroidhormone durch die Zellwand hindurch diffundieren können, binden sie an einen zytoplasmatischen Rezeptor und induzieren eine Translokation dieses Rezeptor-Ligandenkomplexes in den Zellkern. Alle wasserlöslichen Moleküle (unter vielen anderen z. B. Proteinhormone, Immunglobuline, Wachstumsfaktoren) sowie einige lipidlösliche Proteine binden dagegen extrazellulär an membranständige Rezeptoren der Zellwand und verursachen damit eine

Konformationsänderung, wodurch Signale über intrazellulär liegende Domänen dieses membranständigen Rezeptors ins Zellinnere weitergeleitet werden. Hier stehen z. B. katalytische Rezeptoren zur Verfügung, die sich durch die Plasmamembran erstrecken und eine zytoplasmatische Domäne haben, welche Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität besitzen. Solche Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) werden durch Oligomerisieren bei Ligandenbindung aktiv. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren oder inaktivieren über ein GTP-bindendes Regulator-Protein (G-Protein), ein weiteres Enzym oder einen Ionenkanal. Dieses führt oft zur Produktion und/oder Freisetzung weiterer Signalmoleküle (second messenger), wie cAMP oder Kalzium. Die Weiterleitung der Signale innerhalb des Zytoplasmas erfolgt dann über Adaptermoleküle auf Serin/Threonin-Kinasen. Diese sogenannten MAP-Kinasen werden über komplizierte und ineinander verwobene zytoplasmatische Proteinkinasekaskaden aktiviert. Hierbei aktiviert eine Serin/Threonin-Kinase (MAP-KKK = mitogen activated protein kinase kinase kinase, membrane shuttle kinase) eine nachfolgende Kinase (MAP-KK, dual specificity kinase), welche wiederum eine MAP-Kinase (MAP-K, nuclear shuttle kinase) aktiviert. Das Signal gelangt von hier aus indirekt oder direkt zu seinem Ziel: entweder werden vorher noch weitere Kinasen aktiviert oder die aktivierte MAP-K disloziert in den Nukleus und ruft so selbst eine differentielle Genexpression und eine Zellantwort hervor. Nachfolgend können Änderungen von Enzymaktivitäten, Zelldifferenzierung, Hemmung oder Steigerung der Proteinbiosynthese, Zellproliferation oder Steigerung der Apoptoserate die Folge sein (Cohen P et al., 1997).

Bei den mitogen-aktivierten Proteinkinasen, im Folgenden als MAPK beschrieben, werden die extrazellulär regulierten Kinasen, die ERK-Familie, von den stress-aktivierten Proteinkinasen, den sogenannten SAPK, unterschieden. Zu den stress-aktivierten Kinasen gehören die p38-MAPK-Familie (Größe 38 KD) und die JNK-Familie (c-jun N-terminale Kinase).

1.8 Die ERK1/2-Kinase-Kaskade

Die zwei extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 (p44), das 44 KD große Protein, und ERK2 (p42), das 42 KD große Protein, sind unter anderem bei Primaten, der Maus, der Ratte und in Hefe nachgewiesen (Widmann et al, 1999). Diese extrazellulär-regulierten Kinasen nehmen insbesondere bei der Regulierung der Zellproliferation und

Zelldifferenzierung eine zentrale Stellung ein. Hierbei binden Faktoren (z. B. Wachstumshormone) an zellmembranständige Tyrosinkinaserzeptoren (TKR), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Wachstumshormonrezeptoren und aktivieren die mitogen aktivierte Proteinkinasekaskade. Über verschiedene Isoformen des G-Protein-bindenden Proteins Ras werden schließlich verschiedene Raf aktiviert und dann weiter über die MEK1 der Phosphorylierungsschritt fortgesetzt, so dass die ERK1/2 aktiviert werden können (Roux PP et al., 2004). Zum Erreichen der vollen katalytischen Aktivität müssen MAP-Kinasen sowohl an einem Threoninrest (T), als auch an einem Tyrosinrest (Y) phosphoryliert werden. Bei ERK1 und ERK2 handelt es sich um Threonin und Thyrosin mit einem dazwischen liegenden Glutamatrest (E). Es ergibt sich ein sogenanntes T-E-Y-Motiv. Die phosphorylierten Threoninreste und Tyrosinreste unterscheiden sich bei den verschiedenen Rassen innerhalb ihrer Position und liegen beim Menschen bei 202/185 für Threonin und 204/187 für Tyrosin und bei der Ratte und der Maus bei 183 für Threonin und 185 für Tyrosin (Ray LB et al. 1988 und Ahn NG et al., 2001).

1.9 Die p38 Kinase-Kaskade

Die p38-Kinase zählt zu den sogenannten stressaktivierten Proteinkinasen. Es handelt sich um Proteinkinasen mit einer Größe von 38 Kilodalton. Die Aktivierung erfolgt zum Beispiel durch UV-Bestrahlung, Hitzeschock, osmotischen Stress, bakterielle Lipopolysaccharide, proinflammatorische Zytokine (z. B. Il-1 oder TNF- α) oder auch zu einem geringeren Anteil durch verschiedene Mitogene (Zhang W et al., 2002). Nach Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren sind die ersten Substrate, die MAP-KKK, folgende: MEKK1-4, MLK2 und MLK3, DLK, ASK1, Tpl2 und Tak1, MKK3 und MKK6. Mindestens vier Isoformen wurden identifiziert (p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ), welche alle von der MAPK-Kinase MKK6 (MAP-KK, siehe Abbildung 1) phosphoryliert werden. Weiterhin kann MKK3 die p38 α , p38 γ und p38 δ aktivieren und die MKK4 nur p38 α . Das aktivierte = phosphorylierte p38-Protein vermittelt cytosolisch oder nach Translokation in den Zellkern. Ziele können zum Beispiel die zytosolische Phospholipase A2, das mikrotubuläre Protein Tau und mehrere Transkriptionsfaktoren (ATF1-2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF-KB, Ets-1 und p53) sein (Roux P et al., 2004). Diese vermögen dann wiederum, die Expression von Genen zu regulieren, welche ihrerseits das Zellverhalten modulieren.

Es existieren noch splice-Varianten der p38-MAP-K, so zum Beispiel p38 β 2, welcher acht für die β -Isoform typischen Aminosäuren fehlen, oder Mxi, welche eine splice-Variante von p38 α ist, der achtzig c-terminale Reste fehlen und siebzehn neue enthält. Allen ist das TGY-Motiv (Threonin-Glycin-Tyrosin) an der Phosphorylierungsstelle inne. Die p38-MAP-Kinasen spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose, Differenzierung, zellulärem Überleben, Entzündung und anderen Stress-Antworten. Während die p38 α - und p38 β -Isoformen von Pyridinyl-Imidazolen gehemmt werden können, zeigen sich die Isoformen p38 γ und p38 δ ihnen gegenüber „resistent“ (Pearson G et al., 2001). p38 α scheint die ~~ä~~ dominante Isoform in Leukozyten, Epithelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen zu sein, während p38 δ in Makrophagen dominant vertreten ist und p38 γ in Skelettmuskulatur (Shieven GL, 2005). Eine vereinfachte schematische Darstellung ist in Abb. 1 wiedergegeben.

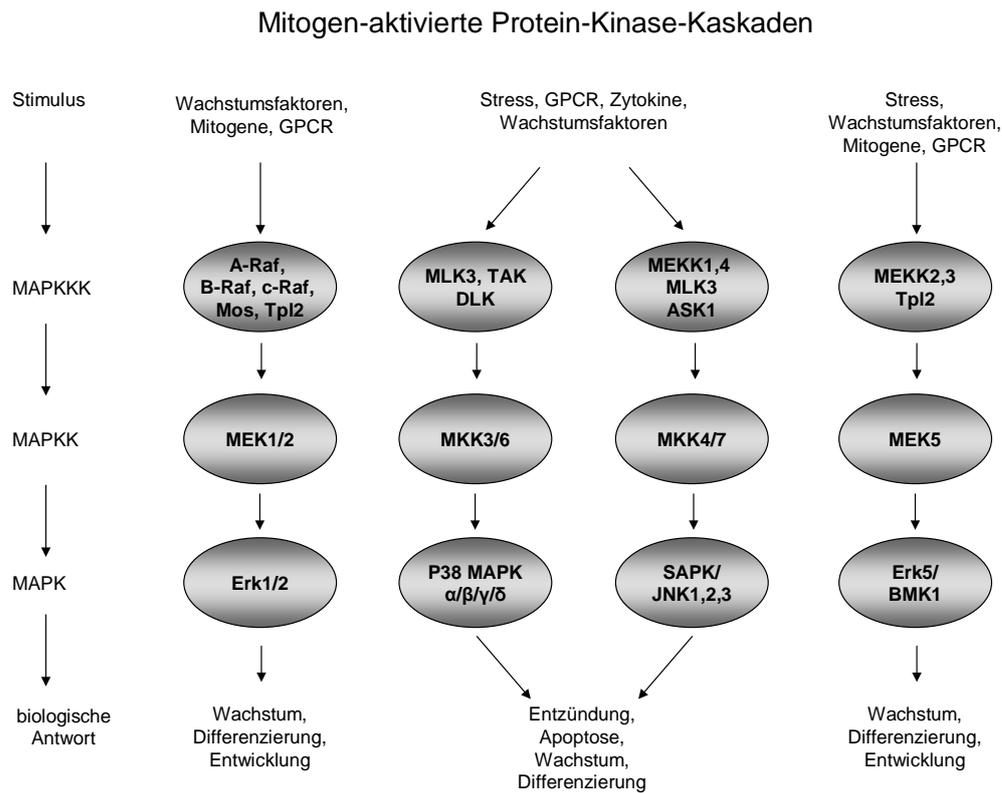


Abb. 1: Vereinfachte bildliche Darstellung der MAP-Kinase-Kaskaden. Bild modifiziert nach der Vorlage in „www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp“

1.10 PD098059

PD098059 (Formel: $C_{16}H_{13}NO_3$; Molekulargewicht 267,3) ist strukturell ein 2-Amino-3-Methoxyflavon. Es ist ein nichtkompetetiver selektiver und reversibler Hemmer der MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 (ERK-Kinasen), ohne einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die ERK selbst auszuüben. Die Inhibierung erfolgt durch selektive Bindung der inaktiven Form von MEK1 und MEK2, wodurch die Phosphorylierung und damit Aktivierung durch Raf1 verhindert wird. Weder andere MAP-Kinasen noch die bereits phosphorylierten MEK werden hierbei beeinflusst. Die IC_{50} (halbmaximale inhibitorische Konzentration) beträgt 2 bis 7 μM für MEK1 und 50 μM für MEK2 (Alessi DR et al., 1995 und Favata MF et al., 1998).

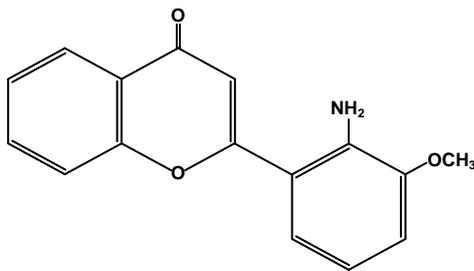


Abb. 2. Chemische Strukturformel von PD098059

1.11 SB203580

SB203580 (Formel: $C_{21}H_{16}FN_3OS$, Molekulargewicht 377,4) ist chemisch 4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-Imidazol. Es ist ein selektiver und reversibler zellpermeabler Hemmer der p38-Kinase mit einer IC_{50} von 34 nM in vitro bis 600 nM in vivo (Produktinformation der Firma Calbiochem).

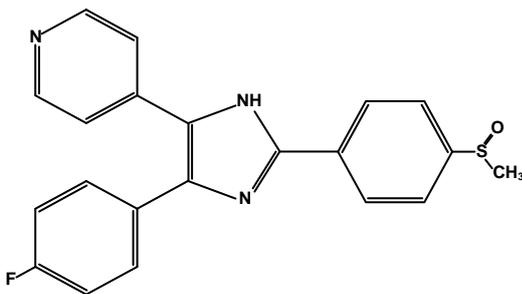


Abb. 3. Chemische Strukturformel von SB203580

1.12 PD09059 und SB203580 in in vitro- und in vivo-Studien

Bekannt ist, dass dauerhaft erhöhter Blutdruck zu einer direkten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb der Tunica Media, der Tunica Intima und auch der Neointima der großen Gefäße des Menschen führt und dies einen wesentlichen Risikofaktor für Atherosklerose darstellt. Diesbezüglich ist durch in vitro-Versuche bekannt, dass glatte Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta unter Streß (künstlich erzeugter Druck) proliferieren, und dies mit erhöhten Spiegeln phosphorylierter MAP-Kinasen einhergeht und dass diese Proliferation durch die MAP-Kinase-Inhibitoren PD098059 und SB203580 reduziert bzw. ganz gestoppt werden konnte (Tsuda Y et al., 2002). Ebenso ist bekannt, dass durch andere Substanzen (z. B. durch Proteinkinase C, Thyrosinkinase, TGF- β , Indoxyl-Sulfat, PDGF-BB, VEGF etc.) stimulierte glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte ebenso proliferieren und diese Proliferation in vitro wiederum durch PD098059 aufgehoben werden konnte (Yamamoto H et al., 2006 und Graf K et al., 1997). In in vitro-Migrationsassays (Stimulation von VSMC mit Sphingosylphosphorylcholin) konnte ein drastische Erhöhung der phosphorylierten MAP-Kinasen p38 und p42/44 nachgewiesen werden und durch SB203580 ein Stopp der Migration erreicht werden, während PD098059 keinen Effekt auf das Migrationsverhalten aufwies (Li S et al., 2006). Jeweils wurde postuliert, dass die MAP-Kinase-Kaskaden auf vielen Ebenen miteinander verwoben seien und im Falle einer Hemmung eines Signaltransduktionsweges somit komplizierte Abläufe stattfinden. Es stellen sowohl die Proliferation als auch die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen entscheidende Schritte bei der Veränderung der Tunica media und bei der Neointimaformation dar. 1997 führten Hu et al. Ballonkatheterverletzungen an Rattenkarotiden durch und bewiesen eine ERK- und JNK-Aktivierung innerhalb der Arterienwand und gesondert der Neointima zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Intervention innerhalb gepoolter Proben (Hu Y et al., 1997). Hier wurde die signifikante Rolle der MAP-Kinasen bei der Regulation von Muskelzellen aus der Tunica media und der Tunica intima nach Ballonkatheterverletzung bei Ratten hervorgehoben und eine mögliche klinische Rolle auch beim Menschen nahegelegt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die p38-Kinase-Kaskade diesbezüglich nicht untersucht. Aufgrund der ineinander verwobenen MAP-Kinase-Kaskaden lag jedoch nahe, dass ebenso dieser Weg eine Rolle spielen würde. Eine medikamentöse Hemmung hatte noch nicht stattgefunden.

2. FRAGESTELLUNGEN

Können die Methoden (die eigentliche Operationsmethode, die Entnahme der Gefäße zum Tötungszeitpunkt, die Aufarbeitung im Rahmen der Histologie / Immunhistologie, die mikroskopischen Vermessungen, die Aufarbeitung für den und Durchführung des Western blot) an unserem Institut erlernt werden und kann die Neointimaproduktion reproduziert werden?

Welche histomorphologischen Veränderungen können mittels konventioneller Mikroskopie nach einer Ballonkatheterverletzung der Ratte in Bezug auf die Tunica adventitia, die Tunica media und die Tunica neointima festgestellt werden?

Hat die einzeitige lokale und niedrigdosierte Applikation des MEK-Inhibitors PD098059 eine morphologische Wirkung auf das Lumen, die Tunica media und / oder die Tunica neointima?

Hat die einzeitige lokale und niedrigdosierte Applikation des p38-Inhibitors SB203580 eine morphologische Wirkung auf das Lumen, die Tunica media und die Tunica neointima?

Hat die kombinierte, einzeitige, lokale und niedrigdosierte Applikation der MEK- / p38-Inhibitoren PD098059 und SB203580 eine synergistische / additive Wirkung auf das Lumen, die Tunica media und die Tunica neointima?

3. METHODEN UND MATERIALIEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Materialien zur Operation:

3.1.1.1 Instrumente und Geräte:

Anatomische Pinzette (Nr. BD222R, Aesculap, Braun)

Anatomische Pinzette (Nr. BD043R, Aesculap, Braun)

Büroklammern aus Kupfer

Chirurgische Pinzette (Nr. BD533R, Aesculap, Braun)

Kurzhaarrasierer, Karstadt

Mikrofederschere (Nr. FD012R, Aesculap, Braun)

Nadelhalter (Nr. BM015R, Aesculap, Braun)

Präparierschere (Nr. BC590R, Aesculap, Braun)

Styroporplatte

Wärmematte bis 40°C, Karstadt, Deutschland

3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien:

Injektionsspritzen (Inject®-H 1 ml, Luer Solo, Braun Melsungen AG; Nr. 9166254V)

Injektionskanülen BD Microlance™3; 0,45x13 mm (Nr. 303800 Becton Dickenson GmbH)

Fogarty-Embolektomiekatheter (2 French) (Nr. 120602F, Baxter, Unterschleißheim)

Haushalts-Aluminiumfolie

Skalpell (Feather scalpel, No 21; Feather safety razor Co. Ltd., Japan; Nr. GRF-2975Nr. 21)

Vacutainer Systems, 0,8 x 19 x 178 mm, 21 gauge (Nr. 367261 Becton Dickenson GmbH)

Infusionssystem (Nr. 2886532 Fresenius-Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

Nahtmaterial Vicryl Plus 3/0 (Nr. VCP416, Ethicon, Johnson & Johnson)

Nahtmaterial Vicryl rapide 4-0 (Nr. V2920, Ethicon, Johnson & Johnson)

3.1.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Isopropanol 100%

PD098059, Calbiochem-Novabiochem: Es wurde eine Stammlösung in der Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst hergestellt, die in einer Konzentration von 200 µM in 0,1 ml Pluronic Gel appliziert wurde.

Pentobarbital-Natrium, Sigma (Nr. P-3761)

Pluronic 127 Prill, BASF, Mount Olive, NJ, USA: 12,5 g Pluronic 127 Prill wurden in 50 ml PBS without Ca^{2*}/Mg^{2*} bei 4°C steril gelöst.

SB203580, Calbiochem-Novabiochem: Es wurde eine Stammlösung in der Konzentration von 25 mMolar in DMSO gelöst hergestellt, die in einer Konzentration von 60 µM in 0,1 ml Pluronic Gel appliziert wurde.

3.1.2 Materialien für die Histologie und Immunhistologie:

3.1.2.1 Instrumente und Geräte

Entwässerungsautomat Histokinette (Reichert Jung

Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss)

Mikrotom HM 355 (Microm)

Trockner für Objektträger (Medax)

Videokamera F15 HS (Panasonic)

Wärmeschrank (60° C), Heraeus Instruments

3.1.2.2 Antikörper:

Anti – Maus - Ig - POD, Boehringer Mannheim GmbH (Nr. 1317377)

Anti – rabbit - Ig - POD, Dianova, (Nr. 111-035-003)

Ets-1, polykl. AK, Santa Cruz Biotechnology Inc., (Nr. sc-350)

Phospho-p38 MAP-K (Thr180/Tyr182) polykl. AK, New England Biolabs Inc., (Nr. 9211S)

Phospho-p42/44 MAP-K (Thr202/Tyr 204) monokl. AK, New England Biolabs, (Nr. 9106S)

sm α-Actin – monoklonaler AK, Biotrend Chemikalien GmbH, (Nr. PDM003)

3.1.2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser Nr. 1, 18 x 18 mm, Merck KGaA, Deutschland

Eukitt mounting medium, Nr. 15320, Electron Microscopy Sciences

Feuchtkammer für die Immunhistologie: Eigenbau

Objektträger, Menzel-Gläser, Deutschland

Objektträgerkasten, Kobe, Marburg, Deutschland

Superfrost-Objektträger, Menzel-Gläser

3.1.2.4 Citratpuffer für die Immunhistologie:

21 g Citronensäuremonohydrat und 29,41 g Natriumcitrat-2-H₂O pro Liter, pH6.

3.1.3 Materialien für die Zellkultur:

3.1.3.1 Instrumente und Geräte

Brutschrank BB16CU, Heraeus instruments, (Nr. 51008334)

Ultraturrax T25, Janke & Kunkel, Staufen i. Br., Deutschland (Nr. 339033)

Zellkulturwerkbank Gelaire, Flow Laboratories, Modell BSB4 (Nr. 11765)

3.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Cellscraper, BD Falcon™, 18/1,5 cm, 353085

Kulturflaschen mit Filter, Nunc GmbH & Co. GK, Wiesbaden, Deutschland

Medien für ECV 304 (ECACC, Salisbury, USA):

Medium 199 Earle ohne L-Glutamin. Zusätze: 1 % Penicillin / Streptomycin, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien, 1 % L-Glutamin (200 mM), 10 % FCS Biochrom AG, Berlin, Deutschland.

Medien für A7R5-Zellen:

DMEM, Biochrom AG, Berlin, Deutschland + 4,5 g/l Glukose + 1,5 g/l NaHCO₃ + 4 mM L-Glutamin + 1 mM Na-Pyruvat + Pen/Strep 10.000 U/ml + 10 % FCS.

Medien für HUVEC-Zellen:

ECGM mit Supplement Mix, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland.

PBS mit Mg²⁺/Ca²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

TPA, Sigma, Deutschland

Trypsin, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

3.1.4 Materialien für den Western blot

3.1.4.1 Instrumente und Geräte

Elektrophoresekammer (Kammer, spacer, Kämme) Bio-Rad

Filmkassette Kodak

Mikroplate reader MRX, Dynex technologies, USA.

Photoentwicklermaschine Kodak XOMAT 5000 RA Processor (Nr. 171-9004)

Software Revelation 3.0, Dynex technologies, USA.

Whatman Fastblot B43, Biometra (Nr. 015-100)

3.1.4.2 Reagenzien, Lösungen und Chemikalien

Lyse-Puffer: 20 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EGTA, 1 mmol/l Na_3VO_4 , 1 % Triton X 100, 50 mmol/l NaH_2PO_4 , 1 Tabl. Complete pro 10 ml Puffer, Aqua dest..

Bio – Rad DC Protein Assay, Bio – Rad Laboratories, CA, USA

Reagent A (Nr. 500-0113), Reagent B (Nr. 500-0114), Reagent S (Nr. 500-0115).

BSA, Sigma, Deutschland.

4 x Probenpuffer nach Laemmli: 250 mM TRIS, 40 % Glycerol (mit HCl auf pH 6,75 eingestellt), 8 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau.

Ponceau S, Sigma (Nr. P7767)

TEMED, Sigma (Nr. T8133)

Tween 20, Roth (Nr. 9127.2)

Laufpuffer nach Laemmli: 15 g Trisbase (25 mM), 72 g Glycin (192 mM), 5 g SDS (0,1 %), Aqua dest. ad 5 l.

Transferpuffer: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,3.

Sammelgel: 835 μl AA / BAA (30:0,8), 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8, 25 μl 20 %iges SDS, 2,89 ml Aqua dest., 50 μl 10 %iges APS, 5 μl TEMED.

Trenngel: 5 ml AA / BAA (30:0,8), 3,75 ml 1,5 M Tris pH8,8, 75 μl 20 %iges SDS, 6,175 ml Aqua dest., 150 μl 10 %iges APS, 15 μl TEMED.

Waschpuffer: 1 x TBS und 0,5 % Tween 20.

10 x TBS: 200 mM Tris und 1,5 M NaCl auf pH 7,5. Für 500 ml sind das 100 ml 1M Tris, 150 ml 5M NaCl und Aqua dest. Ad 500.

Blocking grade blocker, non-fat-dry-milk, zur Blockade unspez. Proteinbindungen

Biorad (Nr. 170-6404), CA, USA: 5 % Milchpulver in 1 x TBS (2,5 g in 50 ml).

Blocking grade blocker zur AK – Inkubation (s.o.): 0,5 % Milchpulver in 1 x TBS
(=0,025 g in 5 ml).

ECL – Reagenz 1 und 2, Amersham pharmacia biotech, NJ, USA (Nr. RPN 2109)

3.1.4.3 Verbrauchsmaterialien

96-Loch Mikrotiterplatte, Nunc, Wiesbaden, Deutschland (Nr. 269620).

Eppendorfröhrchen, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Mikrotippipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3 MM Whatmanpapier, Schleicher & Schuell, (Nr. GB002)

Nitrozellulosefilter 45 µm, Schleicher & Schuell

Hyperfilm – ECL, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA (Nr. RPN2114)

3.2 METHODEN

3.2.1 Zellkulturexperimente

A7r5-Zellen sind eine immortale Zelllinie von aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte. Die relativ langsam proliferierenden Zellen wurden in 80 cm²-Kulturflaschen bei 37° C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank zur Konfluenz gebracht. Zwei mal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. 24 Stunden vor der Stimulation wurden sie auf 0,1% FCS gesetzt, um eine Hintergrundstimulation der MAP-Kinasen durch Serum zu minimieren. Die Stimulation bestand darin, den Zellrasen je zehnmals quer und längs mit der Ecke eines Zellschabers unter leichtem Druck zu zerkratzen, um eine mechanische Läsion zu simulieren, so dass eine auch makroskopisch sichtbare Verletzung stattfand. Vor dem Ernten wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Monolayer zweimal mit PBS gespült. Anschließend Zugabe von 500 µl Lyse-Puffer. Die Ernte erfolgte mit dem Zellschaber nach 0, 1, 5, 10, 15, 20 und 30 min. Dieses Kratzmanöver dauerte insgesamt ca. fünf Sekunden an. Das Abschaben der Zellen dauerte insgesamt circa 10 sec. Die Zellsuspension wurde im Ultraturax mit 24.000 U/min unter Kühlung 1 min bei 4° C homogenisiert. Nach Zentrifugieren bei 1200 U/min über 5 min und bei 4° C wurde der Überstand bei -80° C eingefroren.

ECV 304-Zellen: Es handelt sich um stark proliferative Zellen, die ursprünglich als „spontan transformierte Endothelzellen der Umbilikalvene eines neugeborenen Japaners von 1984“ beschrieben wurden (Takahashi et al., 1990). DNA-Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass es sich bei den Zellen wahrscheinlich um Derivate der Urothelcarcinomzelllinie T-24/83 handelt und diese damit einen epithelialen Zelltyp darstellen (Suda et al., 2001; Brown et al., 2000). Das Wachstum der Zellen war erheblich schneller als bei den A7r5-Zellen und somit war auch die Konfluenz der Zellen schneller erreicht. Für den Westernblot wurden die Zellen in gleicher Weise, wie für die A7R5-Zellen beschrieben, geerntet.

Endothelzellen von humanen Umbilikalvenen (*human umbilical vein endothelial cells* = HUVEC): Der Bezug von frischen Nabelschnüren erfolgte über die Entbindungsstation der Gynäkologie des Hauses. Die Aufbewahrung erfolgte in sterilem PBS bei 4° C über maximal sechs Stunden. Die Nabelschnur wurde entnommen, mit Kleenex gereinigt und mit PBS durchgespült, um das restliche Blut zu entfernen. Um die HUVEC herauszulösen wurden nun mittels Venenverweilkanüle 10-20 ml 1,25 %iges Trypsin in die vorn und hinten abgeklemmte Vene gefüllt und über 30 min im Brutschrank inkubiert. Durch Kneten der Nabelschnur und anschließendes Lösen einer Klemme und Nachspülen mit 10 ml PBS konnte die Zellsuspension in einem Falconröhrchen aufgefangen und bei 900 U/min. bei RT über 10 min. zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment mit 10 ml ECGM resuspendiert und auf zwei 25 cm²-Kulturflaschen verteilt. Am Folgetag wurden die Überstände abgesaugt, zweimal mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Alle zwei Tage erfolgte der Mediumwechsel. Die Konfluenz war nach ca. vier Tagen erreicht.

3.2.2 Aufarbeitung von Zellen und Geweben zur weiteren Verarbeitung

Für die Aufarbeitung der Arterien zum Western blot wurden die gefrorenen Gefäße im flüssigen Stickstoff mit Mörser und Stößel zermahlen und anschließend in 1,5 ml eines Phosphataseinhibitor-Proteinaseinhibitor-Proteinextraktionspuffers (s. auch im Teil Material) aufgenommen. Hierzu wurde das Pulver über 30 sec. unter Kühlung bei 4° C mit dem Ultraturrax in diesem Puffer homogenisiert. Nach jeder Verarbeitung einer Probe wurden die Geräte (Stößel, Mörser, Ultraturrax) gereinigt und getrocknet, um

eine anschließende Kontamination zu vermeiden. Danach wurden die Proben bis zur Verarbeitung im Westernblot nochmals gevortext, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C in Eppendorfröhrchen gelagert.

3.2.3 Die quantitative Proteinbestimmung

Die BSA – Standardreihe enthielt 0, 1, 5, 10, 20, 50 und 80 μg Protein pro μl . Die gemessenen Proben lagen zwischen den Standardwerten. Verwendet wurde der Bio-Rad Protein Assay nach dem beiliegenden Protokoll. Eine 96-Loch Mikrotiterplatte wurde mit den Proben und den Bio-Rad-Reagenzien beschickt. Die Standardkurve wurde mittels der Software (Revelation 3.0, Dynex technologies, USA) auf *cubic spline* gestellt. Die Messung erfolgte im Mikrotiterplattenlesegerät bei 750 nm. Entsprechend der ausgedruckten Ergebnisse wurden die Proben für den Westernblot verdünnt, so dass pro Tasche genau 20 μg Protein aufgetragen wurden.

3.2.4 Western blot

Der Western blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörpern nach Auftrennung durch Elektrophorese. Hierbei wird die zu untersuchende Proteinprobe in einem SDS-PAA-Gel elektrisch aufgetrennt. Nachfolgend werden die aufgetrennten Proteine vom Gel elektrisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (blot). Diese Membran wird mit dem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörper inkubiert. In einem zweiten Inkubationsschritt bindet ein zweiter peroxidasegekoppelter Antikörper an den Primärantikörper. Mittels einer Detektionsreaktion kann nun eine Chemolumineszenz hervorgerufen werden, mit welcher sich Banden durch Autoradiographie darstellen lassen.

Das Gel: Die Gelplatten wurden vor Gebrauch mit NaOH, Ethanol und Aqua dest. gereinigt. Die Gelmischung wurde mit einer Spritze und einer Kanüle zwischen die beiden Platten eingefüllt. Das Gel bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Zuerst wurde das Trenngel bis 5 mm unterhalb des Kammes gegossen. 90 sec. danach wurde dieses mit einem Isopropanol-Wasser-Gemisch (1:4) überschichtet. Nach ca. 10 min. war die Polymerisation abgeschlossen. Die Flüssigkeit wurde mit einem

Whatmanpapier abgesaugt. Nun wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Die Elektrophorese: 20 µg Protein wurden pro Geltasche eingesetzt. Dazu gab man ein Viertel der Menge an 4 mal Probenpuffer nach Laemmli. Vor dem Beladen wurden die Proben, sowie die Molekulargewichtsmarker für drei min. bei 95° Celsius gekocht. Das Gel wurde nach Entfernen des Kammes mit Hilfe von Gel-Ladertips beladen und bei 90 Volt laufen gelassen, bis die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran: Das Gelsandwich wurde aus der Apparatur ausgebaut und in eine Wanne mit Transferpuffer gelegt. Fünf Whatmanpapiere, die die gleiche Größe wie die des Gels hatten, wurden im Transferpuffer getränkt und auf die Anode gelegt. Luftblasen wurden ausgerollt. Nach dem Auseinanderbauen der Platten wurde das Gel auf die Whatman-Papiere aufgebracht und wiederum mit fünf transferpuffergetränkten Whatman-Papieren bedeckt. Nach Verschluss der Apparatur wurde unter laufender Wasserkühlung mit maximal 5 mA/cm² Gelfläche und maximal 10 Watt geblottet. Blot-Dauer: zwei Stunden.

Proteinfärbung: Abbau der Apparatur. Danach Färbung mit Ponceau S über 30 sec. Herauswaschen der Farbe, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Kopieren der Blots als Kontrolle für den gleichmäßigen Proteinauftrag und zur Proteingrößenbestimmung mittels der Größenstandards. Die Lauffronten wurden auf der Nitrocellulosemembran mit Bleistift beschriftet.

Blockade der unspezifischen Proteinbindungen: Die Größenstandards wurden abgetrennt und aufbewahrt. Über 90 min wurde auf dem Schüttler mit 5% Milchpulver in 1 mal TBS bei RT inkubiert.

Waschen: Drei mal über jeweils 5 min bei RT mit 0,5% Tween/TBS und dreimal mit TBS auf dem Schüttler.

Inkubation mit dem Primärantikörper: Konzentrationen: 0,1-1 µg/ml. Insgesamt 5 ml Inkubationsflüssigkeit (0,5% Milchpulver/TBS). Inkubationszeit 45 min bei RT oder über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler.

Waschen: Wie oben.

Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Anti-rabbit-POD wurde 1:5000-1:10000, anti-mouse-POD 1:750 in 0,5% Milchpulver/TBS eingesetzt. Inkubationszeit 45 min bei RT.

Waschen: Wie oben.

Detektionsreaktion: ECL-Reagenz 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Blot-Membranen wurden nach dem Trocknen 1 min in dem Reagenzgemisch inkubiert. Nach erneutem Trocknen wurden die blots zügig zwischen Overheadfolien in die Röntgenkassetten gelegt und in der Dunkelkammer dem Film zwischen 15 sec und 5 min exponiert. Entwicklung im automatischen Filmentwickler.

3.2.5 Tierhaltung, Tierantrag

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Sprague-Dawley-Ratten (erstmalig 1945 gezüchtete Inzucht-Albinorasse), die in einem vollklimatisierten Tierstall bei einer Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 15\%$ und einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ \text{C}$ gehalten wurden. Die Unterbringung erfolgte in Gruppen bis zu vier Tieren in Makrolonkäfigen auf Weichholzgranulat, welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Es wurde pelletiertes Standardfutter (Altromin 1314) und Leitungswasser in Nippeltränken ad libitum angeboten. Der Tag- / Nacht-Rhythmus wurde im zwölf-Stunden-Abstand mit künstlichem Licht aufrechterhalten. Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens war unter dem Aktenzeichen G0132/99 genehmigt.

3.2.6 Die Operationsmethode der Ballonkatheterverletzung

400 bis 450 g schwere Sprague-Dawley-Ratten wurden mit 65 mg/kg KG Pentobarbital intraperitoneal mit einer dünnen 1 ml Spritze anästhesiert. Ca. fünf Minuten nach dem Beginn der Anästhesie wurde die Ratte am Hals rasiert und auf dem Rücken liegend auf einer Styroporplatte an den Extremitäten derart fixiert, dass der Kopf der Ratte dabei zum Operateur zeigte. Der Hals wurde mit 70% Äthanol desinfiziert. Anschließend folgte der mediansagittale Hautschnitt über 2,5 cm vom Beginn des Manubrium sterni an kopfwärts. Die darunter liegende Faszie und das ca. 1 mm dicke Fettgewebe wurden in sagittaler Richtung durchtrennt. Die nun sichtbare rechte Speicheldrüse wurde mobilisiert und mit einer aufgebogenen Büroklammer zusammen mit der Haut nach rechts gezogen, um das Operationsgebiet zu vergrößern. Ebenfalls mit einer Büroklammer hielt man den M. sternocleidomastoideus nach rechts. Der nun sichtbare Musculus omohyoideus, der in der Aufsicht direkt über der Teilungsstelle der

Arteria carotis communis (ACC) in die Arteria carotis interna (ACI) und die Arteria carotis externa (ACE) liegt, wurde von dem ihn begleitenden Musculus sternohyoideus abpräpariert, in der Mitte durchtrennt und vom Os hyoideum abgeschnitten, so dass nun die Sicht auf die Bifurkation frei wurde. Anschließend konnte man vorsichtig mit zwei Pinzetten die die Arterien begleitenden Nerven (N. vagus, N. phrenicus und N. facialis) von den Gefäßen abpräparieren, ohne sie mit der Pinzette zu greifen oder zu durchtrennen, indem man die Pinzetten geschlossen zwischen ihnen einführte und dann beim Herausziehen spreizte. Nun wurde ein Faden zwischen der ACI und der ACE zur Hälfte eingezogen und unter der ACC nach links wieder hindurchgeführt (Faden 1). Ein weiterer Faden wurde zur Hälfte am proximalen Ende der ACC unter der Arterie durchgezogen und mit einem Knoten versehen, so dass eine große Schlaufe entstand (Faden 2). Auch um die ACE wurden zwei weitere Fäden geschlungen; der eine wurde direkt an der Bifurkation platziert und mit einem doppelten Knoten versehen, jedoch noch nicht verknotet (Faden 3), der andere diente zur Ligatur der Arterie distal der Bifurkation. Die Fäden 1 und 2, die zum kurzfristigen Unterbinden des Blutstromes während des Ballonkathetermanövers dienten, wurden nun mittels eines 2,0 g schweren Gewichtes in Flaschenzugmanier angezogen. Nun wurde die etwa 1 bis 1,5 mm lange Strecke der ACE mittig mit einer Irisschere inzidiert und ein 2F Fogarty-Embolektomiekatheter durch die ACE in die ACC eingeführt. Nach erfolgreichem Einfädeln des Katheters konnte man vom Faden 2 wieder den Zug nehmen. Der Ballonkatheter wurde über die gesamte sichtbare Länge der Arterie unaufgeblasen vorgeschoben, dann mit 0,25 ml Luft auf eine konstante Größe aufgeblasen und bis zur Bifurkation zurückgezogen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Dann wurde Faden 2 wieder angezogen, der Katheter aus der Arterie gezogen, Faden 3 proximal des Einschnittes verknotet und der Zug von den Fäden 1 und 2 wieder genommen. Der Blutstrom konnte nun ungehindert durch die ACC in die ACI eintreten. Die ACE blieb dauerhaft verschlossen. Die lockeren Fäden wurden entfernt, die verknoteten abgeschnitten. Es folgte die Applikation von 100 µl des Pluronic F127-Gels mit oder ohne Wirkstoff. Die Wunde wurde mit 6 bis 8 Einzelknopfnähten verschlossen und mit einer jodhaltigen Alkohollösung betupft.

Das Anziehen des Fadens 2 hatte eine Längsdehnung der ACC zur Folge bei einer kurzfristigen Verlängerung der Arterie um ca. 15%. Alle anderen Fäden hatten keinen solchen Effekt.

Der gesamte Vorgang vom Beginn der Narkose bis zum Ende des Wundverschlusses dauerte zwischen 25 und 40 min. Die Ratte wurde dann wieder in den von unten durch eine Wärmematte beheizten Käfig zurückgesetzt, noch zwei weitere Stunden beobachtet und anschließend unter Standardbedingungen im Tierstall bis zum Tötungszeitpunkt weiter gehalten. Die Ratten brauchten etwa vier Stunden, um wieder vollkommen zu erwachen und ca. zwei Tage bis zur vollständigen Erholung von dem Eingriff, wobei in der Regel die Trinkwasseraufnahme am gleichen Tag, die Futteraufnahme am nächsten Tag wieder erfolgte. Dabei waren in einem Zeitraum von bis zu zwei Wochen nach der Operation keine klinischen Anzeichen für eine zentrale und/oder periphere Durchblutungsstörung, im Sinne von direkten bzw. indirekten Operationsfolgen, zu erkennen. Sekundäre Wundheilungsstörungen oder postoperative Blutungen traten nicht auf. Siehe hierzu auch die Abbildungen 4a - 4c zum anschaulichen Vergleich.

Ausgewertet wurde für folgende Behandlungsgruppen jeweils genau vierzehn Tage nach der Ballonkatheterverletzung: a) Kontrollarterie (nicht manipulierte und unbehandelte kontralaterale ACC), b) Ballondilatation ohne Pluronic-Gel, c) Ballondilatation mit Pluronic-Gel, d) Ballondilatation mit Pluronic-Gel und SB203580, e) Ballondilatation mit Pluronic-Gel und PD98059, f) Ballondilatation mit Pluronic-Gel, PD98059 und SB203580.

Abb. 4a

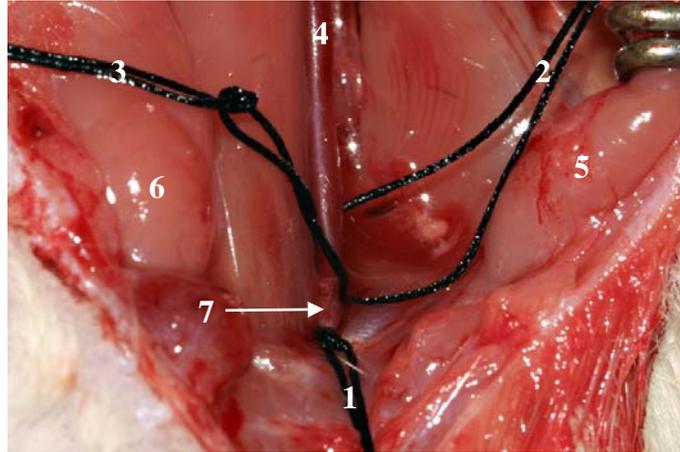


Abb. 4b

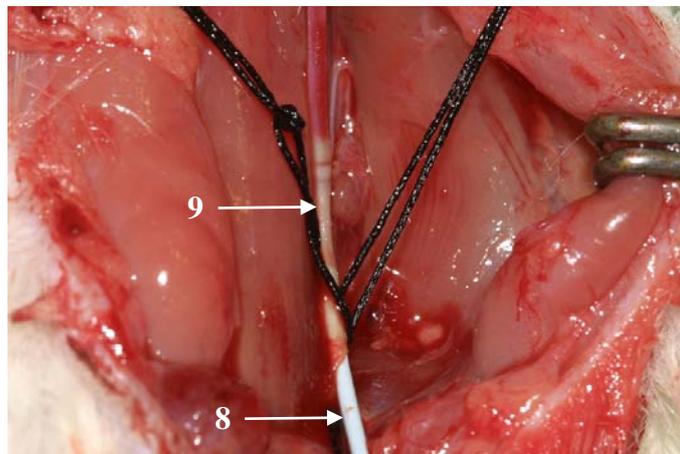


Abb. 4c

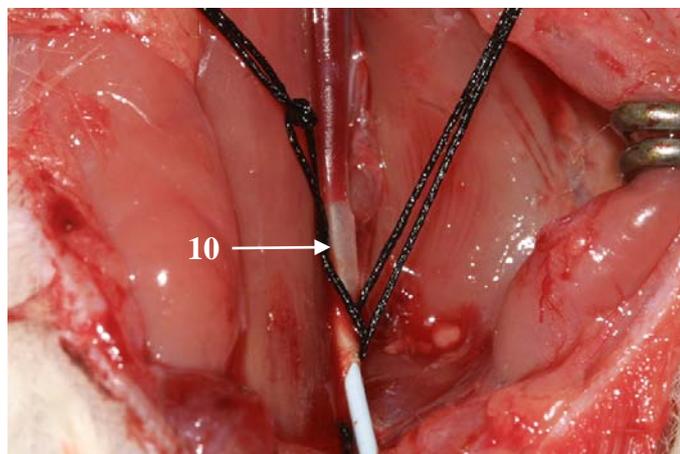


Abb.4a-4c: Veranschaulichung der Operationsmethode. **Abb. 4a:** Hier ist die ACE bereits unterbunden (1), die ACI umschlungen (2) und ein Faden um die ACE zur Unterbindung post interventionem vorgeknötet (3). Das Blut fließt weiter durch die ACC (4) in die ACI (nicht sichtbar). 5 und 6 markieren die rechte und linke Glandula submandibularis, 7 zeigt auf die ACE. **Abb. 4b:** Der 2 F Fogarty-Embolektomiekatheter (8) ist durch die ACE eingeführt und wird nicht dilatiert (9=Ballon) vorgeschoben. 1 unterbindet kurzfristig die Blutzufuhr. **Abb. 4c:** Endotheldenudierung durch Zurückziehen des inflatierten Ballons (10).

3.2.7 Herstellung und Lagerung des Pluronic Gel

12,5 g Pluronic Prill 127 wurden in 50 ml sterilem PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) bei 4°C vermischt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.8 Herstellung der Stammlösungen von SB203580 und PD098059 und der wirkstoffhaltigen Gele

PD098059 wurde in 374 µl DMSO gelöst (50 mM). SB203580 wurde in 106 µl DMSO gelöst (25 mM). Für SB203580 wurde eine Konzentration von 60 µM angestrebt, also 2,4 µl in 1 ml Pluronic Gel, wovon dann später 0,1 ml appliziert werden sollten. Für PD098059 wurde eine Konzentration von 200 µM festgelegt, also 4,0 µl in 1 ml Pluronic Gel, wovon dann ebenfalls 0,1 ml appliziert werden sollten. Bei der Herstellung für die Kombination der beiden Substanzen SB203580 und PD098059 in Pluronic Gel wurden 4,0 µl PD098059 und 2,4 µl SB203580 in 1 ml Pluronic Gel vermischt, wovon ebenfalls 0,1 ml appliziert werden sollte.

Aufgetragen wurden also 0,1 ml des jeweiligen Gels. Die Ansätze mußten eine Temperatur von 4°C bis 8°C haben, da sie bei Raumtemperatur beziehungsweise Körpertemperatur in einer geleeartigen Konsistenz erstarrten. Somit wurden sie bis zur Applikation kühlt gehalten und erstarrten beim Applizieren auf der ACC.

3.2.9 Entnahme und Konservierung der Arterien zur weiteren Verarbeitung

Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Arterien der operierten Seite und der kontralateralen Seite für die Histologie (Immunhistologie, konventionelle Histologie und zur Histomorphometrie) und für die Proteinbestimmung unterschiedlich entnommen und weiter konserviert. Zur Gefäßentnahme für die histologische Analyse wurden die Tiere 14 Tage nach Verletzung der ACC durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet. Exakt bei Sistieren des Herzschlages erfolgte die Eröffnung des Abdomens, das Durchtrennen des Diaphragmas und das Einlegen einer Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens. Unter dem Druck einer Wassersäule von 75 cm erfolgte

die Infusion von 4% Paraformaldehydlösung (PFA). Nach Beginn der Infusion wurde die Vena cava inferior durchtrennt, sodass das Gefäßsystem mit der PFA-Lösung durchspült wurde. Dies hatte zur Folge, daß die Arterien in situ fixiert wurden, ohne durch Zusammenschnurren und/oder Zusammenfallen das morphometrische Ergebnis zu verfälschen. Nach Entnahme der Arterien wurden diese 12 Stunden in PFA inkubiert und dann in kleinen Glasfläschchen mit 80%igem Ethanol gelagert.

Für die Proteinbestimmungen mittels Western blot wurden die Tiere ebenfalls mit Pentobarbital betäubt. In Narkose erfolgte die Entnahme der Arterien. Diese wurden in TBS gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierbei wurde ganz bewusst auf schnelle Verarbeitung geachtet (Entnahme der Arterien in weniger als 60 sec) und eine Dehnung der Gefäße vermieden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.2.10 Histologie und Färbungen

Die über 12 Stunden in Paraformaldehyd fixierten ACC der Ratten wurden anschließend in 80%igem Ethanol aufbewahrt und danach in den Einbettungsautomaten überführt. Hier erfolgte die schrittweise Paraffinisierung. Nach Abschluß des Paraffinisierens wurden die Arterien mit Neointimabildung bei 60°C in der Mitte durchtrennt und mit der mittleren Schnittstelle nach unten im Paraffinblock aufrecht stehend zusammen mit der kontralateralen Arterie der gleichen Ratte eingebettet, sodass die Gefäße im 90° Winkel angeschnitten werden konnten. Nach langsamem Abkühlen konnten die Schnittblöcke nun bei -20°C gelagert werden.

Vor dem Schneiden am Mikrotom erfolgte die Abkühlung in flüssigem Stickstoff über 30 sec. Danach wurden die Arterien in 3 bis 5 μm dicken Schichten geschnitten. Unter dem Mikroskop erfolgte immer wieder die Kontrolle der Neointimadicke an den ungefärbten Präparaten. Insgesamt wurden pro einzeltem Präparat geschätzte 50 Schnitte beurteilt. Bei kaum noch nachweisbarer Neointima wurde abgebrochen. Die Schnitte trockneten auf einer Wärmeplatte bei 40°C über 30 min. Über Nacht trockneten sie bei 60°C auf dem Objektträger. Danach wurden die Schnitte für verschiedene Färbungen vorbereitet, welche vom Färbeautomaten vorgenommen wurden. Diese Färbungen beinhalteten Hämatoxylin, Hämatoxylin und Eosin (HE), Sirius Red und Azan. Ein weiterer Teil verblieb für immunhistochemische Färbungen auf speziellen Objektträgern (Superfrost).

3.2.11 Histomorphometrie

Die HE-gefärbten histologischen Schnitte der ACC wurden unter einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Germany) mit einem 10er Objektiv betrachtet. Aus den vorliegenden Präparaten wurden mittels subjektiver optischer Beurteilung diejenigen mit der maximalen Neointimafläche ausgewählt. Aus diesen wurden sechs Arterien ausgemessen. Dazu wurde das mikroskopische Bild über eine Kamera (Panasonic F15 HS) eingefangen und auf einen Bildschirm übertragen. Über ein Bildverarbeitungssystem erfolgte das Digitalisieren der mikroskopischen Bilder der Querschnitte der Arterien. Am digitalisierten Bild wurden, durch manuelle Führung des Mauszeigers, die Lamina elastica externa, die Lamina elastica interna und das innerste Lumen umfahren und die daraus resultierenden Flächen in μm^2 angegeben. Durch Abziehen der Flächen voneinander erhielt man dann getrennte Werte in μm^2 für die Media, die Neointima und das Lumen. Aus dem Quotienten der Neointimafläche und der Mediafläche wurde die so genannte Neointima:Media-Ratio gebildet. Dieser Quotient sollte zum Einen Artefakte, die durch unterschiedliche Größen der Ratten zustandgekommen wären, eliminieren, zum Anderen methodische Artefakte ausräumen (durch nicht ganz rechtwinkliges Anschneiden hätten die Flächen ovaler und damit auch größer sein können).

3.2.12 Immunhistologie

Deparaffinieren und Hydrieren: Xylol 20 min (1. Gefäß) und 10 min (2. Gefäß). Isopropanol 96% 3 min, Ethanol 80% 3 min, Ethanol 70% 3 min, Ethanol 50 % 3 min, PBS 10 min. Objektträger in mikrowellenfestes Gerät stellen und im Citratpuffer (s. o.) 5 min in der Mikrowelle kochen. Nach vorsichtigem Abkühlen 5 min in PBS waschen. Endogene Peroxidase mit folgender Lösung herauswaschen: 3 ml Methanol, 3 ml Perhydrol, 24 ml PBS. Zweimal 5 min in PBS waschen. Objektträger (OT) mit 10% FCS/PBS 60 min bei 4°C inkubieren. Blockingserum absaugen. Mit primärem Antikörper (AK) über 60 min bei RT oder über Nacht bei 4° C inkubieren. Waschen: 2 mal mit 0,5% PBST (PBS und 0,5% Tween) und 1 mal mit PBS über jeweils 5 min. Über 30 min mit sekundärem Antikörper (*anti-rabbit*-Peroxidase = POD oder *anti-mouse*-

POD) inkubieren. Waschen wie oben beschrieben. Mit DAB (Diaminobenzidinlösung) 15 min. inkubieren. Mit Aqua dest. waschen. Mit Hämatoxylin 2 min färben und mit Aqua dest. abspülen, anschließend 1 min in lauwarmem Leitungswasser inkubieren, dreimal mit Aqua dest. abwaschen. Dehydrierung: 20 sec. in 95% Ethanol, 20 sec in 100%igem Ethanol, 20 sec in Xylol. Zügiges Eindecken mit zwei Tropfen Eukitt®.

3.2.13 Statistische Auswertung

Die histomorphologischen Ergebnisse (Endpunkte = jeweils Flächen in μm^2 für Tunica media, Neointima und Lumen, außerdem der Quotient aus Neointima : Tunica Media) wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest (auch Kruskal-Wallis-Test) in SAS (Statistical Analysis System) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Die frühe Aktivierung von p38 und ERK1/2 in vitro

Zunächst galt es zu überprüfen, ob eine mechanische Schädigung an Endothelzellen eine Phosphorylierung von p42/44 und p38 hervorrufen würde. Hierdurch wurde gleichzeitig die Nachweismethode an diesen Proben etabliert. Interessant war auch, nach welcher Zeit diese Phosphorylierung einsetzen würde und wie lange sie nachweisbar bliebe. Dafür wurde ein Kratzmanöver für ECV 304-Zellen verwendet, in dem der konfluente Zellrasen mit einer Ecke eines Cellscrapers wie oben beschrieben manipuliert wurde. In Abb. 5 erkennt man eine sehr frühe Phosphorylierung von p42/44 mit einem Maximum bereits nach einer Minute.

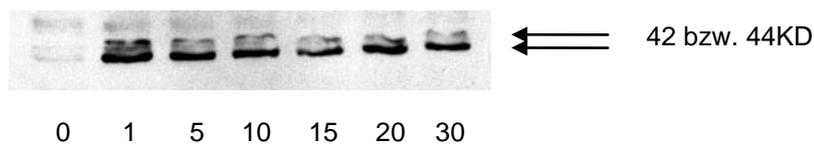
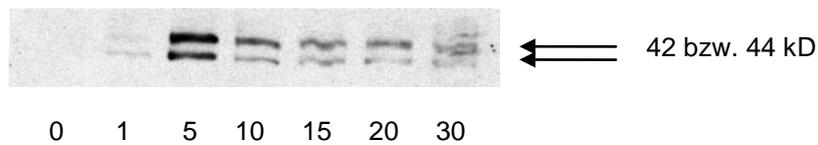


Abb. 5:

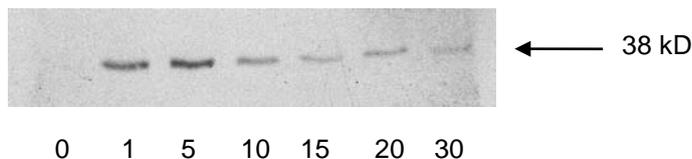
Western blot. ECV 304-Zellen wurden durch Kratzmanöver stimuliert und nach 0, 1, 5, 10, 15, 20 und 30 min geerntet. Bereits nach 1 min sieht man eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2, die auch nach 30 min noch nachweisbar ist.

Um nachzuweisen, dass ebenfalls Gefäßmuskelzellen der Ratte in vitro durch eine Kratzmanöver-Stimulation eine Phosphorylierung hervorrufen können, erfolgte ebenfalls ein Nachweis der phosphorylierten ERK1/2 im Westernblot mit ähnlichen Ergebnissen. Wie in Abb. 6 zu sehen, setzt eine frühe Phosphorylierung nach fünf Minuten ein, die jedoch auch im Verlauf schnell wieder abnimmt und nach 30 Minuten nur noch schwach nachweisbar ist.

**Abb. 6:**

Western blot. A7R5-Zellen wurden in der Zellkultur durch Kratzmanöver stimuliert und nach 0, 1, 5, 10, 15, 20 und 30 min geerntet. Sie wurden im Westernblot mit einem p42/44-Antikörper inkubiert. Phosphorylierungsmaximum bereits nach 5 min.

Ein ähnlicher Nachweis erfolgte für die ECV 304-Zellen bezüglich einer Phosphorylierung von p38 durch das Kratzmanöver der konfluenten Zellen in vitro. Hier ist in Abb. 7 ein Maximum nach fünf Minuten zu sehen. Danach nimmt die Aktivität schnell wieder ab, bis das phosphorylierte Protein nach 30 Minuten nur noch schwach nachzuweisen ist.

**Abb. 7:**

Western blot. ECV304-Zellen wurden 0, 1, 5, 10, 15, 20 und 30 min nach Kratzmanöver geerntet und mit einem Antikörper die Phosphorylierung von p38 nachgewiesen. Auch hier erkennt man ein Maximum nach 5 min.

Auch die A7R5-Zellen weisen ein ähnliches Verteilungsmuster bezüglich des aktivierten phosphorylierten p38 auf, siehe hierzu Abb. 8.

Durch diese Western blots ist auch gezeigt worden, dass die Zellen, die direkt nach dem Kratzmanöver geerntet wurden (bezeichnet als Zeitpunkt 0 min) keine Phosphorylierung von p42/44 oder p38 aufwiesen und zu diesem Zeitpunkt im „Ruhezustand“ nur sehr niedrige Konzentrationen der aktivierten Proteine vorlagen.

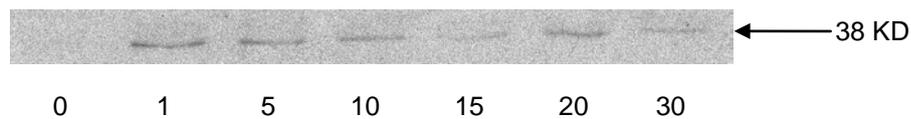


Abb. 8:

Westernblot. In der Zellkultur konfluent gewachsene A7R5-Zellen wurden 0, 1, 5, 10, 15, 20 und 30 min nach Kratzmanöver geerntet. Mit einem Antikörper wurde dann die Phosphorylierung von p38 nachgewiesen.

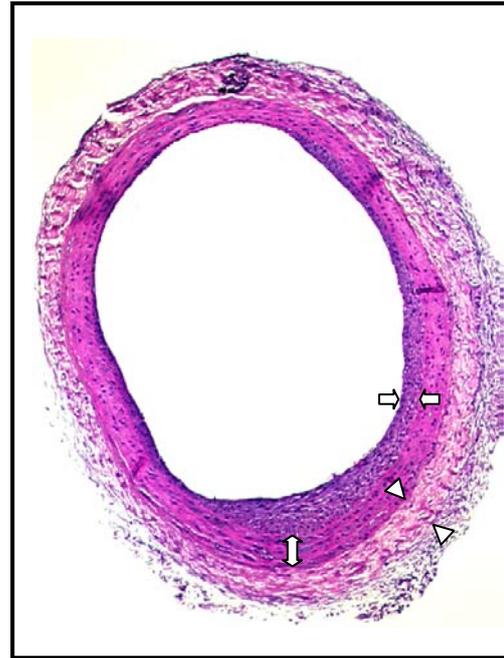
Nun galt es, die Operationsmethode zu erlernen und am Institut zu etablieren. Insbesondere interessierten histomorphologische Veränderungen und ob eine Therapie mit SB203580 und PD098059 eine Verringerung der Neointima und / oder eine Lumenvergrößerung erwirken könnte.

4.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Neointimaformation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ballonverletzung

In Abb. 9 ist eine normale unbehandelte ACC zu sehen. In typischer Weise findet sich hier die Intima, die aus einer Endothelzellschicht besteht, die Media, die aus drei bis vier Muskelzellschichten besteht, welche durch die elastischen Laminae getrennt sind und die Tunica adventitia, welche als spinnengewebsartige feine Struktur die Arterie nach außen hin abschließt. In Abb. 10 ist eine ACC sieben Tage nach der Ballonkatheter-Intervention zu sehen. Bemerkenswert waren hierbei mehrere Aspekte: zum Einen die massive Veränderung der Tunica adventitia. Hier hatte sich ein postoperativ entzündlich verändertes Narbengewebe gebildet, welches die Arterie allseits umschloß. Das kollagenreiche Gewebe war von vielen Granulozyten durchsetzt und entsprach einer natürlichen postoperativen Wundheilung.

**Abb. 9:**

Unbehandelte ACC im Querschnitt.
Die Intima besteht aus einer
Zellschicht Endothel. HE.

**Abb. 10:**

7 Tage nach Ballonkathetermanöver. Die
Pfeile ⇨ markieren die Neointima, ⇄ die
Media, △ die narbig veränderte Adventitia.

Bemerkenswert war zum Anderen die Entwicklung der Neointimaformation. In den ersten drei Tagen nach der Intervention konnten keine neointimalen Zellen im Lumen der ACC festgestellt werden. Stattdessen war die innerste Schicht, die Endothelschicht (siehe Abb. 13), fast ausschließlich nicht mehr vorhanden (in hier nicht dargestellten von mir durchgeführten immunhistochemischen vWF-Färbungen wurden mittels APAAP-Methode die im Lumen fehlenden Endothelzellen bei gleichzeitig positivem Nachweis von Endothelzellen in kontralateralen nicht manipulierten ACC bewiesen). Am vierten Tag bildete sich an einigen Stellen eine ein- bis dreizellig dicke Schicht von kugeligen Neointimazellen aus, die der LEI anlagen und ganz anders aussahen, als die zuvor ansässigen schmalen und viel kleineren Endothelzellen (siehe Abb. 14). Das heißt, dass zwischen dem dritten und vierten postinterventionellen Tag innerhalb von 24 Stunden diese nun sichtbare Migration stattfand. Es fand danach in der Regel eine exzentrische Ausbildung der Neointima statt. Das heißt, dass nicht an allen Stellen die Neointima gleich dick war. Manchmal war die halbe Zirkumferenz ohne oder mit wenig Neointima bedeckt und die andere halbe Zirkumferenz mit einer kräftigen Neointima versehen. In seltenen Fällen konnte jedoch eine sehr gleichmäßige Verteilung

beobachtet werden (wie in Abb. 17). Unter dem Lichtmikroskop wurde nie eine komplette Unterbrechung der LEI bewiesen.

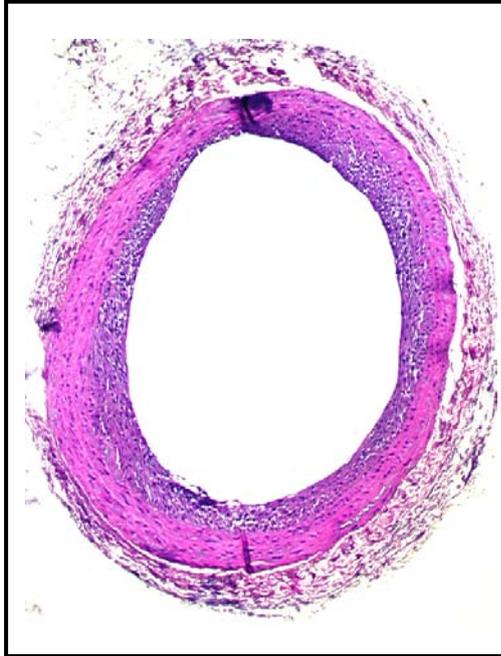


Abb. 11:

14 Tage nach Ballondilatation mit Zunahme der Neointimaproliferation und beg. Lumenreduktion. HE.

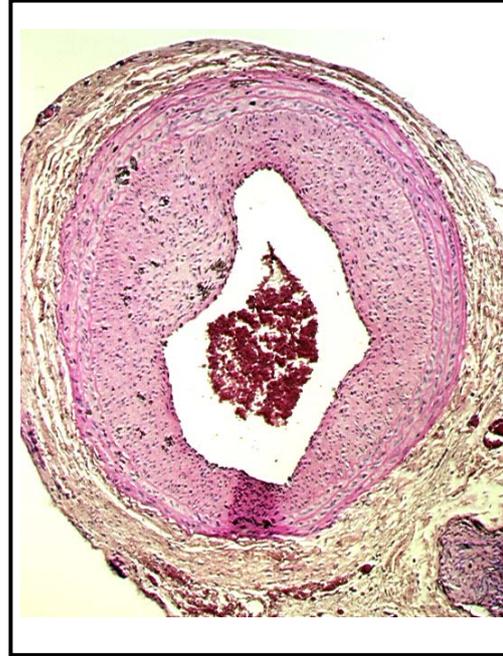


Abb. 12:

6 Wochen nach Ballondilatation mit exzentrischer Lumenreduktion durch kräftige Neointimaproliferation. Erythrocyten im Lumen. HE.

In der Abb. 11 ist zu erkennen, wie vierzehn Tage nach Gefäßverletzung eine Neointima ausgebildet ist, die annähernd die gleiche Schichtdicke wie die Tunica media hat. Hier ist die Neointimadicke bei 12 Uhr und zwischen 3 und 5 Uhr geringer als an den restlichen Stellen. Im Vergleich zur unbehandelten ACC in Abb. 9 hat ebenfalls bereits eine deutliche Lumenreduktion stattgefunden. Zieht man das Gefäß aus Abb. 12 hinzu, in dem die ACC sechs Wochen nach Intervention gezeigt ist, dann wird klar, wie viel enger das Lumen hier schon geworden ist. Außerdem ist in Abb. 12 noch besser zu erkennen, wie exzentrisch ein Gefäß eingengt werden kann und wie konstriktiv verändert die ACC wirkt, durch die Masse an Gewebe aus neu hinzugekommener Neointima und narbig veränderter Adventitia. Zu beobachten war jeweils, dass sich die lumennahen Neointimazellen eher flach dem Lumen anschmiegten und die lumenfernen Neointimazellen nahe der LEI rund und kugelig wirkten und einen großen chromatinreichen Kern aufwiesen (besonders gut zu sehen in den Abb. 15, 23 und 24).

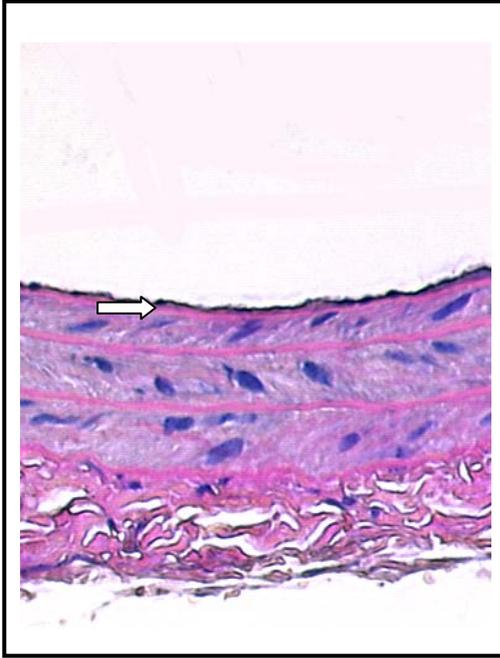


Abb. 13:
Unbehandelte ACC im Querschnitt mit
schmalem Endothelsaum. Der Pfeil
markiert die LEI. HE.

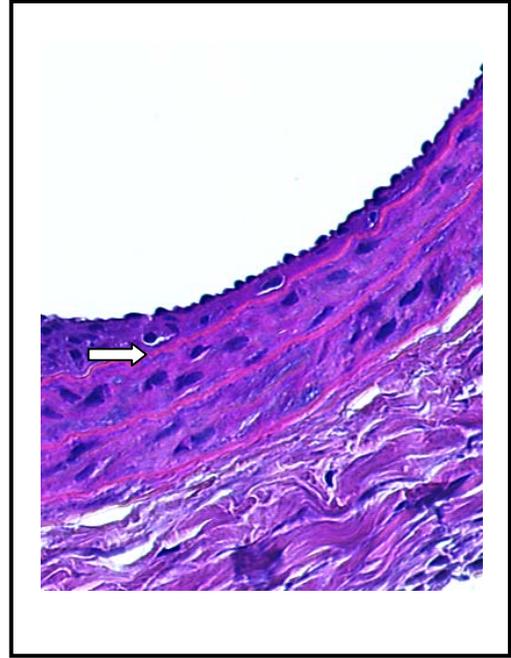
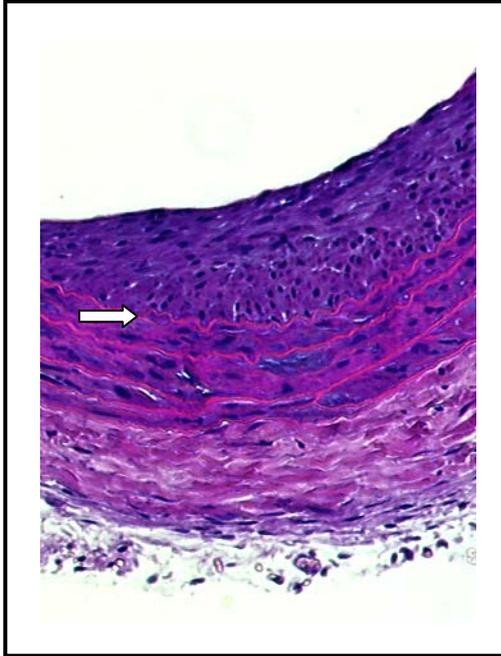
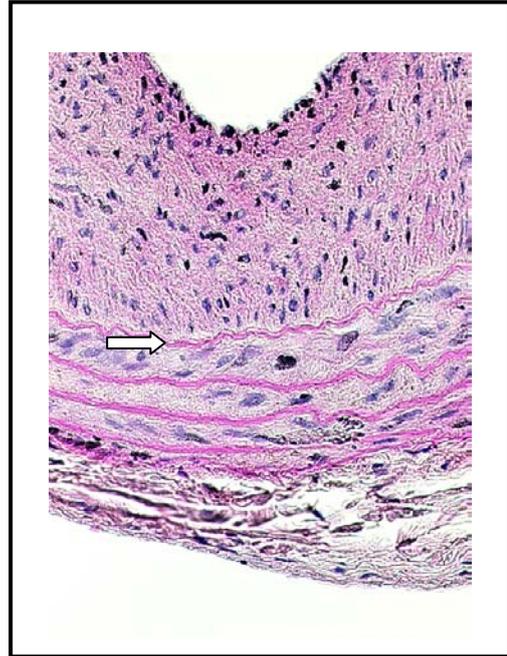


Abb. 14:
Beg. Neointimaformation 7 Tage nach
Ballonkatheterverletzung. Beachte die
narbige Adventitiaumwandlung. Pfeil:
LEI. HE.

**Abb. 15:**

Nach 14 Tagen ist eine deutliche Zunahme der Neointima zu verzeichnen. Der Pfeil markiert die Lamina elastica interna. HE.

**Abb. 16:**

6 Wochen nach dem Eingriff ist das Lumen deutlich eingeengt. Beachte die sich rückbildende Adventitia-vernarbung. Pfeil: LEI. HE.

Vergleicht man die Abbildungen 15 und 16, so wird deutlich, wie sich die unmittelbare postoperative Folge der Adventitiavernarbung, die nach zwei Wochen noch deutlich hervortritt, sechs Wochen nach der Ballonkatheterverletzung deutlich zurückgebildet hat, während die Neointima weiter gewachsen ist. Während also mit der Zeit die Konstriktion durch narbig veränderte Adventitia weniger wird, nimmt die Konstriktion durch Neointimaproliferation zu und zusätzlich verengt sich das innerste Lumen weiter. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen in einer Sirius Red-Färbung die Kollagenfasern der Adventitia, die postoperativ stark zunehmen und für eine vorübergehende Zunahme der Konstriktion mit verantwortlich sein müssten.

In den folgenden Abbildungen 17 und 18 wird der Unterschied zwischen konzentrischem und exzentrischem Neointimawachstum noch deutlicher dargestellt. Vergleicht man die Abbildungen, so erkennt man ebenfalls, dass das Lumen bei konzentrischer Einengung kleiner ist, als bei exzentrischer Einengung.

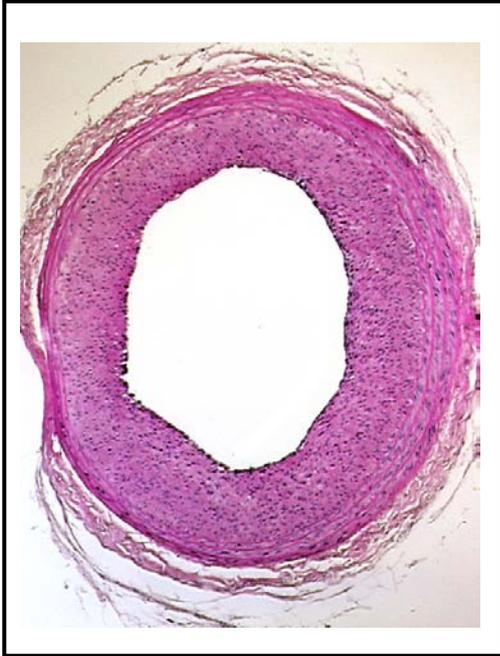


Abb. 17:
Konzentrische postinterventionelle
Lumenreduktion 14 Tage nach
Ballonkathetermanöver. HE.

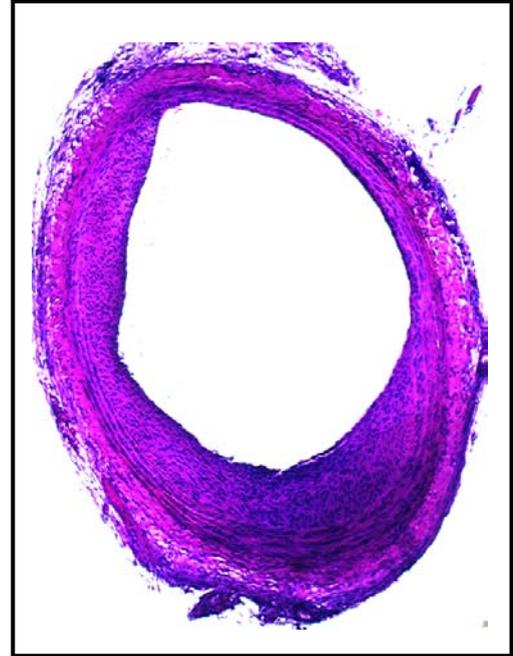


Abb. 18:
Beispiel für exzentrisches Wachstum
der Neointima. 14 d nach OP. HE.

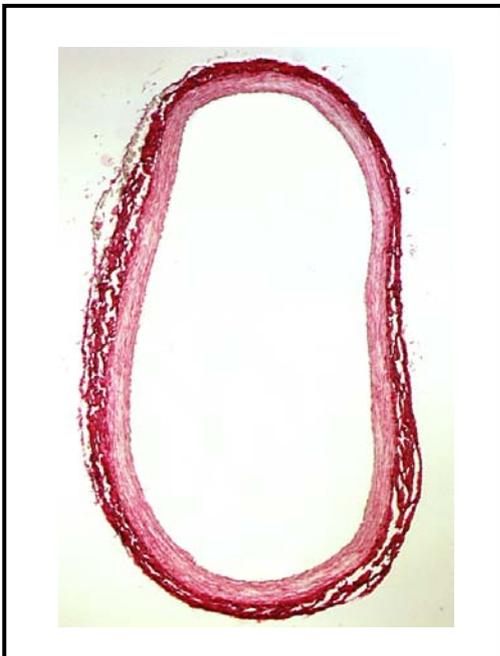


Abb. 19:
Unbehandelte ACC im Querschnitt.
Kräftige rote Anfärbung der
Kollagenfasern. Sirius Red.

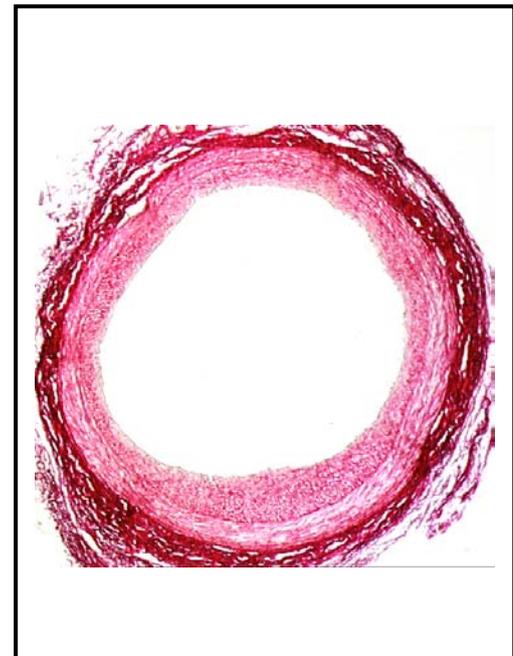


Abb. 20:
Kontralaterale Arterie zu Abb. 18, 14
Tage nach Ballonkatheterverletzung
(andere Vergrößerung). Sirius Red.

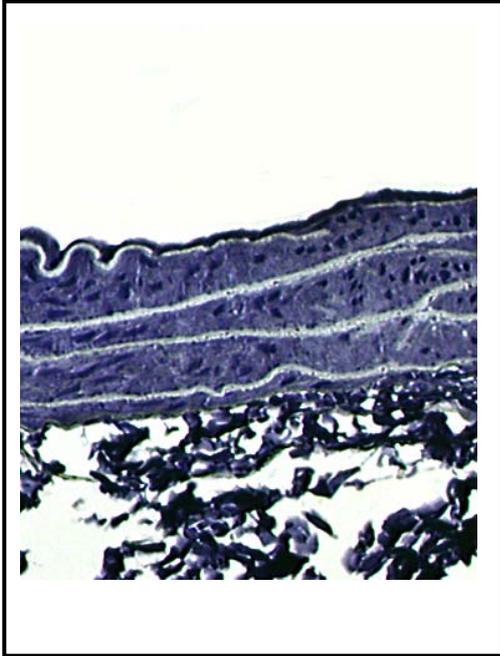


Abb. 21:
Normale ACC im Querschnitt, Lumen oben. Hämatoxylin-Färbung.



Abb. 22:
Normale ACC im Querschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von sm α -Actin (Braunfärbung).



Abb. 23:
Neointimaproliferation der ACC nach Ballonkatheterverletzung (Tag 42). Lumen oben. Hämatoxylin.

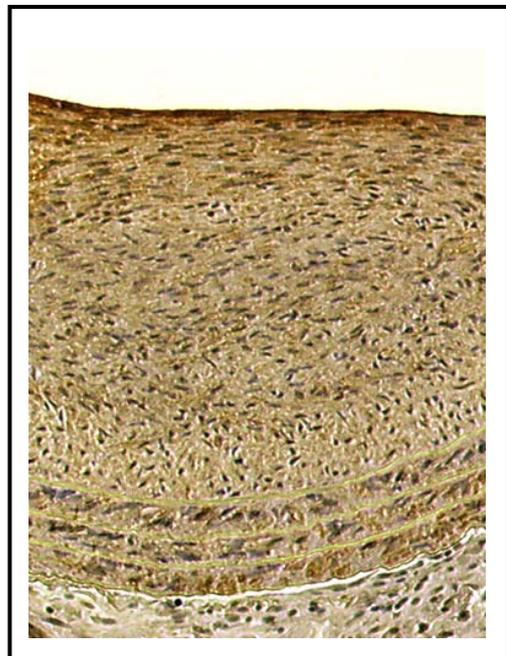


Abb. 24:
Immunhistochemischer Nachweis von sm α -Actin (Braunfärbung) in medialen und neointimalen glatten Muskelzellen Tag 42 nach Ballonkatheterverletzung.

Zum Nachweis, dass es sich bei den Neointimazellen tatsächlich um Zellen handelt, die Muskelfasern enthalten und somit von den Muskelzellen der Media invadiert sind, erfolgte immunhistochemisch der Nachweis von smooth muscle (sm) alpha-Actin (Abb. 19 bis 22).

4.3 Histomorphometrische Analysen am Gefäßquerschnittspräparat

4.3.1 Veränderung der Tunica media nach Ballonkatheterverletzung

Wie eingangs im Methodenteil beschrieben, wurden die Sprague-Dawley-Ratten nach der Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis entweder nicht behandelt oder nur mit der Trägersubstanz Pluronic Gel oder zusätzlich mit den Substanzen PD098059 200 μM oder mit SB203580 60 μM bzw. mit beiden Substanzen zusammen (PD098059 200 μM und SB203580 60 μM).

Abb. 25

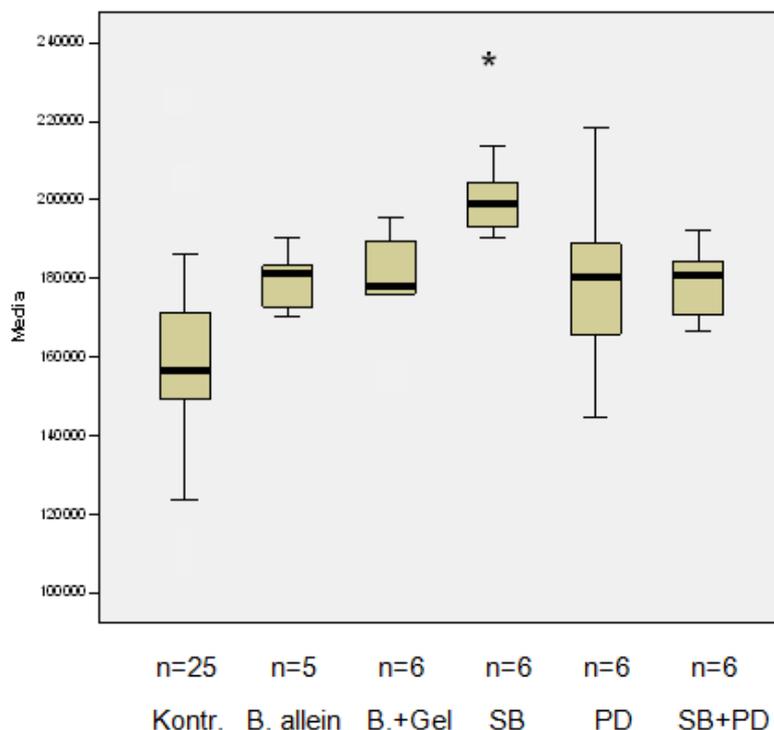
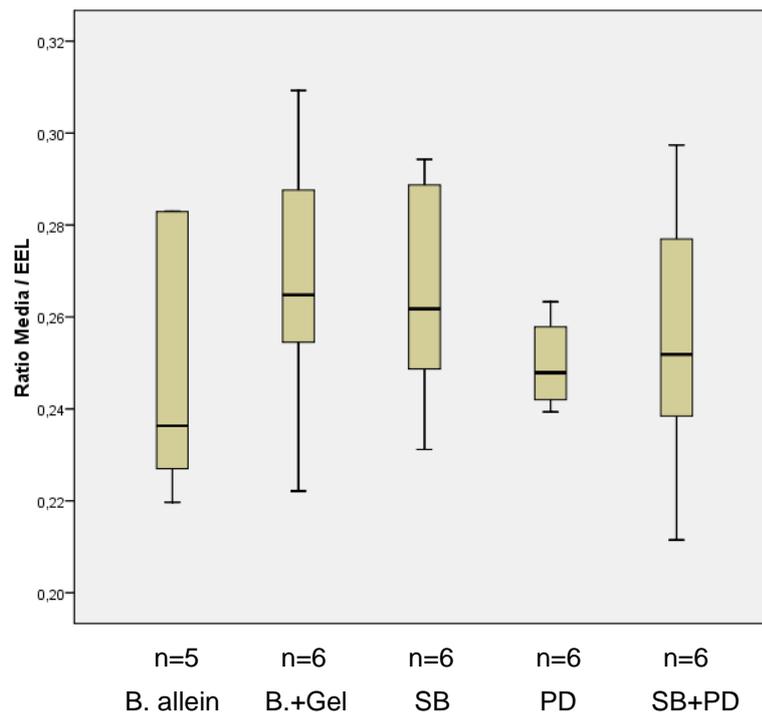


Abb. 25:

Tunica media in μm^2 in nichtoperierten Kontroll-ACC und den aufgeführten Therapiegruppen 14 d nach Ballonkatheterverletzung. * $p=0,0104$ (SB203580 versus B.+Gel). Bei diesem und den folgenden Box Plots stellen die dicken Balken den Median dar, die Boxen beinhalten 50% aller gemessenen Werte und die oben und unten liegenden Begrenzungen markieren die höchsten bzw. tiefsten Werte. Kontr. = Kontrollarterie, B. allein = Ballonkatheterverletzung allein, B.+Gel = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel, SB = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit SB203580, PD = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit PD098059, SB+PD = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit SB203580 und PD098059.

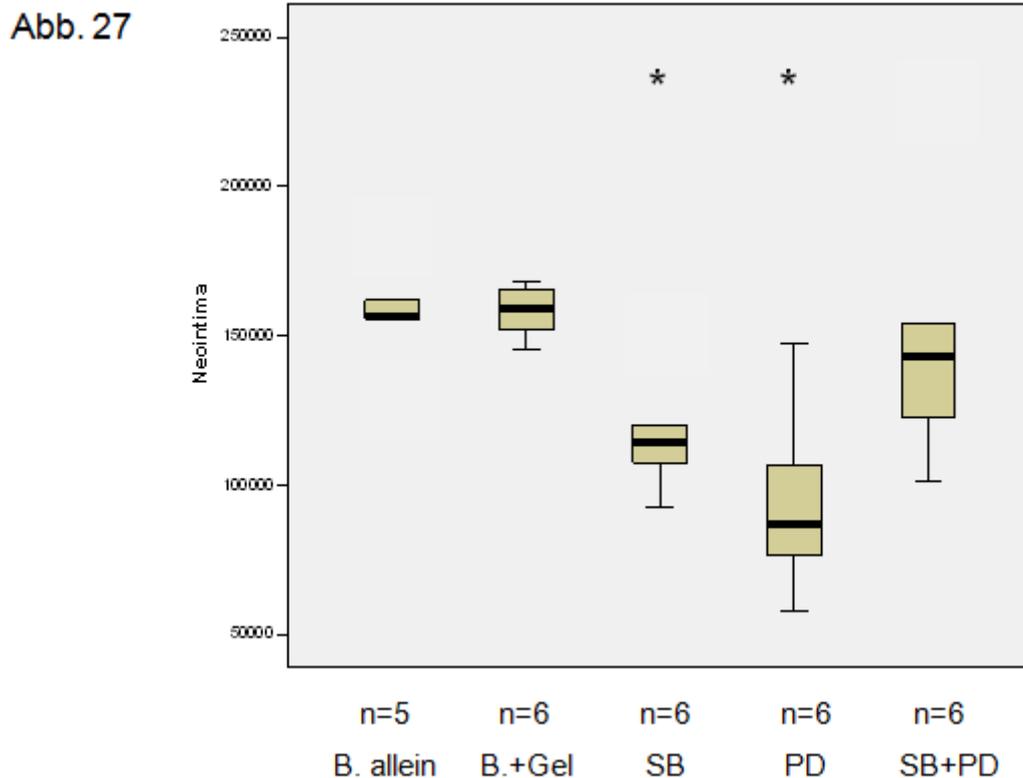
In Abb. 25 erkennt man eine stark variierende Fläche bezüglich der Media von knapp über 12.000 μm^2 bis zu fast 22.000 μm^2 . Signifikant vergrößert ist in dieser Abbildung nach der Verletzung die Media der Tiere, die mit SB203580 therapiert wurden. Stellt man die gemessenen Flächen jedoch in Bezug zur Lamina elastica externa (LEE; siehe Abb. 26) des gleichen Tieres, so nivellieren sich die anfänglichen Unterschiede wieder. Die allgemeine Mediahypertrophie bleibt in allen operierten Gruppen vorhanden, während nun aber kein Unterschied durch vermehrte Mediahypertrophie in der mit SB203580 therapierten Gruppe nachweisbar ist. Dies macht deutlich, wie wichtig die Bildung von Quotienten der Werte des gleichen Tieres ist.

Abb. 26

**Abb. 26:**

Quotient aus Tunica media und EEL in den aufgeführten Therapiegruppen 14 d nach Ballonkatheterverletzung. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. B. allein = Ballonkatheterverletzung allein, B.+Gel = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel, SB = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit SB203580, PD = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit PD098059, SB+PD = Ballonkatheterverletzung plus Pluronic Gel mit SB203580 und PD098059.

4.3.2 Betrachtungen der Neointima nach Ballonkatheterverletzung

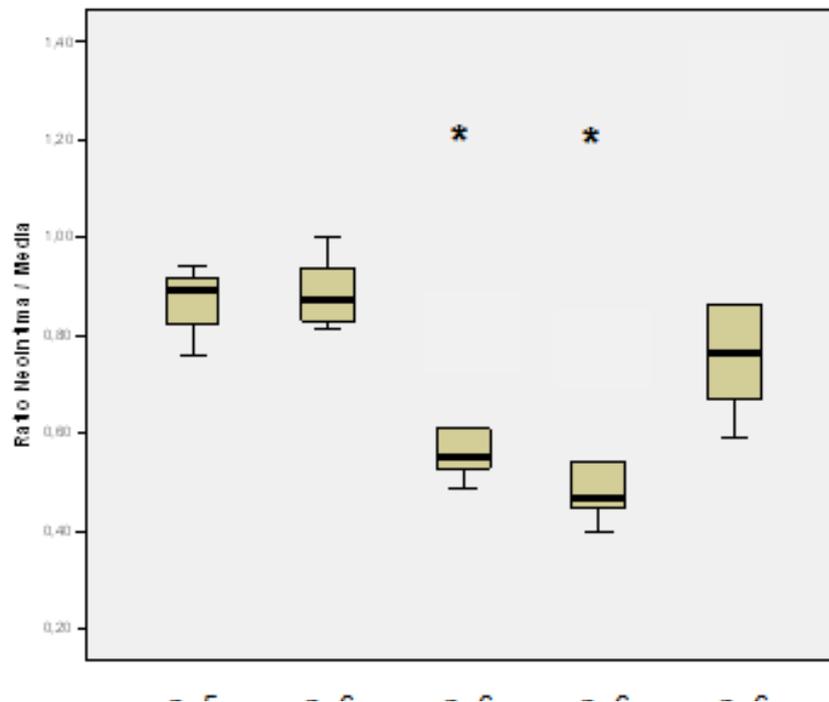
**Abb. 27:**

Neointima in μm^2 in den aufgeführten Therapiegruppen 14 d nach Ballonkatheterverletzung.

* $p=0,0065$ (SB203580 versus B.+Gel) und * $p=0,0065$ (PD098059 versus B.+Gel).

In der Abbildung 27 ist dargestellt, wie sich die Neointimabildung zwei Wochen nach dem Ballonkathetermanöver verhält. Zunächst wird konstatiert, dass sich kein Unterschied zwischen lediglich ballondilatierten und solchen, die ballondilatiert und mit der Trägersubstanz Pluronic Gel behandelt wurden, darstellt. Somit konnte ein Einfluß der Trägersubstanz Pluronic Gel auf die Neointimaformation und die Mediaproliferation ausgeschlossen werden. Signifikant verringert ist die Neointima bei den Behandlungsgruppen, welche mit SB203580 und mit PD098059 therapiert wurden. Unerwartet ist, dass dieser „positive“ Effekt bei den Tieren, die mit beiden Substanzen gleichzeitig therapiert wurden, zum größten Teil wieder aufgehoben wurde. Anders als erwartet wurde bei dieser Therapiegruppe eine deutlich weniger verminderte Neointimaproliferation im Gegensatz zu den durch die Einzelsubstanzen behandelten Tieren verm nur durch Neointimareduktion und nicht durch allgemeine Vergrößerung

Abb. 28

**Abb. 28:**

Quotient aus Neointima und Tunica media in μm^2 in den aufgeführten Therapiegruppen 14 d nach Ballonkatheterverletzung. * $p < 0,05$ (SB203580 versus B.+Gel und PD098059 versus B.+Gel).

In Abbildung 28 ist der Quotient aus Neointima und Tunica media gebildet und vergleichend dargestellt (Neointima:Media-Ratio). Die Behandlungsgruppen entsprechen denen aus der vorherigen Abbildung. Dieser Quotient gleicht ebenso wie die anderen gebildeten Quotienten Größenunterschiede wieder aus, in dem der Quotient der Media und Neointima einer ACC eines Tieres dem Quotienten eines anderen Tieres, welches unter Umständen kleiner war, gegenübergestellt wird und somit der Größenunterschied nivelliert wird. Somit können Differenzen durch unterschiedliche Größe (entweder der Tiere selbst oder der ACC, welche nach der Fixation mal mehr und mal weniger „zusammengeschnürt“ sein können oder auch Anschnittsphänomene durch schräges Einbetten / Schneiden bei der Histologie) angeglichen werden. Die Ergebnisse entsprechen denen aus der vorherigen Abbildung mit Darstellung eines deutlich verbesserten Quotienten.

4.3.3 Veränderungen in Bezug auf das Lumen nach Ballonkatheterverletzung

Schaut man sich die Ergebnisse bezüglich des Lumens in Abbildung 29 an, so sind deutlich Unterschiede zu verzeichnen, welche jedoch in dieser Abbildung zunächst nicht statistisch signifikant sind.

Abb. 29

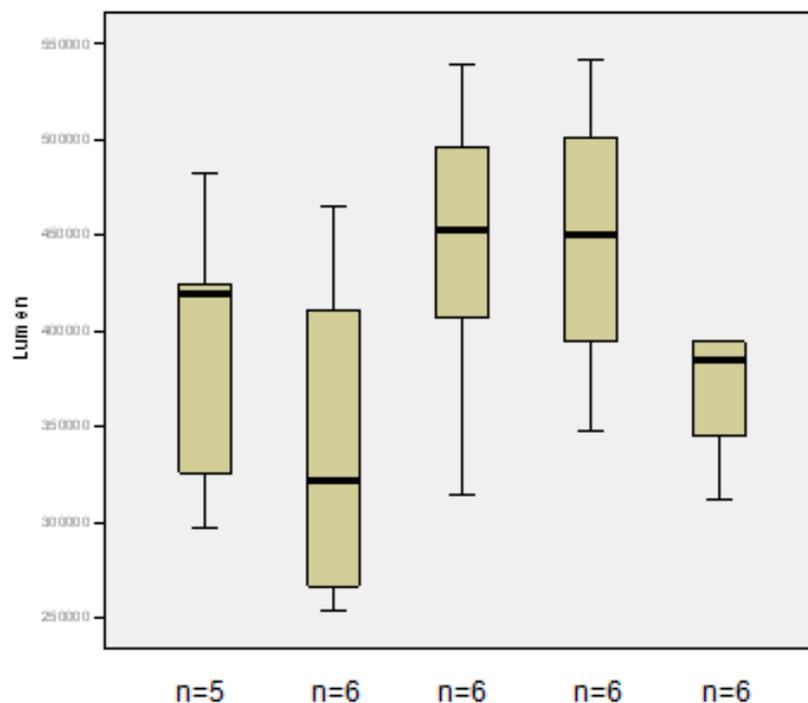


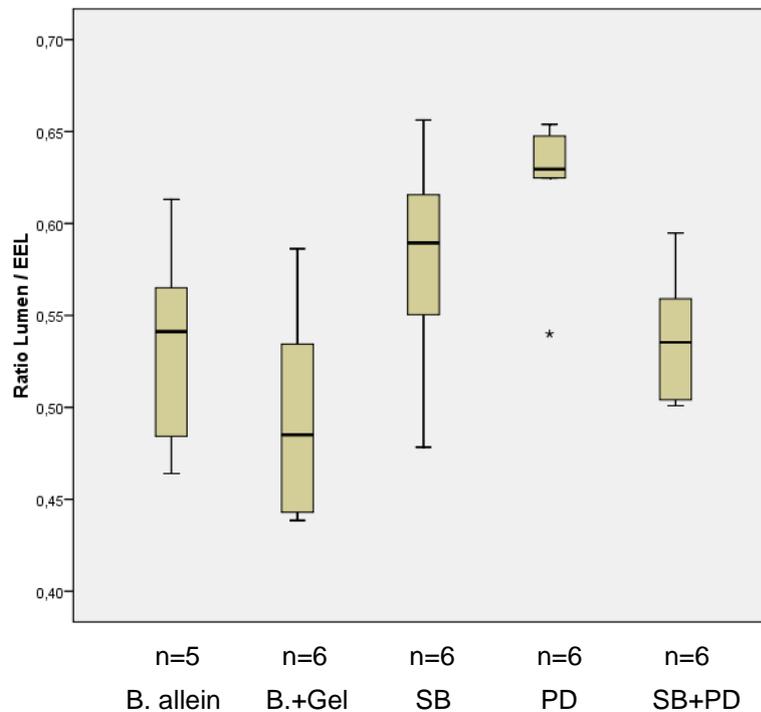
Abb. 29:

Lumen in μm^2 in den aufgeführten Therapiegruppen 14 d nach Ballonkatheterverletzung.

Insgesamt ist die für das Lumen berechnete Spannweite von 25.000 μm^2 bis 55.000 μm^2 sehr groß und wohl auch zusammen mit der geringen Anzahl an Tieren dafür verantwortlich, dass kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war. Dennoch erkennt man einen Trend im Sinne eines vergrößerten Lumens bei den mit SB203580 und mit PD098059 therapierten ACC, was mit den vorher gezeigten Ergebnissen einer Neointimareduktion für einen Therapieerfolg spricht. Kombiniert man diese Ergebnisse mit denen aus Abbildung 28, so lässt sich daraus schließen, dass die Lumenvergrößerung nur durch Neointimareduktion und nicht durch allgemeine

Vergrößerung der Gefäße erreicht wurde, da die Tunica media gleich groß war, als bei den Tieren, die keine Wirkstofftherapie erfahren hatten.

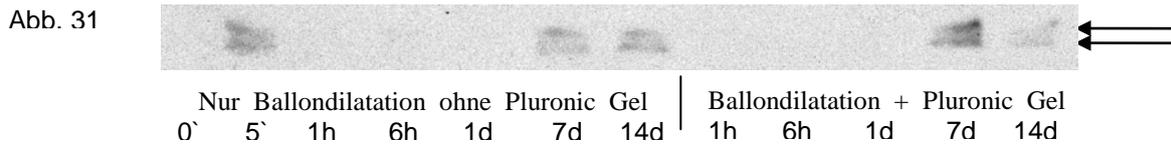
Abb. 30



In der Abbildung 30 sind nun die die Ergebnisse zu sehen, die nach Bildung des Quotienten aus Lumen und Lamina elastica externa zustande gekommen sind. Insbesondere kann ein statistisch relevanter Effekt auf das Lumen der mit PD098059 behandelten Tiere konstatiert werden (* $p < 0,004$). Aber auch in der mit SB203580 behandelten Gruppe ist ein Trend zur Lumenvergrößerung zu erkennen (* $p < 0,041$).

4.3.4 Western blots nach Ballonkatheterverletzung

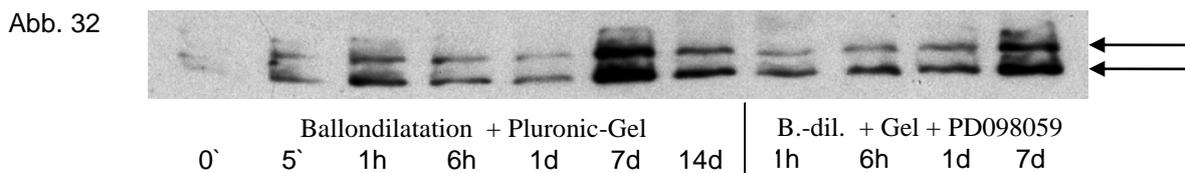
Nachdem die Ballonkatheterverletzung an den ACC der Ratten durchgeführt wurde, wurden neben der Durchführung der Histomorphometrie auch proteinchemische Untersuchungen angeschlossen. Über den Proteinnachweis von p42/44 mittels Antikörper-Detektion konnte eine Stimulation durch die Trägersubstanz Pluronic Gel ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 31).

**Abb. 31:**

Western blot. Dargestellt ist die Phosphorylierung mit einem p42/44-Antikörper bei ballondilatierten ACC zu den dargestellten Zeitpunkten. Die Pfeile markieren 42 bzw. 44 kD.

Hier wurde, wie bereits aus den in vitro-Versuchen bekannt, ein sehr früher Nachweis der phosphorylierten MAP-Kinase registriert. Es fällt eine frühe Phosphorylierung nach bereits fünf Minuten auf, während in den Proben nach 1 Stunde, nach 6 Stunden und nach 1 Tag keine verstärkte Phosphorylierung nachgewiesen wurde, und schließlich eine erneute starke Phosphorylierung nach sieben und vierzehn Tagen. Hierbei kann kein wesentlicher Einfluss von Pluronic Gel (spätere Trägersubstanz für PD098059 bzw. SB203580) gesehen werden. (siehe Abbildung 31).

Zum Vergleich ist in Abbildung 32 aufgezeigt, wie sich die Konzentration von ERK1/2 bei ballondilatierten Rattenkarotiden mit dem Vehikel Pluronic Gel im Gegensatz zu den ACC verhält, die mit PD098059 therapiert wurden. Auffällig war hier erneut die besonders frühe Phosphorylierung nach bereits fünf Minuten und ein erneuter starker Anstieg nach sieben Tagen.

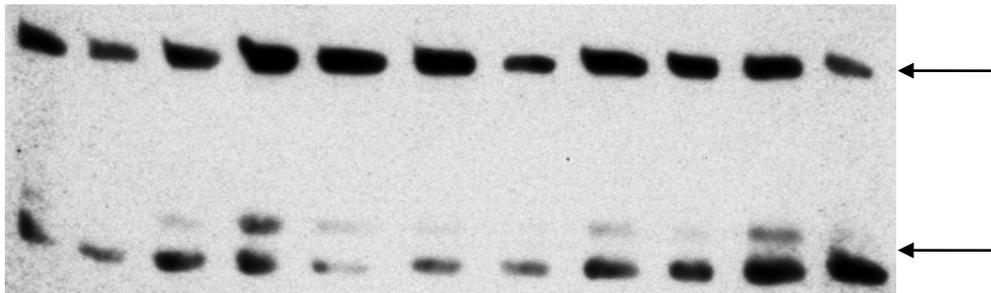
**Abb. 32:**

Western blot. Dargestellt ist die Phosphorylierung von ERK1/2 mit einem p42/44-Antikörper. Aufgetragen sind die Proben von ballondilatierten ACC zu den jeweiligen genannten Zeitpunkten nach der Operation. Links ist die Phosphorylierung bei lediglich mit Pluronic-Gel behandelten Tieren dargestellt, rechts zusätzlich mit PD098059. Die Pfeile markieren 42 bzw. 44 kD.

Sehr deutlich konnte jedoch der Unterschied in der Ets-1-Konzentration zwischen den mit PD098059 therapierten Rattenkarotiden und denen, die ohne Wirkstoff operiert

wurden, gesehen werden. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die einzelnen Therapiegruppen direkt einander gegenübergestellt, wie in Abbildung 33 zu sehen. Dass der Unterschied bereits nach sechs Stunden deutlich hervortritt, ist erstaunlich. Die lang anhaltende Hemmung des Ets-1, welche noch nach 14 Tagen zu vermerken ist, könnte trotz der einmaligen und lokalen Applikation für eine anhaltend lange Wirksamkeit des MAP-Kinase-Inhibitors sprechen.

Abb. 33



0 | 1h | 1h | 6h | 6h | 1d | 1d | 7d | 7d | 14d | 14d
 | | +PD | | +PD | | +PD | | +PD | | +PD

Abb. 33:

Western blot mit Ets-1-Antikörper. Ganz links eine Kontrolle sofort nach Ballondilatation (innerhalb 1 min). Dann sind jeweils nebeneinander 2 Proben des gleichen Zeitraums nach Ballonkatheterverletzung aufgetragen, um einen direkten Vergleich zu bekommen. Die linke ist jeweils von Tieren, welche lediglich das Pluronic-Gel appliziert bekamen, bei der rechten Probe wurde zusätzlich PD098059 hinzugefügt. Oberer Pfeil: 50 kD, unter Pfeil: 29 kD. Ets-1 entspricht der Bande oberhalb des 50 kD Proteinmarkers.

5. DISKUSSION

5.1 Anmerkungen zur Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis der Ratte

Morphologische Veränderungen an, in und um die A. carotis communis (ACC), die durch die Operation stattfinden und dadurch Einfluss auf die ACC haben, seien im Folgenden aufgezeigt. Hierbei gilt es, zu beachten, dass z. B. die PTA und die PTCA rein transluminale Eingriffe darstellen und die Ballonkatheterverletzung im Rattenmodell ein kombinierter transluminaler und offen chirurgischer Eingriff ist.

Zunächst wurde das Gefäß freigelegt und die Adventitia dadurch vom umliegenden Gewebe getrennt. Ein Austrocknen der Adventitia durch die Länge der OP musste unbedingt durch intermittierendes Benetzen mit 0,9 %igem NaCl verhindert werden, ansonsten hätte dies einen weiteren Effekt hervorrufen können. Die Freilegung der Arterien hatte höchstwahrscheinlich die Beschädigung von kleinsten Nerven und Vasa vasorum, welche das Gefäß direkt versorgten, zur Folge. Also ist postoperativ eine veränderte Gefäßwanddurchblutung und ein veränderter Gefäßtonus durch partielle Denervierung mit entsprechenden Folgen zu befürchten. Außerdem sind Effekte einer Adventitiaschädigung (mit Fibroblasteninvasion inklusive Narbenbildung) in Bezug auf Remodeling und Produktion extrazellulärer Matrix vielfach vorbeschrieben (Miller, FJ Jr., 2001 oder Deiner C et al., 2005 oder Andersen HR et al., 1996).

Bei Entnahme der Arterien zum Tötungszeitpunkt fiel, je nach Zeitpunkt, eine mehr oder weniger ausgeprägte narbige Umwandlung der Adventitia auf. Diese narbige Umwandlung war nach zwei Wochen bereits so stark ausgeprägt, sodass man von einem konstriktiven Effekt auf das Gefäß ausgehen musste. Unabhängig von den direkten morphologischen Veränderungen wird die Narbenbildung bzw. der perivasale Heilungsprozess durch verschiedenste freigesetzte Mediatoren begleitet, die sekundär Einflüsse auf die ACC haben könnten. Diese von außen bedingten Veränderungen würden bei einem rein transluminalen Eingriff nicht in dem Maße hervorgerufen werden. Leider war eine morphologische Auswertung der adventitialen Veränderungen der jeweiligen Behandlungsgruppen aufgrund der teils erheblichen Entnahmeartefakte, welche ausschließlich die Tunica adventitia betrafen, nicht möglich. Hier wurde nämlich z. T. die Adventitia entfernt, da diese postoperativ narbig mit der Umgebung

verwachsen war. Eine quantitative oder sonstige morphologische Beurteilungen wären also nur am *en-bloc*-Präparat möglich gewesen.

Die ACC wurde durch einen kurzfristigen Längszug des sie umschlingenden Fadens (siehe Abb. 21) um ca. 15 % ihrer Länge gedehnt. Diese unphysiologische Dehnung könnte mitverantwortlich sein für eine Muskelzellproliferation der Media im Stadium 1, wie sie bereits in der Einleitung beschrieben wurde. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen von Hu et al gestützt, welche nachwiesen, dass in vivo bereits lediglich eine Längsdehnung der ACC der Ratte um 10% bis 15% ohne weitere Manipulation zu einer signifikanten schnellen ERK-Aktivierung führte (Hu Y et al., 1997) und dass auch ein shear-stress von VSMC in vitro den gleichen Effekt hatte.

Die Ballonkatheterverletzung führte schließlich zur Endotheldenudierung und zu einer weiteren Dehnung der Arterienarchitektur, diesmal in Querrichtung (siehe Abb. 4a-4c). Es sei noch mal darauf hingewiesen, dass die Intima der ACC der Ratte keine Muskelzellen enthält, wie die Intima des menschlichen Herzkranzgefäßes. Somit ist die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in die Intima (Stadium 2) ein Schritt, der so nur im verletzten Gefäß der Ratte stattfindet.

Nach Abschluss der Ballonkatheterverletzung floss das Blut durch die ACI, da die ACE unterbunden war. Postoperativ war die ACC makroskopisch weitergestellt, als in ihrem präoperativen Zustand. Theoretisch könnte durch die Dehnung der Arterie und die daraus resultierende Lumenvergrößerung einerseits, durch die veränderte Gefäßinnenfläche nach Endotheldenudierung und durch die veränderten Abstromverhältnisse durch Gefäßunterbindung der ACE andererseits, der Blutstrom (Blutdruck, Blutflußgeschwindigkeit, Laminarfluß) innerhalb der ACC verändert gewesen sein.

Die unterschiedliche Neointimabildung mit teils exzentrischem Wachstum ist eventuell auf eine nicht ganz gleichmäßige Endotheldenudierung oder auf eine exzentrisch verstärkte Media-Dehnung zurückzuführen. Höchstwahrscheinlich ist dies in der Konstruktion des Ballonkatheters zu begründen, der sich beim Inflatieren nicht ganz gleichmäßig entfaltet. Eine interventionsbedingte Unterbrechung der LEI hätte diesen unterschiedlichen Proliferationsbeginn ebenfalls hervorrufen können, obwohl lichtmikroskopisch nie eine komplette Unterbrechung zu beobachten war. Betrachtet man jedoch die elektronenmikroskopischen Beobachtungen an Rattenkarotiden (Pinto, 1998), in denen man eine Migration von Muskelzellen durch die intakte LEI beobachtet

hat, so kann man sich schon eine vermehrte Migration durch eine LEI vorstellen, welche durch die Ballonkatheterverletzung zusätzliche Einrisse und Lücken aufweist (siehe auch Indolfi C et al., 2002). Das hieße, dass nicht nur die katheterbedingte Endotheldendudierung an sich verantwortlich für das Ausmaß an Neointimaproliferation wäre, sondern auch, dass eine Korrelation der Neointimaproliferation mit dem Ausmaß der Schädigung der LEI bestünde.

Ineressant war die lichtmikroskopische Beobachtung der Form der Neointimazellen, welche sich lumannah länglich anschmiegen und nahe der LEI kugelig mit chromatinreichem Kern und auch deutlich größer imponierten. Aufgrund dessen lag die Vermutung nahe, dass die andauernde Proliferation der neointimalen Muskelzellen hauptsächlich von der lumenfernen Schicht nahe der LEI ausging und nicht vom Lumen aus. Bei einer Wirkstoffapplikation impliziert dies den Vorteil einer endoluminalen Applikation, da hier der Wirkstoff initial im Bereich des maximalen Proliferationsareals einwirken könnte.

5.2 Ist der beobachtete Effekt der Neointimareduktion hämodynamisch relevant?

Nach dem Hagen-Poiseuill'schen Gesetz hängt der Volumendurchfluß einer viskösen Flüssigkeit durch ein rundes Rohr oder eine Kapillare von vielen Faktoren ab, wobei vor Allem der Radius in der vierten Potenz maßgeblich die Strömungsgeschwindigkeit und das pro Zeiteinheit durchfließende Volumen bestimmt. So führt zum Beispiel innerhalb einer Kapillare eine Verengung um 10% bereits zu einem Durchzugrückgang von 34%. Um eine distal der Stenose gelegene äquivalente Nährstoffversorgung zu gewährleisten, müsste der Blutdruck um 52% gesteigert werden (Bruus H, 2008). Bereits geringe Lumeneinengungen rufen also deutliche negative hämodynamische Effekte hervor.

Die Neointimabildung konnte in dieser Arbeit im Vergleich zu den lediglich mit Pluronic Gel behandelten Tieren vierzehn Tage nach der Ballonkatheterverletzung mittels der Therapie von PD098059 um 44,19% reduziert werden. Die Therapie mit SB203580 bewirkte eine Reduktion der Neointima um 32,56%. Gleichzeitig wurde das Lumen bei der Therapie durch PD098059 im Vergleich mit der Kontrollgruppe um 31,25% ($p < 0,041$) vergrößert und durch SB203580 um 20,83% vergrößert (bei SB203580 allerdings statistisch nicht relevant mit $p < 0,247$).

Die durchgeführten Untersuchungen wiesen die Effekte jedoch zwei Wochen nach der Operation nach. Somit sind abschließende Beurteilungen bezüglich der hämodynamischen Relevanz nur eingeschränkt beurteilbar. Vorausgesetzt, das Langzeitergebnis bliebe so günstig, wie es die Untersuchungen nach zwei Wochen zeigen, so wäre hämodynamisch ein sehr deutlicher und relevanter positiver Effekt für beide Substanzen bei der Monoapplikation zu verzeichnen.

5.3 Vergleichende Betrachtung von Dosis und Applikationsform von SB203580 und PD098059

Die Applikation des Pluronic Gel ohne und mit den darin enthaltenen Wirkstoffen erfolgte operationssynchron von extern auf die ACC der Ratte direkt nach Abschluß der Ballonkatheterverletzung. Dies hatte den Vorteil, dass die Kosten niedrig gehalten wurden (keine Notwendigkeit eines teuren Doppelballonkatheters zur lokalen intraluminalen intraarteriellen Applikation und Applikation von relativ wenig des teuren Wirkstoffes). Ebenfalls war die Operationszeit im Vergleich zu aufwendigen Prozeduren verkürzt, da die Applikation innerhalb von wenigen Sekunden abgeschlossen war. Im Vergleich zu einer intravenösen oder intraarteriellen Injektion konnte durch das adventitielle Auftragen eines inerten Gels eine lange lokale Wirksamkeit erreicht werden. In allererster Linie konnten aber die Dosis der aufgetragenen Substanz und die damit verbundenen Nebenwirkungen niedrig gehalten werden. Für PD098059 lag die Konzentration des einmalig applizierten Gels bei 200 μM in 0,1 ml Pluronic Gel und für SB203580 bei 60 μM in 0,1 ml Pluronic Gel. Dies entspricht einer Dosis von etwa 8 nM pro kg KG für PD098059 und 2,4 nM pro kg KG für SB203580 als einmalige Applikation, unter der Voraussetzung eines durchschnittlichen KG einer Ratte von 400 g. In der Dissertationsschrift der Kollegin Maike Fahrenholz von 2008 aus dem gleichen Institut konnten toxische Effekte zumindest für PD098059 in Zellkulturexperimenten für diese Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die Applikationsformen von verwandten Modellen, so wird der Konzentrationsunterschied evident: z. B. setzten Gennaro et al. PD098059 mittels intraarterieller Infusion bei Ballonkatheterverletzung von Iliakalarterien bei Kaninchen in einer Konzentration von 500 μg pro Tier ein, was bei einem Gewicht von geschätzten 4

kg einer Konzentration von etwa 500 nM / kg KG entsprechen würde und somit 62,5-fach höher war als in dieser Arbeit präsentiert (Gennaro G et al., 2003). Allerdings handelte es sich um eine andere Spezies mit unterschiedlicher Beschaffenheit des behandelten Gefäßes. In einer anderen Studie erfolgte die orale Applikation von 200 mg/kg KG eines weiteren MEK1/2-Inhibitors PD0185625, bei der nach Ballonkatheterverletzung von ACC in Ratten eine Reduktion der Neointima erzielt wurde (Gennaro G et al., 2004). Hier wurde zwei Tage vor der Ballonkatheterverletzung mit der Therapie begonnen. Geringe Informationen über pharmakologische Daten erschweren es allerdings, tatsächliche Wirkstoffeffekte von z. B. toxischen Effekten zu unterscheiden.

Der p38-Inhibitor SB203580 wurde bisher nicht in vergleichbaren Studien verwandt, in denen Ballonkatheterverletzungen stattfanden, jedoch bei anderen Indikationen in Bezug auf Inflammation. So zum Beispiel setzten Badger et al. oral applizierte Konzentrationen zwischen 30 und 60 mg /kg KG (entspricht in etwa 79 – 158 µM) bei Ratten ein, um erfolgreich Arthritis und Folgen eines Endotoxinschocks zu therapieren (Badger AM et al., 1996). Deutlich geringere Dosen wurden durch Westermann et al. bei diabetisch induzierten Mäusen verwandt, um diabetischer Kardiomyopathie vorzubeugen (Westermann D et al., 2006). Hier erhielten Mäuse oral 1 mg / kg KG tgl. (entspricht in etwa 26 µM) über acht Wochen. Eine weitere Studie zur Inhibierung der Colitis bei Mäusen führte tägliche intraperitoneale Injektionen mit 1 µM SB203580 durch (ten Hove et al., 2002). Andere in vivo-Studien an Ratten verwendeten vergleichbare Konzentrationen zwischen 5 und 20 mg/ kg KG (Slomiany BL et Slomiany A, 2001).

Die in dieser Promotion verwandten einmalig applizierten Wirkstoffkonzentrationen waren im Vergleich mit bekannten in vivo-Arbeiten besonders niedrig. In der Dissertationsschrift von Meike Fahrenholz aus dem gleichen Institut wurde der Nachweis einer Proteinsuppression der MEK1/2 in einem ähnlichen Modell beschrieben. Hier wurden ebenfalls morphologische in vitro-Untersuchungen bezüglich zytotoxischer Effekte von PD098059 durchgeführt, welche bis zu einer Konzentration von 50 µM keine nachweisen konnten. Die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffkonzentrationen lagen deutlich hierunter. Daher stellten die Minimierung systemischer unerwünschter Wirkungen bei gleichzeitigem Beweis einer Wirksamkeit der

Substanzen in niedrigen Wirkstoffkonzentrationen einen wesentlichen Teil dieser Arbeit dar.

5.4 Überlegungen zum paradoxen Ergebnis der geringeren Neointimahemmung bei der Kombination der Substanzen PD098059 und SB203580

Die alleinige lokale Verabreichung von PD098059 und von SB203580 konnte jeweils nachweislich die Neointimaformation supprimieren. Die Kombination dieser beiden Substanzen hat diesen positiven Effekt allerdings zum Teil wieder aufgehoben. Dieser Effekt trat unerwartet ein und lässt Raum für Spekulationen. Möglicherweise fand eine chemische Reaktion beim Durchmischen der beiden Substanzen statt. Eventuell kam es auch zu einer physikalischen Interaktion, zum Beispiel einer Ausfällung bei Vermengung im Gel oder nach dem Auftragen auf die ACC. Hierüber gibt es in der Literatur keine Daten. Jedoch wurde in keiner Arbeit, in der die beiden Substanzen kombiniert wurden, über chemische und oder physikalische Inaktivierung irgendeiner Art berichtet (so z. B. Kutsuna H et al., 2004). Ungleich interessanter wäre es, wenn weder chemische Reaktionen noch physikalische Interaktionen der Grund für das „Therapieversagen“ wäre, sondern vielmehr die Vermutung, dass der hemmende Effekt der Monosubstanzen der erhaltenen Funktionalität anderer Kinasen bedarf. Sprich: damit PD098059 eine Proliferations- und Migrationshemmung von VSMC bewirken kann, müssten andere Kinasen aktiv bleiben und gleiches gilt für die pharmakologische Inhibition durch SB203580. Die wenigen hierzu existierenden Arbeiten (s. u.), die eine Kombination der Substanzen SB203580 und PD098059 anwandten, sprechen allerdings gegen diese Theorie.

Dennoch kann eine medikamentös ausgerichtete Kombination von MAP-Kinase-Inhibitoren und / oder anderen Signaltransduktionsinhibitoren sinnvoll sein. So konnte in vitro bei humanen neutrophilen Granulozyten, die mittels TNF-alpha oder GM-CSF stimuliert wurden und zum Einen eine Depolymerisation ausbildeten und zum Anderen morphologische Veränderungen erfuhren, die alleinige Gabe von SB203580 (10 µM) oder PD098059 (50 µM) nur eine partielle Reduktion hervorrufen, während die Kombination der beiden Substanzen eine komplette Unterbindung der negativen Stimulationseffekte bewirken konnte. Interessant waren die Ergebnisse bei Untersuchungen von VSMC unter Stimulation mit oxidierten LDL in vitro (Modell zur

Entstehung der Atherosklerose, u. A. durch Monozytenrekrutierung und Schaumzellbildung). Hier erfolgte eine alleinige Präinkubation mit PD098059 oder SB203580 und auch die kombinierte Präinkubation in der Zellkultur. Zum Einen wurden auch bei hohen Dosen (allein bis zu je 30 μM und kombiniert bis zu je 10 μM) keine zytotoxischen Effekte gesehen. Zum Anderen wurden keine chemischen und / oder physikalischen Interaktionen beschrieben. Während die Mono-Applikation der Substanzen jeweils die mitogenen Effekte der Stimulation unterbinden konnten, wies die Kombination der beiden Substanzen ebenfalls einen dosisabhängigen synergistischen Effekt auf. Auffällig war auch, dass durch höhere Dosen von SB203580 (ab 30 μM) eine geringere Phosphorylierung von p42/44 nachzuweisen war (Yang CM et al., 2001). Es konnte zum Beispiel auch die Proliferations- und Apoptoserate in Brustkrebszellen in vitro durch Kombination des EGFR-Thyrosinkinase-Inhibitors Gefitinib (IRESSA®) mit PD098059 deutlich gesteigert werden (Normanno N et al., 2006). Diese Befunde unterstützen die These, dass erstens dosisabhängige Interaktionen innerhalb der MAPK-Kaskaden stattfinden, dass zweitens sowohl die p38-Kinase, als auch ERK1/2 bei der Migration und Proliferation von VSMC wichtige Signalschritte vermitteln und drittens dass unter bestimmten Umständen eine Kombination von SB203580 und PD098059 in der Atherosklerose-Therapie sinnvoll sein kann. Schlussfolgernd könnte der in dieser Arbeit beschriebene unerwartete Effekt des Ausbleibens einer Neointimareduktion durch Kombination von PD098059 und SB203580 eventuell ein dosisabhängiges Phänomen sein aber auch ein statistisches Artefakt bei geringer Gruppengröße.

5.5 Kann das angewandte Tiermodell auf den Menschen übertragen werden?

Die ACC der Ratte gehört zum elastischen Typ, während die Koronararterie des Menschen den muskulären Arterien zuzuordnen ist. Bei den Ratten handelte es sich um junge, gesunde, weder genetisch belastete noch durch äußere Faktoren beeinflusste Tiere. Bei KHK- bzw. pAVK-Patienten handelt es sich jedoch in der Regel um ältere Patienten, die Begleiterkrankungen und Risikofaktoren aufweisen (Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes). Insgesamt erscheint nur eingeschränkt eine Vergleichsmöglichkeit vorhanden.

Entscheidend ist die Frage, ob die in dieser Arbeit bei Mono-Applikation bewiesene durch PD098059 und durch SB203580 vermittelte Neointima-Inhibition in der ACC der Ratte eine Restenose auf dem Boden einer vorbestehenden Plaque-Läsion bzw. eine in-stent-Restenose beim Menschen verhindern könnte. Diese Frage lässt sich letztendlich nur durch klinische Studien am Menschen beantworten. Dennoch soll hier versucht werden, eine Erklärung zur Übertragbarkeit zu finden.

Bezüglich einer MAP-Kinase-Inhibition gibt es einige Tierversuchsmodelle, bei denen einzelne Risikofaktoren vorlagen beziehungsweise in denen vorbestehende Gefäßläsionen bestanden. So wurde zum Beispiel in Zellkulturen von VSMC aus mesenterialen Arterien bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu einem normotensiven Rattenstamm unter Angiotensin II-Stimulation bei beiden Modellen eine Zunahme der p38- und ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet (in den SHR dreifach höher), welche mit vermehrter Kollagensynthese und VSMC-Proliferation einherging. Hierbei spiegelt Kollagen einen Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix wieder und gemeinsam mit der Proliferation von VSMC stellen sie das Risiko des Remodelings unter Hypertension dar. Die SHR wiesen unter Angiotensin II-Stimulation deutlich höhere Konzentrationen phosphorylierter p38- und ERK1/2-Kinasen auf und konnten bei Blockade durch PD098059 in den SHR sowohl die Kollagensynthese senken, als auch die VSMC-Proliferation attenuieren. Der p38-Kinase-Inhibitor SB212190 hatte lediglich einen Effekt in Bezug auf die Kollagensynthese der SHR, nicht jedoch auf die Proliferation und nicht bei normotensiven Tieren (Touyz RM et al., 2001).

In mit Fructose gefütterten LDL-Rezeptor-defizienten Ratten konnte in atherosklerotischen Läsionen (überwiegend bestehend aus Makrophagen) und in der Neointima (überwiegend bestehend aus VSMC) der Aorta 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung eine TNF- α -induzierte ERK-Aktivierung nachgewiesen werden, welche mit einer gesteigerten Expression der Transkriptionsfaktoren Ets-1, Egr-1 und c-fos verbunden war (allerdings Koexpressionsanalysen an Geweben). Diese Steigerung ließ sich in Zellkulturexperimenten der atherosklerotischen und neointimalen Zellen mittels PD098059 signifikant inhibieren (Goetze S et al. 2001). Im Zusammenhang mit der beschriebenen MAPK-Kaskadenaktivierung der Arterienwand bei arterieller Hypertension (Xu Q et al., 1996 und Tsuda Y et al., 2002) wird eine Rolle in Bezug auf Muskelzellproliferation und Remodelung deutlich. Jedoch existiert bisher

noch kein Tiermodell, in dem eine Neointimasuppression der koronaren Atherosklerose durch PD098059 und / oder SB 203580 vermittelte Inhibition gezeigt werden konnte.

Bei Menschen führt eine altersabhängig gesteigerte Proliferation von VSMC in Koronararterien und peripheren arteriellen Gefäßen zu einem höheren Schweregrad der Atherosklerose (Folkow B et al., 1993). Gleichermäßen ist eine altersabhängig gesteigerte Muskelzellproliferation nach Ballonkatheterverletzung in der Ratte gezeigt (Stemermann MB et al., 1982). Die Gruppe um Rice et al. konnte nachweisen, dass in Rattenaorten eine altersabhängig unterschiedliche MAPK-Aktivierung von p38, JNK und ERK1/2 vorzufinden war. Hier war insbesondere bei sehr alten Tieren eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich mit den jüngeren Tieren zu verzeichnen. Akute Blutdruckerhöhungen gingen mit deutlich erhöhten aktivierten MAP-Kinasen einher (Rice KM et al., 2005). Die altersabhängigen Unterschiede konnten ebenfalls durch die Gruppe um Li et al. nachvollzogen werden, welche VSMC aus Rattenaorten mit TNF-alpha und Glukose stimulierten. Die älteren Rattenaorten produzierten unter Stimulation deutlich höhere aktivierte MAPK und PD098059 konnte die Proliferation deutlich hemmen (Li M et al., 2003). Bei Ballonkatheterverletzung der caninen A. femoralis erfolgte der Nachweis einer gesteigerten Neointimabildung bei älteren Tieren, welche mit einer erhöhten ERK-Aktivität einherging und durch PD098059 signifikant gehemmt werden konnte (Gennaro G et al., 2003). Der MEK-Inhibitor PD098059 scheint also gerade auch bei atherosklerotischen Gefäßen und dem Vorliegen von Risikofaktoren wie z. B. fortgeschrittenem Alter und Bluthochdruck eine Proliferationshemmung von VSMC zu vermitteln und nicht nur in jungen gesunden Ratten, wie mit dieser Arbeit präsentiert.

Eine Studie mit *antisense*-Oligonukleotiden zur Unterdrückung der ERK1/2-Aktivierung nach PTCA in Schweinekoronarien konnte die Neointimaformation am Tag 7 reduzieren. Während also die mediale Muskelzellproliferation und Neointimaformation initial durch PD098059 deutlich reduziert werden konnte, verschwand der Effekt allerdings am Tag 21. Die Erklärung hierfür war eine zu kurze „Lebensdauer“ der decoys (Liu B et al., 2002). Orale Gaben des p38 MAPK-Inhibitors FR167653 erzielten nach Ballonkatheterverletzung in der ACC der Ratte eine 29,4%ige Reduktion der Neointima:Media-Ratio (Ohashi N et al., 2000). Die orale Verabreichung und die damit verbundenen potentiellen systemischen Nebenwirkungen wurde allerdings kritisch diskutiert. Fürsprache für eine *systemische* Therapie mit einem p38-MAPK-Inhibitor vor

Gefäßintervention erhielt SB203580 durch die Studie von Seeger FH et al., 2005. Hier konnte ex vivo eine durch SB203580 vermittelte Erhöhung endothelialer Progenitorzellen (EPC), die eine sehr wichtige Rolle im Rahmen des Remodelings spielen, bewiesen werden, nachdem gezeigt wurde, dass erhöhte p38 MAPK-Werte im Serum von KHK-Patienten mit verringerter zirkulierender EPC-Zellzahl einherging. Da die frühe und vollständige Reendothelialisierung des verletzten Gefäßareals eine wichtige Rolle spielt, ist dies neben der Muskelzellproliferation (Seeger FH et al., 2005). Die Inkubation mit PD098059 zeigte hier allerdings keinen Effekt auf die Zellzahl der EPC. Aufgrund der Erhöhung der EPC-Zellzahl in ex-vivo-Experimenten sowohl bei Gesunden, als auch bei KHK-Patienten wurde eine Therapie mit einem p38-MAPK-Inhibitor vor elektiver Gefäßintervention in Aussicht gestellt.

Die oben angeführten Forschungsergebnisse weisen daraufhin, dass das hier angewandte Rattenmodell ein gutes präklinisches Forschungsmodell darstellt.

5.6 Bisheriger klinischer Einsatz anderer MAP-Kinase-Inhibitoren

In Bezug auf die Hemmung der p38-Kinase sind verschiedene Inhibitoren in der Entwicklung, welche teilweise klinische Phase 2-3-Studien erreicht haben und für die Therapie von Inflammationen, Autoimmunität, Diabetes und Krebserkrankungen im Rahmen dieser Studien zur Verfügung stehen.

Inflammation, insbesondere entzündliche Gefäßveränderungen, sind ein bewiesener Risikofaktor für eine Reihe von kardialen Ereignissen. Während die Atherosklerose eine voranschreitende generalisierte inflammatorische Erkrankung der Arterienwand darstellt, können zum Beispiel durch akute entzündliche Gefäßveränderungen Plaque-Rupturen entstehen, welche wiederum instabile Angina pectoris, Myokardinfarkte und apoplektische Insulte hervorrufen können. Patienten mit vorbestehender KHK, welche erhöhte CRP-Werte im Serum aufwiesen, hatten signifikant höhere Raten von kardialen Ereignissen wie Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris sowie auch höhere Risiken für das Ausbilden eines Schlaganfalls. Ebenso war bei diesen Patienten die Sterblichkeit erhöht (Fadini GP et al., 2007 und Mayer RJ et al., 2006).

In allererster Linie für diese Arbeit interessant ist hiermit ein Inhibitor der p38-Kinase: VX-702 der Firma Vertex Pharmaceuticals. VX-702 hat die klinische Phase 2a von doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten dosiseskalierenden Studien zur

Therapie der rheumatoiden Arthritis und auch des akuten Koronarsyndroms in Verbindung mit einer perkutanen Koronarangioplastie durchlaufen. Insbesondere bei letzter Studie wurde eine Senkung des C-reaktiven Proteins durch VX-702 gemessen und eine antiinflammatorische Wirkung als Prävention der Restenosierung von Koronarien nach einer PTCA postuliert. Die Applikation erfolgte einmal täglich oral über insgesamt fünf Tage, wobei vor der PTCA begonnen wurde. Dem Wirkstoff wurde eine insgesamt gute Verträglichkeit bescheinigt (Mayer RJ et al., 2006).

Es existieren noch andere Hemmer der p38-Kinase in der klinischen Erprobung, z. B. BIRB-796 = Doramapimod von Boehringer Ingelheim, Phase 2-3 für die Therapie der Psoriasis, des Morbus Crohn und der Arthritis. Weiterhin SCIO-469 und SCIO-323 von SCIOS, Phase 1 bei Arthritis. Ebenso sind weitere Hemmer der p38-Kinase in der Entwicklung (SB242235 und SB681323 von Glaxo Smith Kline, VX-745 von Vertex, RWJ67657 von Johnson & Johnson und TAK-715 von Takeda).

Die MEK1/2-Inhibition ist ebenfalls in Studien der klinischen Phase 1 und 2 in Erprobung. So setzt z. B. die Firma Pfizer den MEK-Inhibitor PD0325901 bei fortgeschrittenen metastasierten Kolonkarzinompatienten ein. Weiterhin wird die Substanz ARRY-142886 der Firma Astra Zeneca in einer klinischen Phase 2-Studie zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms verwandt. Der MEK-Inhibitor UO126 wird möglicherweise als antivirales Medikament Anwendung finden (Planz O et al., 2001). Bisher existieren keine klinischen Studien mit einer gefäßspezifischen Indikation in Verbindung mit MEK-Inhibitoren.

Alle soeben erwähnten Inhibitoren sind Substanzen, die oral verabreicht werden können. Die orale Verabreichung impliziert jedoch neben ihrer systemischen Wirkungsweise auch die systemischen Nebenwirkungen.

Aufgrund ihrer antiangiogenetischen und antitumorösen Wirkung stehen therapeutisch für den Menschen multitarget-MAP-Kinase-Inhibitoren wie z. B. Sorafenib (hemmt vorwiegend C-RAF und B-RAF und zielt damit auf VEGFR-2, VEGFR-3 und PDGFR beta ab) und Sunitinib (hemmt VEGFR, PDGFR, KIT, fms-like tyrosine kinase 3) nach klinischen Phase-II-Studien zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zur Verfügung. Außerdem ist Sunitinib für die Therapie von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zugelassen. Viele weitere Kinase-Inhibitoren werden entwickelt

und scheinen auch für andere metastasierende Tumorerkrankungen vielversprechende in vitro-Ergebnisse zu liefern (Gridelli C et al., 2007 und Feldmann DR et al., 2006).

5.7 Mögliche klinische Bedeutung einer pharmakologischen MAP-Kinase-Inhibition bei der Prävention der In-stent-Restenose

Neointimaformation stellt nach durchgeführten Angioplastien atherosklerotischer Arterien trotz Stentimplantation durch Ausbildung einer Restenose eine häufige Spätkomplikation dar. Pharmakologische Substanzen oder interventionelle Methoden, die eine antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen entfalten, können zu einer Reduktion der Neointima beitragen und somit die Gefahr einer Restenosierung verringern. Im klinischen Alltag der interventionellen Kardiologie stellt die Implantation von pharmakonbeschichteten Stents (*drug eluting stents* oder DES) ein immer häufiger angewandtes Vorgehen gegenüber der Verwendung von einfachen Stents (*bare metal stents* oder BMS) dar, um einer Neointimaprolieration im Sinne einer In-stent-Restenose entgegenzuwirken. 2006 waren zum Beispiel 33% der insgesamt 250.000 in Deutschland implantierten Stents solche DES. Diese waren überwiegend mit Sirolimus (Rapamycin) oder Paclitaxel beschichtet. Hierunter senkte sich die In-stent-Restenoserate von circa 25% auf 3% (19. Herzbericht der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2006). In anderen Ländern steigerte sich die Rate der DES gegenüber den BMS noch deutlicher. So lag der Anteil der verwendeten DES bereits 2005 in der Schweiz und den USA bei annähernd 90% (Carlsson J, 2007). Zunächst schienen die Sirolimus-beschichteten Stents den Paclitaxel-beschichteten Stents überlegen zu sein (Dibra A et al., 2005 und Windecker S et al, 2005), bis die BASKET-LATE-Studie auf ein höheres Risiko tödlicher koronarer Spätthrombosen bei Patienten mit DES hinwies (Richartz B, Silber S, 2006). Sechs Monate nach PTCA und Stentimplantation wurde hier Clopidogrel abgesetzt. Danach waren nicht tödliche und tödliche Herzinfarkte deutlich erhöht (4,9% in der DES-Gruppe versus 1,3% in der BMS-Gruppe) und ebenfalls die nachgewiesenen In-stent-Spätthrombosen (2,6% in der DES-Gruppe versus 1,3% in der BMS-Gruppe) vermehrt vorzufinden. Es wurde eine negative Einwirkung der in den DES enthaltenen Wirkstoffe auf das Endothel der Koronararterien und eine schlechtere Reendothelialisierung des bei Ballonkatheterverletzung von Endothel denudierten Gefäßes als Ursache postuliert.

Sirolimus = Rapamycin stellt ursprünglich ein Makrolidantibiotikum dar, welches immunsuppressive Wirkung über Inhibierung zytokininduzierter Proliferation von Lymphozyten aufweist. Initial wurde die Substanz aufgrund der immunsuppressiven Potenz in der Transplantologie eingesetzt. Dann wurde die antiproliferative Wirkung auf VSMC nachgewiesen und 2001 publiziert (Marx SO und Marks AR, 2001). Weitere Zellkulturversuche mit Rapamycin bewiesen die Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die verminderte Produktion extrazellulärer Matrix über eine Hemmung der p38-MAP-Kinase-Kaskade (ERK-unabhängig). SB203580 hat in dieser Arbeit u. A. über die Hemmung dieser beiden Wirkungsmechanismen die Neointimaformation nach Ballonkatheterverletzung vermittelt.

Die Hemmung der Muskelzellproliferation durch lokale Applikation von zytotoxischen Substanzen in DES führt leider zumindest bei Paclitaxel ebenfalls zu einer Hemmung der Reendothelialisierung (Drachmann DE et al., 2000). Eine Besiedlung des denudierten Areals mit Endothel ist jedoch maßgeblich verantwortlich für das Wiedererlangen einer Homöostase, da eine gleichmäßig das Lumen auskleidende Schicht aus Endothelzellen eine kaum permeable Barriere bildet und zum Einen im Blut zirkulierende Wachstumsfaktoren, Enzyme und Cytokine davon abhält, auf Muskelzellen einzuwirken, zum Anderen die postinterventionell initial thrombogene Oberfläche schneller beseitigt ist (Yu P-J et al., 2007). Optimal wäre also eine begleitende medikamentöse Therapie, die sowohl die Muskelzellproliferation verhindert, als auch eine Reendothelialisierung erlaubt. Insbesondere SB203580 scheint diesen Anforderungen eher gerecht zu werden als PD098059.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Restenose in Folge Neointimabildung stellt nach Angioplastie atherosklerotischer Arterien trotz Stentimplantation eine häufige Spätkomplikation dar, welche durch begleitende medikamentöse Therapie verhindert werden soll. Diese Neointimabildung wird unter Anderem über die Aktivierung von mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden vermittelt. Hierbei stellen Migration, Dedifferenzierung, Proliferation und vermehrte Produktion extrazellulärer Matrix durch Muskelzellen bei der Entstehung / Progredienz einer Atherosklerose und Neointimaformation entscheidende Pathomechanismen dar.

In dieser Dissertation wurde vierzehn Tage nach intravasaler Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis der Ratte eine Reduktion der Neointimabildung durch Inhibition der MAPK-extracellular regulated kinase (MEK) mittels PD098059 um 44% und der MAPK p38 mittels SB203580 um 33% nach einmaliger externer operationssynchroner Applikation erreicht. Ebenso wurde eine hämodynamisch relevante Vergrößerung des Lumens der therapierten Gefäße erzielt (Lumenvergrößerung durch PD098059 um 31% und durch SB203580 um 21%). Im Vergleich mit ähnlichen Studien wurde dieser Therapieerfolg durch einzeitige lokale operationssynchrone Applikation in außergewöhnlich niedrigen Dosen erreicht.

Ob die Hemmung der MAP-Kinasen zur Prävention der Restenose beim Menschen einen klinisch wirksamen Ansatz darstellt, ist derzeit nicht abzusehen und müsste durch klinische Studien untersucht werden. In Anbetracht der Zytotoxizität der zurzeit eingesetzten Sirolimus- und Paclitaxel-beschichteten Stents mit Endothelzellschädigung als möglicher Ursache der In-stent-Spätthrombosen lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den lokalen Einsatz von MAP-Kinase-Inhibitoren mithilfe beschichteter Stents als interessante Alternative erscheinen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahn NG, Nahreini TS, Tolwinski NS et al. (2001)

Pharmacologic inhibitors of MKK1 and MKK2. *Methods Enzymol.*, 2001; 332:417-31.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P et al. (1995)

PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein Kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270(46): 27489-94.

Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E (1996)

Remodeling Rather Than Neointimal Formation Explains Luminal Narrowing after Deep Vessel Wall Injury: Insights from a Porcine Coronary (Re) stenosis Model. *Circulation*. 1996; 93(9): 1716-1724.

Badger AM, Bradbeer JN, Votta B et al. (1996)

Pharmacological profile of SB203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996; 279(3):1453-61

Bauriedel G, Höfling B (1995)

Mechanismus der Re-Stenosierung nach Angioplastie. *Medizin im Dialog, Sonderheft Kardiologie*, 1995; 08:6-13.

Brown J, Reading SJ, Jones S et al. (2000)

Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. *Lab invest*, 2000; 80:37-46.

Bruus H (2008)

Theoretical Microfluidics. *Oxford University Press*, 2008

Carlsson J (2007)

Medikamentenbeschichtete Stents. Verwirrung und Ernüchterung in der invasiven Kardiologie. *Deutsches Ärzteblatt*, 2007;104(3):86-7.

Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA (1989)

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest*, 1989; 60:360-364.

Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM (1983)

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*, 1983; 49(3):327-333.

Cohen P (1997)

The search for pathological substrates of MAP SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol*, 1997;7(9):353-61.

Deiner C, Schwimmbeck PL, Koehler IS et al. (2005)

Adventitial VEGF₁₆₅ gene transfer prevents lumen loss through induction of positive arterial remodeling after PTCA in porcine coronary arteries. *Atherosclerosis*. 2005; 189(1): 123-132.

Dibra A, Kastrati A, Mehilli J et al. (2005)

Paclitaxel-eluting or sirolimus-eluting stents to prevent restenosis in diabetic patients. *N Engl J Med*, 2005; 353(7):663-70.

Drachmann DE, Edelman ER, Seifert P et al. (2000)

Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: Change in composition and arrest of growth over six months. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000; 36(7):2325-2332.

Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A (2007)

Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007; 194(1):46-54.

Farb A, Virmani R, Atkinson JB, Kolodgie FD (1990)

Plaque morphology and pathologic changes in arteries from patients dying after coronary balloon angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1990; 16:1421-1429.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ et al. (1998)

Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273(29): 18623-32.

Feldmann DR, Motzer RJ (2006)

Novel targets and therapies for metastatic renal cell carcinoma. *Oncology*, 2006; 20(14): 1745-1753.

Folkow B, Svanborg A. (1993)

Physiology of cardiovascular aging. *Physiol. Rev.*, 1993; 73(4):725-64

Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fragin J (1991)

A paradigm for the restenosis based on cell biology: clue for the development of new preventive therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991; 17:758-769.

- Fournet-Bourgignon MP, Castedo-Delrieu M, Bidouard JP et al. (2000)
Phenotypic and functional changes in regenerated porcine coronary endothelial cells: increased uptake of modified LDL and reduced production of NO. *Circ. Res.*, 2000; 86:854-860.
- Fuchs S, Kornowski R, Leon MB, Epstein SE (2001)
Anti-angiogenesis: A new potential strategy to inhibit restenosis. *Int. J. Cardiovasc. Intervention*, 2001; 4:3-6.
- Gennaro G, Ménard C, Giasson E et al. (2003)
Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependant increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003;1;23(2):204-10.
- Gennaro G, Ménard C, Michaud SE et al. (2004)
Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor. *Circulation*. 2004; 110(21):3367-71.
- Gimbrone MA junior, Topper JN, Nagel T et al. (2000)
Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000; 902:230-240.
- Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro et al. (2001)
TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1 and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis*, 2001; 159(1):93-101
- Graf K, Xi XP, Yang D et al. (1997)
Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1997;29(1Pt2):334-339.
- Grewe PH, Deneke T, Holt SK et al. (2000)
Scanning electron microscopic analysis of vessel wall reactions after coronary Stenting. *Z. Kardiol.*, 2000; 89:21-27.
- Gridelli C, Maione P, Del Gaizo F et al. (2007)
Sorafenib and sunitinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 2007; 12(2): 191-200
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994)

- Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, 1994; 74:1141-1148.
- Herold G et al. (2002)
Innere Medizin, 2002.
- Hu Y, Cheng L, Hochleitner BW et al. (1997)
Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcriptionfactor in rat carotid arteries after ballon injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997; 17(11):2808-16.
- Hu Y, Bock G, Wick G et al. (1998)
Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J.*, 1998; 12(12): 1135-42.
- Indolfi C, Cioppa A, Stabile E et al. (2000)
Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2000; 35:214-221.
- Indolfi C, Torella D, Coppola C et al. (2002)
Rat carotid artery dilation by PTCA ballon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American Journal of Physiology*, 2002; 52:760-767.
- Indolfi C, Mongiardo A, Badimon J et al. (2003)
Molecular mechanisms of in-stent-restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends Cardiovas. Med.*, 2003; 13:142-148.
- Ip JH, Fuster V, Israel D et al. (1991)
The role of platelets, thrombin, and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991; 17:77-88.
- Jakob T, Ascher E, Alapat D et al. (2005)
Activation of p38 MAPK Signaling Cascade in a VSMC Injury Model: Role of p38 MAPK Inhibitors in Limiting VSMC Proliferation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005 ; 29(5) :470-8.
- Köhler R, Brakemeier S, Kühn M et al. (2001)
Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circulation Research*, 2001; 89:174-179.
- Kutsuna H, Suzuki K, Kamata N et al. (2004)

- Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(1):C55-64.
- Li M, Mossmann BT, Kolpa E et al. (2003)
Age-related differences in MAP kinase activity in VSMC in response to glucose or TNF-alpha. *J. Cell Physiol.*, 2003; 197(3):418-25.
- Li S, Tanaka H, Wang HH et al. (2006)
Intracellular signal transduction for migration and actin remodeling in vascular smooth muscle cells after sphingosylphosphorylcholine stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 291(3):H1262-1272.
- Liu B, Fisher M, Groves P (2002)
Down-regulation of the ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits intimal hyperplasia in a porcine model of coronary balloon angioplasty. *Cardiovascular Research*. 2002; 54(3):640-648.
- Lippert H et al. (1990)
Lehrbuch Anatomie, 2. Auflage. *Urban & Schwarzenberg*, 1990.
- Lowe HL, James B, Kachigian LM (2005)
A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting. *Heart*, 2005; 91:393-395.
- Machnig T, Zahn R, Rustige J et al. (1997)
Clinical safety using the thrombocyte aggregation inhibitor c7E3 in interventional cardiology in 520 patients. *Z. Kardiol.*, 1997; 86:975-981.
- MacLeod DC, Strauss BH, De Jong M et al. (1993)
Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994; 23(1):59-65.
- Marx SO, Marks AR (2001)
Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation*. 2001; 104(8):852-5.
- Mayer, RJ, Callahan JF (2006)
p38 MAP kinase inhibitors: A future therapy for inflammatory diseases. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006;3(1):49-54.
- McBride W, Lange R, Hillis L (1988)

- Restenosis after successful coronary angioplasty: pathology and prevention. *N. Engl. J. Med.*, 1988; 318:1734-1737.
- Miller Francis J Jr. (2001)
Adventitial Fibroblasts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001; 21:722.
- Moulton KS (2001)
Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2001; 3:225-233.
- Normanno N, De Luca A, Maiello MR et al. (2006)
The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol*, 2006; 207(2):420-7.
- Ohashi N, Matsumori A, Furukawa Y et al. (2000)
Role of p38 mitogen-activated protein kinase in neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20(12):2521-2526.
- Orzechowski H-D, Günther A, Menzel S et al. (2001)
Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60(6):1332-1342.
- Papakrivopoulou J, Lindahl GE, Bishop JE, Laurent GJ (2004)
Differential roles of extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ and p38 MAPK in mechanical load-induced procollagen α 1(I) gene expression in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research*, 2004; 61(4):736-744.
- Pearson G, Robinson F, Beers T et al. (2001)
Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*. 2001;22(2): 153-183.
- Peng KF, Wu XF, Zhao HW, Sun Y (2006)
Advanced oxidation protein products induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Chin Med J*, 2006; 119(13):1088-93.
- Pinto YM, Pinto SJ, Paul M, Merker HJ (1998)
The electron microscopic morphology of the common carotid artery in rats. *Anat. Anz.*, 1998; 180(3):223-235.

Pintucci G, Froum S, Pinell J et al. (2002)

Trophic effects of platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thrombosis and Haemostasis*. 2002; 88(5):834-842.

Pirelli L, Yu P-J, Gulkarov I et al. (2006)

Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) as a Strategy to Prevent Intimal Hyperplasia Following Cardiovascular Interventions. *Vascular Disease Prevention*. 2006; 3(3):173-183.

Planz O, Pleschka S, Ludwig S (2001)

MEK-Specific Inhibitor UO126 Blocks Spread of Borna Disease Virus in Cultured Cells. *J Virol.*, 2001; 75(10):4871-4877.

Popma JJ, Califf RM, Topol EZ (1991)

Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, 1991; 84:1426-1436.

Ray LB, Sturgill TW (1988)

Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 1988; 263(25):12721-7.

Reidy MA (1995)

Regulation of arterial smooth muscle growth. *The vascular smooth muscle cell*, 1995;271-274.

Rice KM, Kinnard RS, Harris R et al. (2005)

Effects of aging on pressure-induced MAPK activation in the rat aorta. *Pfluger Arch.*, 2005; 450(3):192-9.

Richartz B, Silber S (2006)

Die BASKET-LATE-Studie. Basel Stent Cost-Effectiveness Trial-Late Thrombotic Events Trial. *Herz*. 2006; 31:259.

Roux PP, Blenis J (2004)

ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Micobiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(2):320-344.

Sata M, Saiura A, Kunisato A et al. (2002)

Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Nature Medicine*, 2002; 8:403-409.

- Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH (1986)
Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.*, 1986; 58:438-445.
- Schwartz SM, Mecham RP et al. (1995)
The vascular smooth muscle cell. Molecular and biological responses to the extracellular matrix. *Academic Press Inc.*, 1995.
- Seeger FH, Haendeler J, Walter DH et al. (2005)
p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Downregulates Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*. 2005; 111:1184-1191.
- Sharony R, Pintucci G, Saunders PC et al. (2006)
Matrix metalloproteinase expression in vein grafts: Role of inflammatory mediators and extracellular signal-regulated kinases-1 und -2. *American Journal of Physiology-Heart und Circulatory Physiology*. 2006; 290(4):1651-1659.
- Sheppard R, Eisenberg MJ, Donath D, Meerklin D (2003)
Intracoronary brachytherapy for the prevention of restenosis after percutaneous coronary revascularization. *Am. Heart J.*, 2003; 146(5):775-786.
- Shieven GL (2005)
The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005; 5(10):921-928.
- Shin H-J, Jaewon O, Kang SK et al. (2005)
Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 329:(1):18-24.
- Shirotani M, Yui Y, Kawai C (1993)
Restenosis after Coronary Angioplasty: Pathogenesis of Neointimal thickening Initiated by endothelial loss. *Endothelium*. 1993; 1(1):5-22.
- Silber S (2001)
2. Bericht über die Mengenzunahme diagnostischer und interventioneller Herzkatheter im krankenhausärztlichen und vertragsärztlichen Bereich in Deutschland 1990 – 1999. *Herz*, 2001; 26:161-165.
- Slomiany BL, Slomiany A (2001)

- Delay in oral mucosal ulcer healing by aspirin is linked to the disturbances in p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Jornal of Physiology and Pharmacology*. 2001; 52 (2): 185-194.
- Stemermann MB, Weinstein R, Rowe JW et al. (1982)
Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1982; 79(12):3863-6
- Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert et al. (2001)
Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial vesus epithelial features. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2001; 37:505-514.
- Takahashi K, Sawasaki Y, Hata JI et al. (1990)
Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 1990; 25:263-274.
- ten Hove T, van den Blink B, Pronk I et al. (2002)
Dichotomal role of inhibition of p38 MAPK with SB203580 in experimental colitis. *Gut*. 2002; 50 (4): 507-512.
- Touyz RM, He G, El Mabrouk M et al. (2001)
P38 MAK kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by Angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension*. 2001; 37(2):574-80.
- Tsuda Y, Okazazi M, Uezono Y et al. (2002)
Activation of extracellular signal-regulated kinases is essential for pressure-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 2002; 446 (1-3): 15-24.
- Welt FG, Rogers C (2002)
Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(11):1769-76
- Westermann D, Rutschow S, van Linthout S et al. (2006)
Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2006; 49 (10): 2507-13.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999)
Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 1999; 79(1):143-80.

Windecker S, Remondino A, Eberli FR et al. (2005)

Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med*, 2005; 353(7):653-62.

Won SM, Park YH, Kim HJ et al. (2006)

Catechins inhibit angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp Mol Med*, 2006; 38(5):525-34.

Xu Q, Liu Y, Gorospe M et al. (1996)

Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin. Invest.*, 1996; 15;97(2):508-14.

Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T et al. (2006)

Indoxyl sulphate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.*, 2006; 69 (10):1780-1785.

Yang CM, Chien CS, Hsiao LD et al. (2001)

Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol*, 2001;132(7):1531-1541.

Yu P-J, Ferrari G, Pirelli L et al. (2007)

Vascular injury and modulation of MAPKs: A targeted approach to therapy of restenosis. *Cellular Signalling*. 2007; 19(7):1359-1371.

Zhang W, Liu HT (2002)

MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 2002; 12(1):9-18.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| α | alpha |
| A. | Arteria |
| AA | Acrylamid |
| Abb. | Abbildung(en) |
| ACC | Arteria carotis communis |
| ACE | Arteria carotis externa |
| ACI | Arteria carotis interna |
| Adventitia | Tunica adventitia (einer Arterienwand) |
| Ae. | Arteriae |
| AK | Antikörper |
| APAAP | alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (immunhist. Färbung) |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| AVK | arterielle Verschlusskrankheit |
| BAA | Bisacrylamid |
| B. allein | Ballondilatation allein ohne Pluronic Gel und ohne Wirkstoff |
| beg. | beginnend (e) (er) |
| β | beta |
| B. + Gel | Ballondilatation plus Pluronic Gel ohne Wirkstoff |
| BMS | <i>bare metal stent(s)</i> = Stent(s) ohne Pharmakonbeschichtung |
| BSA | bovines Serumalbumin, Kälberserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calciumionen |
| cAMP | cyclisches Adenosin-Monophosphat |
| ccm | Kubikzentimeter |
| cGMP | cyclisches Guanosin-Monophosphat |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| d | Tag(e)(en) |

| | |
|----------------|---|
| DAB | Diaminobenzidin |
| DES | <i>drug eluting stent(s)</i> = pharmakonbeschichtete(r) Stent(s) |
| DMEM | <i>Dulbeccos modified eagle medium</i> |
| Dr. med. | Doctor medicinae |
| ECGM | <i>Endothelial Cell Growth Medium</i> = Endothelzellwachstumsmedium |
| ECL | <i>enzymatic chemiluminescence</i> = enzymatische Chemolumineszenz |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EDTA | <i>ethylene diamine tetra-acetic acid</i> |
| EGTA | <i>ethylene glycol-bis-(beta-amino-ethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid</i> |
| <i>en bloc</i> | in einem Stück, zusammenhängend |
| EPC | <i>endothelial progenitor cells</i> = endotheliale Progenitorzellen |
| ERK1/2 | die beiden extrazellulär regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 |
| et al. | et alii, lateinisch für „und andere“ |
| etc. | et cetera, lateinisch für „und die Übrigen“ = und so weiter |
| ets | E26 Erythroblastomavirus transformationsspezifisch |
| F | <i>French</i> (Einheit für Kathetergröße) |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> = Kälberserum |
| FGF-2 | <i>basic fibroblast growth factor-2</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 |
| g | Gramm |
| G-CSF | <i>granulocyte colony-stimulation factor</i> |
| ggfs. | gegebenenfalls |
| GIST | gastrointestinale(r) Stromatumor(e) |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| GM-CSF | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |
| G-Protein | guaninnukleotidbindendes Protein |
| GPCR | <i>G-Protein-Coupled Receptor</i> = G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| GTP | Guanosin-Triphosphat |
| Gy | Gray |
| h | Stunde(n) |
| HE | Hämatoxylin / Eosin |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid |
| HUVEC | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> |
| IC50 | halbmaximale inhibitorische Konzentration eines Wirkstoffes |

| | |
|----------------------|--|
| Ig | Immunglobulin |
| IGF-1 | <i>insuline-like growth factor-1</i> = insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 |
| Il-1 | Interleukin-1 |
| Inc. | <i>Incorporated</i> |
| Intima | Tunica intima (einer Arterienwand) |
| i. p. | intraperitoneal |
| JNK | c-jun N-terminale Kinase |
| kD | Kilodalton (Größeneinheit von Proteinen) |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| klin. | klinisch(e) |
| l | Liter |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LEE | Lamina elastica externa |
| LEI | Lamina elastica interna |
| M | molar, Mol |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MAPKK | <i>mitogen activated protein kinase kinase</i> (MEK) |
| MAPKKK | <i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i> (MEKK) |
| Media | Tunica media (einer Arterienwand) |
| MEK | <i>MAPK-extracellular regulated kinase</i> |
| MEK1/2 | die beiden MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 |
| mg | Milligramm |
| Mg ²⁺ | Magnesiumionen |
| min. | Minute(n), wobei 0` = null min. bedeuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| MMP | Matrixmetalloproteinasen oder Matrixmetalloproteasen |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm / µm ² | Mikrometer / Quadratmikrometer |

| | |
|---------------------------|---|
| μM | mikromolar |
| MTA | medizinisch technische Assistentin |
| n | <i>number</i> = Nummer oder Anzahl |
| N. | Nervus |
| NaCl | Natrumchlorid |
| NaH_2PO_4 | Natriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| Neointima | Tunica neointima (einer Arterienwand) |
| nm | Nanometer |
| OP | Operation |
| OT | Objektträger |
| PAA | Polyacrylamid |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | <i>phospate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PD | PD098059 |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> |
| PDGF-BB | <i>platelet derived growth factor BB</i> |
| PDGFR | <i>platelet derived growth factor receptor</i> |
| Pen/Strep | Penicillin / Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| POD | Peroxidase |
| Prof. | Professor |
| % / %ige(s) | Prozent / prozentige(s) |
| PTA | perkutane transluminale Angioplastie |
| PTCA | perkutane transluminale Koronarangioplastie |
| ® | <i>registered trademark</i> = eingetragenes Warenzeichen |
| rpm | <i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor-Tyrosin-Kinase(n) |
| s. | siehe |
| SAP-K | stress-aktivierte Proteinkinase(n) |
| SAS | <i>statistical analysis system</i> |
| SB | SB203580 |

| | |
|--------------------|--|
| SB + PD | SB203580 mit PD098059 kombiniert |
| sec. | Sekunde(n) |
| SDS | <i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i> = Natrium-Lauryl-Sulfat |
| SHR | <i>spontaneously hypertensive rats</i> = spontan hypertensive Ratten |
| sm α -Actin | <i>smooth-muscle-alpha-Actin</i> |
| s. o. / s. u. | siehe oben / siehe unten |
| Tabl. | Tablette(n) |
| TBS | <i>tris buffered saline</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF- α | <i>transforming growth factor alpha</i> |
| TGF- β | <i>transforming growth factor beta</i> |
| TGFR | <i>transforming growth factor receptor</i> |
| TNF- α | <i>tumor necrosis factor alpha</i> |
| TPA | Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (= Phorbolester) |
| U | <i>Unit(s)</i> |
| u. A. | unter Anderem(n) |
| U/min. | Umdrehungen pro Minute |
| Univ.- Prof. | Universitätsprofessor |
| usw. | und so weiter |
| VEGF | <i>vascular endothelial derived growth factor</i> |
| VEGFR | <i>vascular endothelial derived growth factor receptor</i> |
| VSMC | <i>vascular smooth muscle cell(s)</i> = glatte Gefäßmuskelzelle(n) |
| vWF | von-Willebrand-Faktor |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

9.1 Publikationen

Ralf Köhler, Heike Wulff, Ines Eichler, Marlene Kneifel, Daniel Neumann, Andrea Knorr, Ivica Grgic, Doris Kämpfe, Han Si, Judith Wibawa, Robert Real, Klaus Borner, Susanne Brakemeier, Hans-Dieter Orzechowski, Hans-Peter Reusch, Martin Paul, K. George Chandy, Joachim Hoyer :

Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation*, 2003; 108:1119-1125

Ralf Köhler, Susanne Brakemeier, Meike Kühn, Claudia Behrens, Robert Real, Christiane Degenhardt, Hans-Dieter Orzechowski, Axel R. Pries, Martin Paul, Joachim Hoyer:

Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury. *Circulation Research*, 2001; 89(2):174-179

Hans-Dieter Orzechowski, Astrid Günther, Stefan Menzel, Andreas Zimmermann, Heiko Funke-Kaiser, Robert Real, Thomas Subkowski, Frank S. Zollmann, Martin Paul:

Transcriptional mechanism of protein kinase C - induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 2001; 60(6):1332-1342

Fahrenholz M, Real R, Küken A, Saxena A, Orzechowski HD. Single low-dose administration of pharmacological inhibitor of mitogen-activated ERK kinase to the adventitia of the injured rat carotid artery suppresses neointima formation and inhibits nuclear ERK signaling. *Eur J Pharmacol*, 2009 Jul 1. [Epub ahead of print]

9.2 Poster, Präsentationen

M. Strasdat, R. Real, A. Weinstrauch, M. Paul, H.-D. Orzechowski:

Effect of the MEK1 inhibitor PD098059 on neointima formation in the rat carotid artery.
(7th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research, Frankfurt, 2002)

H.-D. Orzechowski, M. Strasdat, A. Weinstrauch, S. Kovacevic, R. Real, M. Paul:
Effect of MAP/SAP kinase inhibitors on neointima formation in the rat carotid artery.
(Halle, 2002)

T. Westhoff, S. Schmidt, R. Real, W. Zidek, M. van der Giet:
The effects of cadaveric renal transplantation on arterial compliance in patients with end-stage renal disease.
(15. Jahrestagung des AK NTX der DGU e. V., Jena, 2007)

T. Westhoff, G. Offermann, H.-H. Neumayer, R. Real, W. Zidek, M. van der Giet, K Budde:
The impact of FTY720 (fingolimod) on vasodilatory function and arterial elasticity in renal transplant patients.
(15. Jahrestagung des AK NTX der DGU e. V., Jena, 2007)

9.3 Abstracts

Köhler R, Real R, Degenhardt C, Kühn M, Orzechowski H.-D., Pual M, Hoyer J:
Impaired function and expression of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in regenerated endothelium of rat carotid arteries after balloon catheter injury.
Hypertension, 2000;36:707.

Köhler R, Kühn M, Behrens C, Real R, Brakemeier S, Degenhardt C, Orzechowski H.-D., Hoyer J:
Defective function of Ca²⁺-activated K⁺ channels in regenerated endothelium of rat carotid arteries after balloon catheter injury. *FASEB J*, 2001;A107.

10. LEBENSLAUF

82

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. DANKSAGUNG

Prof. Dr. med. Martin Paul, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, sei für die guten Forschungsbedingungen gedankt, die diese Arbeit ermöglichten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. med. Hans-Dieter Orzechowski für seine intensive, kompetente und geduldige Unterstützung und Betreuung sowie seine motivierenden und anregenden Ideen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder bedanken, der mir immer ein Ansprechpartner und guter Freund war und mir bei Material und Methodik mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank geht auch an die wissenschaftlichen Mitarbeiter und Doktoranden der Abteilung, von denen ich viele als meine Freunde gewonnen habe.

Ich danke den beiden MTA Christel Meissner und Birgitta Schwaneberg für die Einarbeitung im Labor. Auch möchte ich Frau Helga Stürje für die Einarbeitung in die Histologie danken.

Frau Dipl. Math. Christine Gericke aus dem Institut für Toxikologie gilt mein Dank für die Überarbeitung der Statistik bei der Ausarbeitung der Histomorphometrie.

Zuletzt bedanke ich mich natürlich ganz besonders herzlich bei meiner lieben Ehefrau und meinen Eltern für Ihre fortwährende liebevolle Unterstützung.

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Robert Real, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation „Histologische Veränderungen nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis der Ratte und Wirkung einer pharmakologischen Inhibition der Proteinkinasen MEK und p38 auf die Neointimabildung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe“.

Datum

Unterschrift