

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

Dissertation

Effekte einer pharmakologischen Hemmung der Mitogen-aktivierten
ERK Kinase auf morphometrische Gefäßparameter im Verletzungsmodell der
Arteria carotis der Ratte - Eine Dosis-Wirkungsstudie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Anne Kathrin Küken, geb. Weinstrauch
aus Hilden

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski
2. Prof. Dr. med. K. Schmidt-Ott
3. Prof. Dr. med. H. P. Reusch

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	6
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Aufbau eines Gefäßes	10
1.1.1 Morphologie einer Rattenarterie	10
1.1.2 Morphologie einer humanen Arterie	10
1.2 Atherosklerose	11
1.3 Restenose	11
1.4 Therapie der Stenose	12
1.5 Mechanismen der Restenose	14
1.6 Der MAP-Kinase Signalweg	16
1.6.1 Der p44/p42 MAPK Signalweg	17
1.6.2 Rezeptortypen	17
1.6.3 Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen.....	19
1.6.4 Aktivierungsmechanismus der ERK1/2	19
1.6.5 Substrate des MAPK-Signalweges	20
1.6.6 Bedeutung der p44/p42 Aktivierung bei der Restenose.....	21
1.7 Der Einfluss des ERK-Signalweges auf Bildung und Migration von VSMCs 22	
1.8 Die Inhibierung des MAPK – Signalweges	22
1.9 Der Wirkstoff PD98059	23
1.9.1 IC ₅₀ Werte des PD98059	23
1.9.2 Spezifische Wirkungen des PD98059 und weitere relevante Ergebnisse der Forschung	24
2 Fragestellung	26
3 Methoden	27
3.1 Herstellung des lokalen Wirkstoffdepots	27
3.2 Tierversuche	28
3.2.1 Haltung der Versuchstiere	28
3.2.2 Operation der Tiere	28
3.3 Behandlungsgruppen	30

3.4	Histologie	31
3.4.1	Gewinnung des zu untersuchenden Gewebes für die Histologie	31
3.4.2	Einbettung der Carotiden in Paraffin	32
3.4.3	Herstellung der Paraffin-Schnitte	32
3.4.4	Färbung der Schnitte	33
3.4.5	Histomorphometrische Analyse.....	33
3.5	Statistische Berechnungen	33
3.6	Westernblot	36
3.6.1	Proteinextraktion.....	36
3.6.2	Durchführung der Proteinmessung	37
3.6.3	Herstellung Westernblotgele	37
3.6.4	Elektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.6.5	Transfer auf die Nitrozellulosemembran	38
3.6.6	Färbung der transferierten Proteine	39
3.6.7	Blockade der unspezifischen Proteinbindungen	39
3.6.8	Waschen.....	39
3.6.9	Inkubation mit dem Primärantikörper	39
3.6.10	Inkubation mit dem Sekundärantikörper.....	40
3.6.11	Detektionsreaktion.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Morphometrische Analysen der mit PD98059 behandelten Carotiden	41
4.2	Vergleiche der Gruppen „Kontrolle“ und „Leergel“ und Beurteilung der Wirkung der Scheinoperation (SOP)	43
4.3	Vergleichende Übersicht der Mittelwerte der Messwerte der Behandlungsgruppen Leergel, 40 µM PD98059 und 100 µM PD98059	44
4.4	Vergleichende Untersuchung der absoluten Größen von Externa, Media, Interna, Neointima und Lumen der operierten Seiten	46
4.5	Vergleich der Verhältnisse der Messgrößen der operierten und kontralateralen (nichtoperierten) Seiten	49
4.6	Vergleiche der auf die Externa der kontralateralen Seite normierten Messgrößen	51
4.7	Vergleich der auf die Media der kontralateralen Seite normierten Messgrößen	53
4.8	Relativer Lumenverlust	54
4.9	Morphometrische Ergebnisse	55
4.10	Expression von p42/44 MAPK	56

5	Diskussion	58
5.1	Versuchsmodell	58
5.2	Kritische Betrachtung der Versuchsdurchführung.....	61
5.3	Diskussion der Wirkung des PD98059 auf die Neointimabildung	64
5.3.1	ERK 1/2 Aktivierung im Rattenmodell	64
5.3.2	Diskussion der Unterschiede zwischen der 40 µM- und 100 µM – Gruppe	66
5.4	Klinische Anwendungsgebiete.....	69
5.4.1	Hemmung der Neointimaproliferation und der Restenose	69
5.4.2	MEK-Inhibitoren in klinischen Studien.....	71
6	Zusammenfassung	73
7	Anhang	74
7.1	Liste verwendeter Substanzen mit Quellen	74
8	Quellenverzeichnis	75
9	Curriculum Vitae	90
10	Veröffentlichungen	92
10.1	Publikationen	92
10.2	Poster, Präsentationen.....	92
11	Eidesstattliche Erklärung	93

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Hans-Dieter Orzechowski danke ich für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung.

Dem damaligen Direktor des Instituts, Prof. Dr. M. Paul, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit. Bei Herrn Dr. med. Robert Real und Herrn Dr. med. Michael Richter möchte ich mich besonders für die gute Einführung, die freundliche Begleitung und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Des Weiteren geht mein Dank an Frau Christel Meißner und Frau Birgitta Schwaneberg, die mir nicht nur mit ihrer technischen Unterstützung eine wertvolle Hilfe waren.

Den Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen anregenden Gespräche.

Danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für eine niemals endende Unterstützung.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Mechanismen, welche nach PTCA zu einem Verlust der Lumenfläche führen.....	16
Abb. 2	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) Signalkaskade.....	17
Abb. 3	Chemische Struktur des Wirkstoffes PD98059	23
Abb. 4	Schematische Darstellung der einzelnen Flächen und Schichten eines Gefäßes, welches nach einer Ballondilatation ausgemessen wurde.	41
Abb. 5	Darstellung von Kontrollschnitten	42
Abb. 6	A. Carotis nach Dilatation und PD98059 Behandlung.....	42
Abb. 7	Darstellung einer nicht operierten Arteria carotis communis.....	42
Abb. 8	Darstellung der Mittelwerte (in μm^2) für Externa, Interna, Lumen, Media und Neointima der operierten Seiten	45
Abb. 9	Darstellung der Mittelwerte (in μm^2) für Externa, Lumen und Media der kontralateralen Seiten	45
Abb. 10	Auswertungen der absoluten Größen der Messwerte von Externa, Interna, Lumen, Media und Neointima der operierten Seiten.....	48
Abb. 11	Auswertungen für die Verhältnisse ExternaOP/ExternaKO, MediaOP/MediaKO und LumenOP/LumenKO	50
Abb. 12	Auswertungen für die Verhältnisse LumenOP/ExternaKO, MediaOP/ExternaKO und Neointima/ExternaKO	52
Abb. 13	Absolute Werte der Media der kontralateralen Seite bzgl. Gruppen	53
Abb. 14	Relativer Lumenverlust in den Gruppen Leergel, 40 μM PD98059 und 100 μM PD98059.....	54
Abb. 15	Proteinexpression von Erk1/2 (p44/p42) in der A. carotis der Ratte (Western blot)	56
Abb. 16	Proteinexpression von der phosphorylierten ERK1/2 (p44/p42) in der A. carotis (Westernblot).	57

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Operationsmaterialien.....	30
Tab. 2	Einteilung der einzelnen Behandlungsgruppen als Übersicht mit Anzahl pro Gruppe, Behandlung und Medikation.....	31
Tab. 3	Inhaltsstoffe des Proteinextraktionspuffers.....	36
Tab. 4	Inhaltsstoffe des Trenn- und Sammelgels	37
Tab. 5	Elektrophoresepuffer.....	38
Tab. 6	Transferpuffer	39
Tab. 7	Einteilung der einzelnen untersuchten Gruppen	56

Abkürzungsverzeichnis

Ah	Aryl hydrocarbon
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FGF	Fibroblast growth factor
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-Triphosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HE	Hämatoxylin/Eosin
IP3	Inositol-Trisphosphat
JAK	Janus Kinase
LEE	Lamina elastica externa
Leergel	Wirkstofffreies Pluronic-Gel
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
MEK	MAPK-extracellular regulated kinase
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
MKKKK	MAPK kinase kinase kinase
PDGF	platelet-derived growth factor
PIP 2	Phosphatidylinositol-Bisphosphat
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Proteinkinase C
PTCA	Percutaneous transluminal catheter angioplasty
RTK	Receptor Tyrosin Kinase
SMC	Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells)

1 Einleitung

1.1 Aufbau eines Gefäßes

1.1.1 Morphologie einer Rattenarterie

Die Gefäße des arteriellen Systems sind ihrer mechanischen Beanspruchung angepasst. Die Arteria carotis, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, gehört zu den herznahen Arterien vom elastischen Typ.

Die Arteria carotis einer ausgewachsenen Ratte besteht aus einer Tunica intima, Tunica media und Adventitia. In der lichtmikroskopischen Vergrößerung zeigt sich eine sehr dünne Tunica intima und eine subendotheliale Schicht. Die Tunica intima grenzt durch eine einlagige lückenlose Endothelschicht das fließende Blut gegen das Gefäß ab. Die dann folgende Tunica media ist zirkulär strukturiert. Sie besteht aus drei bis vier elastischen Membranen, zwischen welchen sich ringförmig angeordnete glatte Gefäßmuskelzellen befinden. Bei Arterien wird die Tunica Media durch die Membrana elastica interna gegen die Tunica Intima abgegrenzt. In dieser innersten elastischen Membran stellen sich elektronenmikroskopisch 1-2 µm große Lücken dar (PINTO ET AL. 1998). Die äußerste elastische Membran bildet die Grenze zu der dann folgenden Adventitia. Die Adventitia besteht aus Bindegewebeelementen, wie z.B. Kollagen Typ 1, Fibrozyten, sowie Vasa vasorum und Nervi vasorum.

1.1.2 Morphologie einer humanen Arterie

Die Morphologie der menschlichen Arterie ist im gleichen Schichtsystem aufgebaut. Auch hier findet man eine Tunica interna, - media und - externa. Die Arteria carotis des Menschen gehört zu den mittelgroßen Arterien vom elastischen Typ. Hierzu gehören die Aorta und ihre Hauptäste. Die Wände der elastischen Gefäße bilden ein muskuloelastisches System und haben die oben beschriebene Dreischichtigkeit.

Die Intima ist dicker als z.B. bei den menschlichen Arterien vom muskulären Typ. Das Stratum subendotheliale ist sehr breit, die hier liegenden Bindegewebsfasern verlaufen hauptsächlich in Längsrichtung und spielen für die Kontraktionen und Erweiterungen der Gefäße eine wichtige Rolle.

Die Media besteht auch hier aus konzentrisch angeordneten gefensterten elastischen Membranen, deren Zahl mit dem Alter zunimmt. Zwischen den Membranen finden sich glatte Muskelzellen, Fibroblasten, dünne Fibrillen, elastische Fasern und amorphe chondroinsulfatreiche Substanzen. Die Adventitia ist relativ schwächig; sie enthält elastische und kollagene Fasern sowie Vasa vasorum und Nerven. Die Membrana elastica externa fehlt.

1.2 Atherosklerose

Die Pathogenese atherosklerotischer Prozesse basiert auf der „Verletzungshypothese“ und wird als ein entzündlicher Prozess angesehen. Durch verschiedene Risikofaktoren kann es zu einer Schädigung des Endothels kommen und somit zu einem Verlust der physiologischen Funktion des Endothels. Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer Veränderung seiner normalen homöostatischen Eigenschaften und es kommt zu einer Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Ansammlung von mononukleären Zellen und Bildung von Bindegewebe. Diese Mechanismen führen letztlich zu einer Bildung arteriosklerotischer Plaques und somit zu einer Gefäßverengung (ROSS ET AL. 1999).

1.3 Restenose

Restenose (Rezidivstenose) beschreibt das pathophysiologische Phänomen, dass das Lumen durch interventionelle Maßnahmen rekanalisierter arteriosklerotisch veränderter Gefäße dazu neigt, sich erneut einzuengen.

Die in der Literatur vorzufindende Schwankungsbreite der Auftretenshäufigkeit restenotischer Gefäßläsionen liegt zwischen 10-60%. Die Rate der nach einer PTCA (perkutanen transluminalen Koronarangiographie) auftretenden Restenose beträgt jedoch immer noch ca. 30% (GRUENTZIG ET AL. 1987, POPMA ET AL. 1991) und die follow-up Studien zeigten sogar Prozentzahlen zw. 30-50%. (HOLMES ET AL. 1984, NOBUYOSHI ET AL. 1988, CALIFF 1991, DETRE 1989).

Bei der PTCA mit durchgeführter Stentimplantation reichen die Restenoseraten je nach Studie von 10-60%. (LOWE ET AL. 2002, DUSSAILLANT ET AL. 1995, ELEZI ET AL. 1998).

Eine Stenose von 50% oder eine Lumenreduktion von 30 %, ausgehend vom initialen postinterventionellen Befund, werden als angiographisch signifikante Restenosen bezeichnet (KUNTZ ET AL. 1993).

Eine klinisch relevante Restenose wird durch die limitierenden Ereignisse definiert wie notwendige Reinterventionen oder Bypass-Operationen, Angina pectoris Symptomaten oder dem Exitus letalis.

1.4 Therapie der Stenose

Die von Charles Dotter maßgeblich geprägte Entwicklung der Behandlung hämodynamisch bzw. klinisch relevanter Stenosen, veränderte die Therapiemöglichkeiten (DOTTER ET AL. 1965). Die sich daraus entwickelnde Kathetertechnik ermöglicht es heutzutage, auch ausgeprägte Gefäßläsionen erfolgreich zu behandeln (GRUENZIG ET AL. 1977, SIMPSON ET AL. 1982).

Besonders das Verfahren der Ballondilatation (oder Ballonangioplastie = PTCA) setzte sich in der klinischen Anwendung zunehmend durch. Die Ballondilatation ist heutzutage ein Standardverfahren für interventionelle perkutane Behandlungen von z.B. Koronarstenosen. Eine zusätzliche Verbesserung der Anwendungsmöglichkeit erfolgte durch Einführung des unabhängig führbaren intrakoronaren Führungsdrahtes (over-the-wire-Prinzip) (GRUENZIG ET AL. 1977, SIMPSON ET AL. 1982). Dies führte zu einem exponentiellen Anstieg der Durchführung von Ballondilatationen (PFUND ET AL. 2000).

Ein weiteres klinisches Anwendungsgebiet stellt die PTCA bei postoperativen Stenosebildungen nach koronaren Bypassoperationen und bei atherosklerotischer Veränderung von Koronarien transplanteder Herzen dar (HÖFLING ET AL. 1992, SCHEIDT ET AL. 1995). Die interventionelle Therapie (PTCA) zeichnet sich durch eine geringere Invasivität, geringere Belastung des Patienten und eine Wiederholbarkeit des Verfahrens aus. (HÖFLING ET AL. 1989, HOLMES ET AL. 1984, PARISI ET AL. 1992).

Eine erfolgreiche Ballondilatation bedingt jedoch auch spezifische Komplikationen (GRUENTZIG ET AL. 1977 & 1987). Der Mechanismus der Ballondilatation führt zu einem Riss zwischen den undehnbaren Plaqueschichten und den dehnbaren äußeren Gefäßarealen. In der Akutphase führt das Verfahren zu über 90% zum Erfolg. Es kann jedoch durch Plaqueablösungen zu einem embolischen Gefäßverschluss kommen.

Die aufgetretenen Komplikationen sind im einzelnen Akutkomplikationen (Gefäßverschluss, Dissektion, Perforation etc.), mangelhafter Angioplastieerfolg („recoil“) und die Entstehung der Restenose. Die Akutkomplikationen sind durch die Weiterentwicklung des Katheterspektrums und durch die Einführung von Gefäßstützen (Stents) weitgehend beherrschbar geworden (BIER ET AL. 1991, DIETZ ET AL. 1991, HOLMES ET AL. 1984).

Prospektive randomisierte Studien zeigten eine deutlich reduzierte akute Komplikationsrate und gute Langzeitergebnisse für die Stentimplantation. (FISCHMAN ET AL. 1994, SCHÖMIG ET AL. 1994, SERRUYS ET AL. 1994). Die Stentimplantation zeigt im Vergleich zur PTCA eine Verringerung der Komplikationsrate in den ersten 6 Monaten. Stents verringern die angiographische und klinische Restenose in Koronargefäßen mit einem Durchmesser von ≥ 3 mm, obwohl die Neointimahyperplasie nach Stentimplantation im Vergleich zur Ballonangioplastie zunimmt. Das frühe postinterventionelle Schrumpfen des Gefäßlumens durch Plaquereste und Rückstellkräfte „early recoil“, und das „late negative remodeling“ (Konstriktion) der behandelten Gefäße wird durch die Stentimplantation vermindert. Die ersten Stent-Studien zeigten, dass die zunächst besseren Akuterfolge durch späteren Verlust der Gefäßlumens die initial positiven Ergebnisse relativierten. Die Rezidivstenose stellt somit auch bei Stent-Implantationen eine zu beachtende Komplikation und ein signifikantes klinisches Problem dar. (AL SUWAIDI ET AL. 2000, AMBROSE ET AL. 1997, BETRIU ET AL. 1999, FERGUSON ET AL. 1999, FISCHMAN ET AL. 1994, GEORGE ET AL. 1998, HÖFLING ET AL. 1992, HÖFLING ET AL. 1995, HOLMES ET AL. 1984, RODRIGUEZ ET AL. 1998, SCHÖMIG ET AL. 1994, SERRUYS ET AL. 1994, VERSACI ET AL. 1997).

Zur Minderung der In-Stent-Stenose wird zum einen die intrakoronare Brachytherapie mit β und γ -Strahlen angewandt, welche eine Reduktion der Restenose von 8-38% versus 39-64% in der Placebogruppe zeigte (SHEPPARD ET AL. 2003). Zum anderen werden Drug-elution-Stents (DES) implantiert, welche überwiegend mit Sirolimus (Rapamycin) oder Paclitaxel beschichtet sind. Hierunter werden Reduktionen der Restenoserate von ca. 25% auf 3% beobachtet (19. HERZBERICHT DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KARDIOLOGIE, 2006).

Als weitere therapeutische Maßnahmen der In-Stent Stenose bietet sich eine erneute PTCA (RePTCA), sowie z.B. Excimer Laser, Rotations-Atherektomie sowie direkte Atherektomie an. Die Re PTCA stellt sich als das effektivste Verfahren der Behandlung der In Stent-Stenose dar (COHEN EA 1997, DI MARIO ET AL. 2000, HERRMANN ET AL. 1993, TOPOL ET AL. 1993).

1.5 Mechanismen der Restenose

Die Ballonkatheterisierung vergrößert das intravaskuläre Lumen, indem es die Gefäßwände aufdehnt. Dies geschieht durch Aufbau eines intraluminären Drucks, der zwischen 3-12 bar liegen sollte, durch den gefüllten Katheterballon. Dabei werden in vorgeschädigten Gefäßen vor allem die weniger atherosklerotischen Segmente gedehnt. In unserer Versuchsreihe handelte es sich nicht um vorgeschädigte Arterien der Ratte, während dieses Verfahren in der klinischen Anwendung nur an vorgeschädigten Gefäßen durchgeführt wird (BULT ET AL. 2000).

Die Restenose ist ein komplexes Geschehen, bei dem verschiedene Entstehungsmechanismen eine Rolle spielen. Die in der Media proliferierenden und dann aus der Media lumenwärts einwandernden glatten Gefäßmuskelzellen stellen einen dieser Mechanismen dar, durch den eine Neointima gebildet wird. Diese ist in der Qualität und Struktur nicht mehr der ursprünglichen Intima gleich, welche aus einer einreihigen Schicht von Endothelzellen gebildet wird. Die eingewanderten glatten Gefäßmuskelzellen teilen sich nach Erreichen der Intima weiter und bilden so eine neue Matrix (PRATT ET AL. 1993, SCHWARTZ ET AL. 1995).

Die durch die Ballonkatheterisierung entstandenen Risse in der Endothelschicht fördern die Bildung von Thromben innerhalb der Arterienwand. Der Thrombus wird in der Folge durch Infiltration von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen organisiert. Die glatten Gefäßmuskelzellen proliferieren und ersetzen das thrombotische Material. Endothelzellen migrieren und bilden auf der Oberfläche des Thrombus und der Media eine neue Schicht von Endothelzellen, welche jedoch nicht die Eigenschaften und Funktionen der ursprünglichen Endothelzellschicht hat. Dadurch kommt es noch nach Wochen zu immer wiederkehrenden Neuorganisationen von Thromben an der geschädigten Zellwand (SCHWARTZ ET AL. 1998). Wenn durch Ballondilatation auch Verletzungen der Adventitia verursacht werden, kann es sogar zu einer Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten kommen, welche auch in die Media und weiter lumenwärts einwandern und an der Neointimabildung beteiligt sein können (SCOTT ET AL. 1996).

Ein weiterer Mechanismus, der zur Lumenveränderung führen kann, ist das sogenannte „Remodeling“, das meistens zur Verengung des Gefäßes durch Konstriktion der LEE führt. Im positiven Fall kann „Remodeling“ zu einer Vergrößerung der LEE führen und damit den Verlust an Lumenfläche durch Neointimaproliferation kompensieren, jedoch führt es im Negativfalle auch häufig zu einer Verkleinerung des Lumens. In letzterem Falle kann sich die Arterie durch kollagenreiches Narbengewebe, welches aus der peri-adventialen Schicht stammt, nicht ausdehnen, oder es kommt zu einem Schrumpfen des gesamten Gefäßes (SCHWARTZ ET AL. 1998).

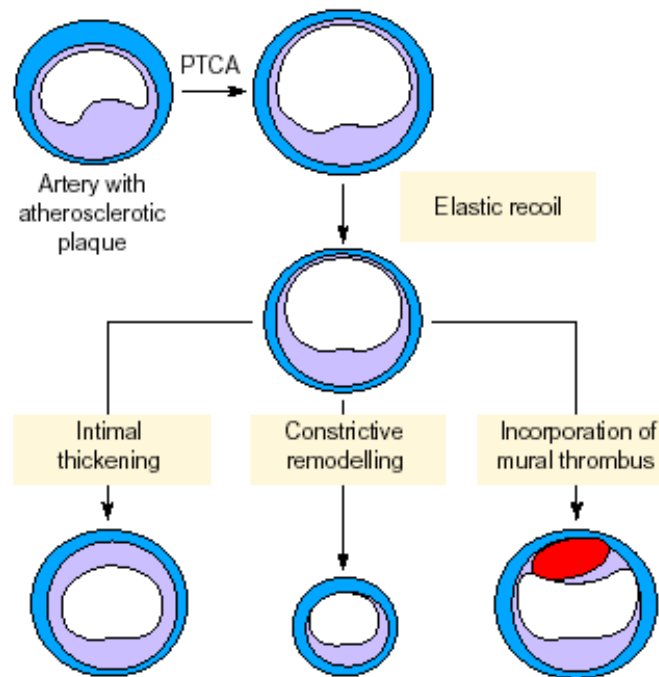


Abb. 1 Schematische Darstellung der Mechanismen, welche nach PTCA zu einem Verlust der Lumenfläche führen. Das Zusammenziehen der Arterie findet nach einer Ballondilatation unmittelbar statt, während die drei anderen Mechanismen (die Thrombusorganisation, die Neointimaentstehung und das Remodeling) später auftreten. Die Media wird in blau gezeigt, die Intima in lila und der Thrombus in rot. (BULT ET AL. 2000)

1.6 Der MAP-Kinase Signalweg

Die Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalwege übertragen eine Vielzahl von externen Signalen, die zu einer großen Zahl von Zellreaktionen führen. Hierzu gehören u.a. Wachstum, Differenzierung, Entzündung und Apoptose. Diese Signalwege werden durch den folgenden allgemeinen schematisierten Signalweg charakterisiert:

Stimulus → MAPKKK → MAPKK → MAPK → Zellreaktion

Hierbei stellt sie MAPKK die Kinase von MAPK und MAPKKK die Kinase von MAPKK dar. In den meisten Fällen wird die MAPKKK durch G-Proteine wie Ras, Rac oder Rap1 aktiviert, sie kann jedoch auch durch andere Enzyme aktiviert werden. Bei Säugetieren wurden drei Haupt-Signalwege identifiziert: MAPK/ERK, SAPK/JNK und p38 MAPK.

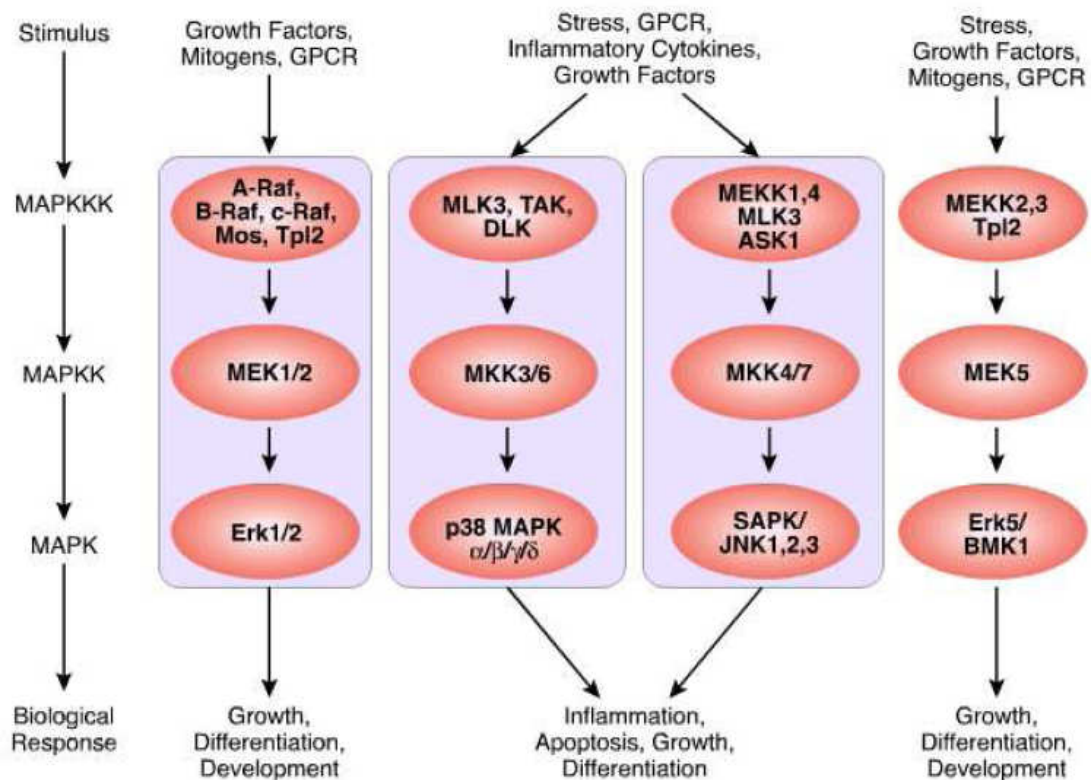


Abb. 2 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) Signalkaskade (Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>)

1.6.1 Der p44/p42 MAPK Signalweg

Dieser Signalweg läuft über eine Anzahl von verschiedenen MKKK und MKK, welche in verschiedenen Spezies wie z.B. bei Mensch und Ratte identifiziert wurden. Es sind verschiedene MAPKs, die als ERK1 bis ERK5 bezeichnet werden, bekannt. In dieser Arbeit soll insbesondere die Bedeutung des ERK1/2 Signalweges, der auch als p44 und p42 Signalweg bezeichnet wird, untersucht werden.

1.6.2 Rezeptortypen

Viele verschiedene Rezeptoren haben die Fähigkeit, den MAPK ERK1/2 Signalweg zu aktivieren. Bei der ersten Gruppe führt eine Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen wie EGF-Rezeptoren, PDGF-Rezeptoren oder Insulin-Rezeptoren zu einer Autophosphorylierung der cytosolischen Domäne des Rezeptors selbst. Dies führt zu einer Phosphorylierung spezifischer Substrate.

Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Umwandlung von Ras-GDP zu Ras-GTP (JOHNSON ET AL. 1994). Ras-GTP interagiert mit der MKKK raf oder anderen MKKK, welche zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges führen.

Die zweite Gruppe stellen spezifische Zytokin-Rezeptoren, T-Zell-Rezeptoren, CD28 und B-Zell Rezeptoren dar (DENHARDT ET AL. 1996). Sie aktivieren über ihre Stimulation Proteine wie z.B. JAK, welche die Fähigkeit haben, sich selbst und den Rezeptor zu phosphorylieren. Damit bereiten sie die Bindungsstellen für verschiedene Proteine, wie z.B. STAT oder Shc vor. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges. Des Weiteren kann die Phosphorylierung der Zielproteine durch eine Aktivierung der Tyrosinkinase aus der Src-Familie erreicht werden. Wiederum wird der Rezeptor selbst phosphoryliert, und durch eine Bindung von Sos zum Rezeptor kommt es zu einem Aufladen des Ras-GTP und zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges.

Die dritte Gruppe sind die G-Proteine gekoppelten Rezeptoren. Die Bindung eines entsprechenden Effektors an den Rezeptor wird nicht direkt auf die katalytische Einheit weitergeleitet, sondern führt zu einer Dissoziation des G-Proteins. Wenn G_i -Proteine beteiligt sind, wird vermutet, dass die ERK1/2 Aktivierung primär über den $\beta\gamma$ -Untereinheit-Komplex vermittelt wird. Der Mechanismus scheint PI3K-abhängig und spezifisch zu sein (LOPEZ-IILSASACA ET AL. 1997). Dann wiederum kommt es über eine Kaskade von Tyrosinkinase, wie Shc, Grb 2, Sos, Ras und MKKK^{raf}, zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges. Die Kopplung des Rezeptors an $G_{\alpha/11}$ aktiviert die Phospholipase C β (PLC β). Diese spaltet PIP₂ in IP₃ sowie Diacylglycerin. IP₃ stimuliert die Freisetzung von intrazellulärem Calcium, wodurch es zu einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase (Pyk 2) kommt (DAUB ET AL. 1996, LEV ET AL. 1995, SUGDEN ET AL. 1995). Pyk 2 aktiviert den ERK1/2 Signalweg dann wiederum über die Kaskade von Tyrosin-Kinasen. Einige GPCR können den ERK1/2 Signalweg in einer PKC-abhängigen, aber Ras-unabhängigen Form aktivieren (WIDMANN ET AL. 1999). Die Aktivierung des ERK1/2 Signalweges verläuft dann weiter wie oben beschrieben.

Die vierte Gruppe von Rezeptoren sind Integrine, eine Familie von transmembranösen Rezeptoren, die sich an Proteine der extrazellulären Matrix binden wie z.B. Fibronectin, Collagen und Vitronectin. Neben der Rho-vermittelten Aktivierungen des ERK1/2 Signalweges, sind noch verschiedene weitere Mechanismen beschrieben, die eine Aktivierung hervorrufen können (CHEN ET AL. 1994, MIYAMOTO ET AL. 1995, MORINO ET AL. 1995, RENSHAW ET AL. 1996, ZHU ET AL. 1995).

1.6.3 Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen

Die Aktivierung der MAPK wird durch eine zweifache Phosphorylierung in der Aminosäuresequenz, welche man als Aktivierungsloop bezeichnet, kontrolliert. In der Thr-X-Tyr Sequenz im Aktivierungsloop findet die Phosphorylierung statt, katalysiert durch spezifische MKK, wobei X verschiedene Aminosäuresequenzen der MAPK darstellen kann (BRUNET ET AL. 1997, AHN ET AL. 1991). Für die ERK 1/2 sind die korrespondierende Phosphorylierungsstelle das Thr-183 und das Tyr-185. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer Interaktion mit der Arginin-Bindungsstelle. Die doppelte Phosphorylierung und die strukturellen Veränderungen im Aktivierungsloop führen zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität um mehr als das 1000-fache (CANAGRAJAH ET AL. 1997).

1.6.4 Aktivierungsmechanismus der ERK1/2

Wie oben beschrieben, kann die Stimulation des MAPK Signalweges vereinfacht als ein Drei-Kinasen-Modell beschrieben werden. Die Aktivierung vieler Rezeptoren führt zu einer Übertragung der Aktivierung über Ras. Ras in der GTP gebundenen Form bindet an die NH₂-terminal regulierende Domäne der MKKK^{raf1}.

Über das Ras-GTP kommt es zu einer Lokalisierung der MKKK^{raf1} an der Plasmamembran, wo die MKKK^{raf1} aktiviert wird (DOWNWARD ET AL. 1996, MARAIS ET AL. 1996). Dies geschieht durch eine Phosphorylierung an der Tyr-340 und Tyr-341 Position. Einige Studien zeigten, dass jedoch auch Phosphorylierungen an Serin- und Thyrosin Stellen zu einer Aktivierung der MKKK^{raf1} führten. Durch PKC kommt es beispielsweise zu einer Phosphorylierung an Ser²⁵⁹ und Ser⁴⁹⁹.

Dieser Vorgang benötigt ebenfalls die Kopplung von MKKK^{raf1} an Ras-GTP (WIDMANN ET AL. 1999).

Des Weiteren kann MKKK^{raf1} durch ERK1/2 und PKA phosphoryliert werden. Dies führt zu einer Inhibierung der Aktivität (MARAIS ET AL. 1996, MISCHAK ET AL. 1996, SEGER ET AL. 1995). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um einen negativen Feedback, der eine übermäßige Stimulierung des Signalweges verhindern soll.

In der nächsten Stufe des Drei-Kinasen-Modells kommt es zu einer Aktivierung der MEK 1/2. Die beiden Kinasen sind in ihrer primären Aminosäuresequenz sehr ähnlich und sind Threonin/Tyrosin Kinasen. Die ERK1/2 haben eine Thr-Glu-Tyr Sequenz in ihrem Aktivierungsloop, welcher durch die MEK 1/2 phosphoryliert wird. Die Aktivierung von ERK1/2 führt zu einer schnellen Translokation der Kinase in den Nukleus. Dort kann die aktive Form mit verschiedenen Substraten interagieren.

1.6.5 Substrate des MAPK-Signalweges

Transkriptionsfaktoren stellen wichtige Substrate für die MAPK (ERK1/2) dar, wobei diese auch die Fähigkeit haben, eine Anzahl anderer Substrate zu phosphorylieren, wie z.B. andere Kinasen (MKKK raf), Rezeptoren (EGF receptor), andere zytoskelett-aktive Proteine (cytosolic phospholipase A₂) einige cytoplasmatische Proteine, einige Mikrotubulin assoziierte Proteine und Enzyme (COHEN P ET AL. 1997, LIN ET AL. 1993, WIDMANN ET AL. 1999, WASYLYK ET AL. 1998, SEGER ET AL. 1995).

Nach einer Translokation der aktivierten ERK1/2 in den Nukleus können dort verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wird unter anderem durch sterische Umfaltungsprozesse erreicht, die zu einer Freilegung der für die Proteinfunktion wichtigen Domänen führen. So können Transkriptionsfaktoren erst nach der Phosphorylierung mit der DNA interagieren. Zu den Transkriptionsfaktoren gehören neben den immediate early Genen c-Jun, c-Fos und c-Myc insbesondere Proteine aus der sog. ETS-Familie (SEGER ET AL. 1995, COHEN P ETAL. 1997, WASYLYK ET AL. 1998). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro ist typischerweise die Sequenz, die ERK1/2 als Substrat dient (CASILLAS ET AL. 1993). Es wurde gezeigt, dass bei der Entstehung der

Neointima eine Aktivierung von ETS-Faktoren bzw. von c-Jun und c-Fos eine Rolle spielen (HU ET AL. 1997, NAITO ET AL. 1998, HULTGARDH-NILSSON ET AL. 1996).

1.6.6 Bedeutung der p44/p42 Aktivierung bei der Restenose

Die Restenose entwickelt sich innerhalb weniger Monate nach PTCA. Dabei kommt es zur Akkumulation von neointimalen SMC, welche durch direkte Migration der medialen SMC in die Intima verursacht wird. Sowohl die Akkumulation, als auch die Immigration werden durch extrazelluläre Reize hervorgerufen. Dazu gehören z.B. Cytokine, PDGF, FGF und TGF- β 1, Prostacycline, Endothelin-1 und Angiotensin II. Diese führen, wie oben beschrieben, zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges (BULT ET AL. 2000, CLOWES ET AL. 1983, GRAF ET AL. 1997, LILLE ET AL. 1997, PYLES ET AL. 1997).

Es wurde gezeigt, dass es durch eine Ballondilatation zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 kommt (KOYAMA ET AL. 1998). Weiterhin wurde die Translokation der aktivierten ERK1/2 in den Nukleus (WATSON ET AL. 2000) beschrieben. Je nach Studie und Beginn der Messzeit steigt die Aktivität der ERK1/2 innerhalb von 5 Minuten (HU ET AL. 1997), nach 15 Minuten (LILLE ET AL. 1997) oder nach 30 Minuten (KOYAMA ET AL. 1998) an. Studienabhängig kommt es nach mehreren Stunden zu einer Reduktion oder zu einem Rückgang der Aktivität bis auf das Ausgangsniveau. Nach 14 Tagen ist in allen Untersuchungen das Basalniveau erreicht (WATSON ET AL. 2000, LILLE ET AL. 1997, LAI ET AL. 1996, KOYAMA ET AL. 1998, ADAM ET AL. 1995). Bei nicht behandelten Ratten ist eine basale Aktivität der ERK1/2 vorhanden (LILLE ET AL. 1997, HU ET AL. 1997, PYLES ET AL. 1997).

Mit der Aktivierung der ERK1/2 ist die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen assoziiert, (MOSES ET AL. 2001) welche, wie bereits oben beschrieben, einen großen Anteil an der Neointimabildung haben (URANO ET AL. 1999).

1.7 Der Einfluss des ERK-Signalweges auf Bildung und Migration von VSMCs

Es wurde in kultivierten Zellen gezeigt, dass die Aktivierung des ERK-Signalweges eine entscheidene Rolle bei der Migration von VSMC spielt. Eine Inhibierung dieses Weges reduziert die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (GRAF ET AL. 1997).

An verschiedenen Substanzen, welche in der Gefäßpathologie beteiligt sind, wie z.B. Angiotensin II (TOUZY ET AL. 1999), oxidiertes LDL (YANG ET AL. 2001) und glycated Serumalbumin (HATORI ET AL. 2001), wurde gezeigt, dass es auch hier durch eine Inhibierung von MEK zu einer Reduktion der Migration der glatten Gefäßmuskelzellen und der DNA Proliferation kommt.

1.8 Die Inhibierung des MAPK – Signalweges

Die Erforschung des MAPK – Signalweges und anderer Signalwege hat die Frage nach gezielten Eingriffsmöglichkeiten in diese Signalwege aufgeworfen, um zum Einen zu einem verbesserten Verständnis zu kommen und zum Anderen Möglichkeiten für therapeutische Ansätze zu finden. Zur Inhibierung des MEK/ERK Signalweges wurden u.a. als wirkungsvoll und zugleich spezifisch Verbindungen wie z.B. PD98059, UO126 und die Verbindungen der Tyrphostingruppe eingesetzt und in der Literatur beschrieben. Die Tyrphostine sind eine Gruppe von Verbindungen, die als Proteinkinase – Inhibitoren und als Tyrosinkinase – Hemmer eingesetzt werden. Wegen ihrer spezifischen Eigenschaften werden sie z.B. zur Erforschung von Signalwegen in der Krebsforschung eingesetzt (DE VOS ET AL. 2000).

Sowohl PD98059 [2-(2'-Amino 3'-methoxy-phenyl)-oxanaphthalen-4-flavon] als auch UO126 [1.4 – Diamino -2.3 – dicyano – 1.4 – bis (2 – aminophenylthio) butadien] sind MEK-Inhibitoren und als solche in verschiedenen biologischen Signalwegen untersucht worden, insbesondere in solchen, in denen die Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen / ERKs) eine Rolle spielt. Beide Inhibitoren sind nicht-kompetitiv in Bezug auf die MEK-Substrate ATP und ERK (FAVATA ET AL. 1998). Obwohl die Kontakt-/ Bindungsstellen für PD98059 und UO126 an MEK1 offenbar überlappen, sind

ihre Aktionsmechanismen unterschiedlich (ALESSI ET AL. 1995, DUDLEY ET AL. 1995, FAVATA ET AL. 1998, GOULD ET AL. 2000). Dieser Unterschied und die Selektivität des PD98059 gegenüber MEK1 Und MEK2 können in der Forschung detaillierte Hinweise auf die Mechanismen in Signalwegen geben.

1.9 Der Wirkstoff PD98059

Wie oben gezeigt, wurde eine Vielzahl verschiedener chemisch-synthetischer Wirkstoffe auf ihre Spezifität hinsichtlich der Hemmung des MEK-ERK-Signalweges untersucht (DAVIS ET AL. 2000, FAVATA ET AL. 1998). PD98059, hat sich in unterschiedlichen Versuchen als ein spezifischer, nicht kompetitiver Inhibitor der mitogenaktivierten Proteinkinase erwiesen (REINERS ET AL. 1998, ALESSI ET AL. 1995, DUDLEY ET AL. 1995, FAVATA ET AL. 1998, WANG ET AL. 2001).

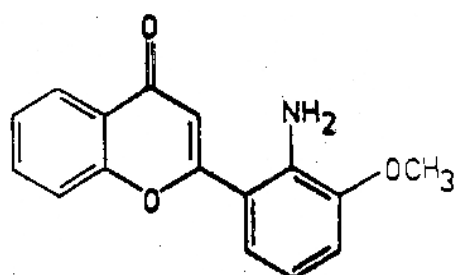


Abb. 3 Chemische Struktur des Wirkstoffes PD98059

Der Wirkstoff PD98059 wurde mittels eines Assays identifiziert, der auf der MEK-abhängigen Phosphorylierung von MBP beruhte, wobei gezeigt wurde, dass PD98059 die Aktivität der MEK, aber nicht die der MAPK dosisabhängig inhibierte (DUDLY ET AL. 1995).

1.9.1 IC₅₀ Werte des PD98059

In der Literatur finden sich je nach Versuchsanlage und Einsatz von Zellen unterschiedlicher Spezies bei in vitro Versuchen IC₅₀ Werte in einem Bereich von 2 bis 100 µM. ALESSI ET AL. 1995 beschreibt die Inhibierung der MEK-Aktivierung durch PD98059 mit einer IC₅₀ von 2-7µM, die Inhibierung der Aktivierung von MEK1 durch Raf mit einer IC₅₀ von 5µM und die Inhibierung der Aktivierung von MEK2 durch Raf mit IC₅₀ von 40µM (ALESSI ET AL. 1995). Für

aktive MEK1 Mutanten wurden $10\mu\text{M}$ gefunden, jedoch für Raf-aktivierte MEK1 ein deutlich höherer Wert von $100\mu\text{M}$ (ALESSI ET AL. 1995, DUDLEY ET AL. 1995, GOULD ET AL. 2000). An anderer Stelle wurde gezeigt, dass Konzentrationen unter $20\mu\text{M}$ nicht toxisch auf Zellkulturen wirken (REINERS ET AL. 1998). Da alle diese Werte bei in vitro Versuchen ermittelt wurden, muss bei der Wahl der Wirkstoffkonzentration bei in vivo Versuchen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden, eine ausreichend hohe Konzentration im Bereich von ca. $5\text{-}50\mu\text{M}$ in situ erreicht werden, um eine Bioverfügbarkeit zu erzielen, die der Größenordnung nach den zitierten in vitro Versuchen entspricht.

1.9.2 Spezifische Wirkungen des PD98059 und weitere relevante Ergebnisse der Forschung

Weitere Forschungsergebnisse mit Relevanz für diese Arbeit zeigen, dass beim Einsatz von PD98059 außer der Inhibierung des MAPK-pathways auch mit anderen Mechanismen gerechnet werden muss, die je nach gewählten Zell- oder Tiermodellen in in vitro oder in vivo Versuchen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. So zeigten MOSES ET AL. 2001 durch in vitro Versuche, dass darüber hinaus die Migration von Zellen (SMCs) in verletzte Bereiche von kultivierten SMCs der Rattenaorta sowie die DNA-Synthese durch PD98059 konzentrationsabhängig bei Konzentrationen um $20\mu\text{M}$ gehemmt werden.

Ein Nebeneffekt des PD98059, den die Autoren nicht auf die Inhibierung der MAPK-Aktivierung zurückführen, ist die Blockierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} - Kanälen, gemessen an Oozyten der Urechis Caupo (GOULD ET AL. 2000). PD98059 wurde hier in Konzentrationen bis zu $50\mu\text{M}$ eingesetzt, die erwartungsgemäß ebenfalls zu einer MAPK-Hemmung führten. Es konnte so gezeigt werden, dass PD98059 die durch PDGF induzierte Migration von SMCs aus Ratten- bzw. Kaninchenarterien bzw. aus der Umbilikalvene reduziert (GRAF ET AL. 1997, COSPEDAL ET AL. 1999). Eine Untermauerung der Bedeutung der MAP-Kinase Kaskade als Signalweg für Proliferation und Migration von SMCs zeigte sich durch in vitro Versuche an kultivierten VSMCs von Ratten. Es wurden dabei Konzentrationen von $1\text{ - }30\mu\text{M}$ eingesetzt, die eine konzentrationsabhängige, inhibierende Wirkung an durch PDGF-BB aktiviertem

ERK1 und ERK2 zeigten. In diesen Versuchen konnte kein Einfluss auf die stress-induzierte Ca^{2+} - Ionen – Ausschüttung festgestellt werden (GRAF ET AL. 1997).

In anderen in vitro Versuchen konnte an kultivierten Aorta SMCs von Mäusen kein Effekt des PD98059 im Konzentrationsbereich von 7-15 μM auf die durch PDGF-BB induzierte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase und die dadurch hervorgerufene Migration der SMCs festgestellt werden (KRAEMER ET AL. 1999). PD98059 (Konzentrationen von 10 bis 100 μM) inhibierte in vitro ebenfalls die Migration glatter humaner Muskelzellen aus der Vena saphena magna nach mechanischer Verletzung und deutlicher ERK1 und ERK2 Phosphorylierung mit einem Maximum nach 10 bis 30 Minuten. Die Hemmung war signifikant, aber auch bei hohen Konzentrationen nicht vollständig, so dass der Autor (WIEBEL ET AL. 2004) auch andere Signaltransduktionswege bei der Motilität humaner SMCs für wahrscheinlich hält. Andere Autoren hatten bereits gezeigt, dass es zwei Phasen der durch PDGF-BB induzierten ERK1/2 Aktivierung in humanen venösen glatten Muskelzellen gibt (NELSON ET AL. 1998). Ein erstes Maximum bereits nach 15 Minuten, das mit der PDGF-BB induzierten Migration in Verbindung gebracht wurde und eine spätere Aktivierung nach 1-4 Stunden, die mit der Proliferation der glatten Muskelzellen assoziiert wurde. Zu diesem Schluss kamen die Autoren durch den zeitlich gezielten Einsatz von PD98059 innerhalb der ersten 15 Minuten nach der Stimulation der Zellen mit PDGF-BB, durch den die Migration inhibiert wurde, während späterer Einsatz des Wirkstoffes die Migration nicht mehr beeinflusste. Weiter leiteten sie daraus eine zeitabhängige, differenzierte Beeinflussung von Proliferation und Migration über die gleiche Signalkaskade ab.

2 Fragestellung

Grundlage dieser Arbeit war die in derselben Arbeitsgruppe zuvor gemachte Beobachtung, dass durch adventitielle Applikation des MEK-Inhibitors PD98059 die Neointimabildung nach Angioplastie der A. carotis der Ratte signifikant vermindert wurde. In dieser Arbeit sollte die Wirkung von zwei geringeren Dosen von PD98059 auf Neointimabildung, Gefäßremodeling und ERK-Aktivierung nach Ballondilatation der A. carotis der Ratte untersucht werden, um weitere Informationen über die minimal effektive Dosis zu erhalten.

3 Methoden

3.1 Herstellung des lokalen Wirkstoffdepots

Herstellung der Pluronic-Stammlösung:

12,5 g Pluronic Gel F127 wurden in 50 ml steriler PBS-Pufferlösung unter Rühren bei 4°C gelöst. Die Lösung wurde bei 4°C für die weiteren Versuche gelagert. Das Gel ist in dieser Konzentration bei 4°C flüssig und geliert bei Raum- und Körpertemperatur.

Zur Herstellung der mit dem Wirkstoff PD98059 versetzten Behandlungsgele wurde von einer Stammlösung des PD98059 mit der Konzentration 50mM ausgegangen (5 mg PD 98059 in 374 µl DMSO).

Zur Herstellung des Gels mit der Konzentration 100 µM wurden 12 µl der 50 mM Lösung mit 18 µl DMSO gemischt. (entspr. 30µl mit 20mM). 5 µl dieser Lösung wurden jeweils mit der Lösung des Pluronicgels auf 1 ml ergänzt entsprechend einer Konzentration von 100 µM. Zur Herstellung des Gels mit der Konzentration 40 µM wurden 8 µl der 50 mM Lösung mit 42 µl DMSO gemischt (entspr. 50 µl mit 8 mM). 5 µl dieser Lösung wurden jeweils mit der Lösung des Pluronicgels auf 1 ml ergänzt entsprechend einer Konzentration von 40 µM. Das Leergel wurde mit jeweils 5µl DMSO/1ml versetzt, um einen theoretisch möglichen Effekt des DMSO auch in der sogenannten Leergelgruppe zu erhalten.

Die Portionen von jeweils einem Milliliter wurden gekühlt bei 4°C aufbewahrt und jeweils für den Zeitraum einer Operationsserie (max. 30 Tage) gelagert. Für neue Operationsserien wurden neue Ansätze hergestellt.

Eine Operationsserie umfasste 10-15 Tiere. Pro Tag wurden jeweils 2-5 Tiere operiert. Die jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen und die Vergleichsbehandlungen wurden in den Behandlungsgruppen nach dem Zufallsprinzip gewählt, um Serieneffekte auszuschließen. Während der Operation wurden die Lösungen sowie die Insulinspritzen, in die das Gel vor der Applikation von jeweils 100µl aufgezogen wurde, auf Eis gelagert.

3.2 Tierversuche

3.2.1 Haltung der Versuchstiere

Männliche Sprague Dawley-Ratten (Tierzucht Schönwalde GmbH) wurden in passenden Makrolonkäfigen auf Weichholzgranulat in einem Tierstall bei einer Luftfeuchtigkeit von 60% +/- 15%, einer Raumtemperatur von 22°C (Toleranz +/- 2°C) und einem Tag-Nachtzyklus (12/12 Stunden) gehalten. Es wurde pelletiertes Standardfutter (Altromin 1314) und Leitungswasser in Nippeltränken ad libitum angeboten. Nach Übernahme wurden sie mind. 1 Woche in dem Tierstall gehalten, bis sie ein Gewicht von ca. 350g bis 500g erreicht hatten. Am Tag der Operation wurden sie gewogen und markiert. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens lag unter dem Aktenzeichen G0132/99 vor.

3.2.2 Operation der Tiere

Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von mit 13mg/kg KG Xylazin und 87mg/kg KG Ketamin herbeigeführt. Nachdem die Tiere auf keinen Schmerzreiz mehr reagierten, wurden sie an allen 4 Extremitäten auf dem Operationstisch befestigt. Der Hals wurde durch leichten Zug an den oberen Schneidezähnen nach hinten rekliniert. Nach Herausziehen der Zunge, wurde der Halsbereich großzügig rasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert (CLOWES ET AL. 1983, HU ET AL. 1997). Ein ca. 2,5 - 3,0 cm langer Hautschnitt, der kaudal bis an das Sternum heranreichte, wurde in der Medianebene durchgeführt. Dann wurde das Unterhautfettgewebe sowie die Fascie des rechten Schilddrüsenlappens durchtrennt. Die Schilddrüse und der M. sternocleidomastoideus wurden freipräpariert und mit zwei aufgebogenen Büroklammern zur Seite fixiert. Der M. omohyoideus wurde dargestellt und reseziert. Die nun freiliegende A. carotis communis dextra wurde vorsichtig mit möglichst geringer mechanischer Manipulation dargestellt und mit einem Faden angeschlungen, der so weit wie möglich proximal angelegt wurde. Der Faden wurde unter leichtem Zug zur Seite gelegt. Die A. carotis externa wurde nach kranial freipräpariert und kranial ligiert. Die A. thyreoidea sup. sowie alle weiteren kleinen Abgänge, welche freipräpariert werden konnten, wurden abgebunden. Die A. carotis interna und der kaudale Abgang der A. carotis

externa wurden temporär unterbunden. Auf den Fäden um die A. carotis interna wurde leichter Zug aufgebracht, so dass der Blutrückstrom in die A. carotis interna gestoppt wurde. Der Faden um die A. carotis communis wurde an einen Flaschenzug mit einem Gegengewicht von etwa 2 g aufgehängt. Zwischen den 2 Fäden, die um die A. carotis externa lagen, wurde die Gefäßwand mit einer Irisschere inzidiert. Bei der Durchführung einer Scheinoperation endete das Verfahren hier, und es folgte die Ligierung der A. carotis externa und ein schichtweiser Wundverschluss. Bei allen weiteren Gruppen wurde die Arterienwand am Inzisionsrand mit einer kleinen Pinzette angehoben und ein 2F Fogarty-Embolektomiekatheter durch die A. carotis externa bis in die A. carotis communis eingeführt. Der Katheter, welcher an eine mit H₂O gefüllte Spritze angeschlossen war, wurde vorher mit 0,1 ml zunächst probeweise gefüllt und zeigte mit dieser Menge eine adäquate Ballonfüllung. Nach Einführung des Katheters wurde dieser zunächst so weit geblockt, bis kein Blutrückstrom mehr vorhanden war, und dann wurde das Gewicht vom Flaschenzug entfernt. Danach folgte die Dehnung der A. carotis communis, hierzu wurde der Katheter 6 mal im entleerten Zustand bis vor die Mündung in die Aorta thoracalis vorgeschoben und langsam unter Füllung mit 0,1 ml zurückgezogen. Der Katheter wurde dann nach Entleerung des Ballons herausgezogen. Zur Vermeidung von Embolien wurde der Faden um die A. carotis communis erst nach Austritt einer kleinen Menge Blut wieder mit dem Flaschenzug gespannt. Die A. carotis externa wurde mit dem bereits distal liegenden Faden komplett abgebunden. Dann wurden 0,1 ml des Gels (wirkstofffreies Gel, 100µM-Ansatz, 40µM Ansatz) oder kein Gel bei der Kontrollgruppe um die Arterie herum aufgetragen. Die Fäden von der A. carotis communis und der A. carotis interna wurden entfernt. Der Blutstrom war so über den Aortenbogen, die A. carotis communis und die A. carotis interna gewährleistet. Nachdem die Haken entfernt waren, wurde der Schnitt mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. Der gesamte Eingriff vom Beginn der Narkose bis zum Ende des Wundverschlusses dauerte zwischen 25 und 60 Minuten. Das Tier wurde in Seitenlage in einen Käfig mit frischer Einstreu auf eine Wärmedecke gelegt und noch weitere zwei Stunden beobachtet. Nachdem das Tier aufgewacht war, wurde es in den Tierhaltungsraum gebracht, wo die Tiere

bis zum Versuchsende gehalten wurden. Der Zustand der Tiere wurde alle 1 bis 2 Tage überprüft.

Tab. 1 Operationsmaterialien

Operationsmaterial	Firma
Anatomische Pinzette	Aesculap, Braun [Nr. BD222R, Nr. BD043R]
Büroklammer (Operationshacken)	Bürobedarf aus Kupfer
Chirurgische Pinzette	Aesculap, Braun [Nr. BD533R]
Forgaty-Embolektomiekatheter (2 French)	Edwards Lifesciences
Infusionssystem	Fresenius-Kabi AG [Nr.2886532]
Injektionsspritze	Inject-H 1ml, Luer Solo, Braun Melsungen AG [Nr. 9166254V]
Injektionskanüle	BD Microlance TM3; 0,45x13 mm[Nr. 303800 Becton Dickenson GmbH]
Ketanest	Parker-Davis/Pfizer
Kurzhaarrasierer	Karstadt, Deutschland
Mikrofederschere	Aesculap, Braun [Nr. FD012R]
Nadelhalter	Aesculap, Braun [Nr. BM015R]
Nahtmaterial	Ethicon, Johnson & Johnson
Präparierschere	Aesculap, Braun [Nr. BC503R]
Skalpell	Feather scalpel, No21; Feather safety razor Co.ltd.,Japan [Nr. GRF-2975Nr.21]
Styroporplatte	Baumarkt
Vacutainer System	Becton Dickson GmbH [Nr.367261]
Wärmeplatte bis 40°	Karstadt, Deutschland
Xylazin	Sanofi/Ceva GmbH

3.3 Behandlungsgruppen

Bei der Kontrollgruppe wurde eine Operation mit 6-facher Dilatation durchgeführt, und es fand keine weitere externe Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor statt.

Die Leergelgruppe wurde als zweite Kontrolle mit hinzugefügt. Hier wurde eine 6-malige Ballondilatation durchgeführt, und die Arterie wurde anschließend mit Pluronic Gel ohne Wirkstoff behandelt. Neben der Funktion einer weiteren Kontrollgruppe sollte diese Gruppe auch zeigen, dass das Pluronic Gel keinen Effekt auf die Neointimaproliferation hat.

Gruppe drei und vier sollten den Effekt zweier verschiedener Konzentrationen des Inhibitors PD98059 auf die Neointimaproliferation zeigen, so dass nach einer 6-fachen Ballondilatation der Wirkstoff PD98059 in den beiden Dosierungen (100µM, 40µM) von außen auf die Arterie aufgetragen wurde.

Die fünfte Gruppe wurde als weitere Kontrolle hinzugefügt. Bei ihr wurde nur die Operation ohne Katheterisierung der Arterie durchgeführt, da gezeigt wurde, dass es zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges allein durch Dehnen und Stressen der Arterie kommen kann (HU ET AL. 1997).

Tab. 2 Einteilung der einzelnen Behandlungsgruppen als Übersicht mit Anzahl pro Gruppe, Behandlung und Medikation

Gruppe	Anzahl der Tiere / Gruppe	Dilatation	Medikation
Kontrollgruppe	6	ja	Keine Behandlung
Leergelgruppe	5	ja	Pluronicgel ohne PD 98059
40 µM PD 98059 Gruppe	9	ja	40 µM PD 98059 in Pluronicgel
100 µM PD 98059 Gruppe	10	ja	100 µM PD 98059 in Pluronicgel
Scheinoperierte Tiere (SOP)	3	nein	Keine Behandlung

3.4 Histologie

3.4.1 Gewinnung des zu untersuchenden Gewebes für die Histologie

Zum Ansetzen von 4%igem PFA wurden 4 g Paraformaldehyd unter dem Abzug in 1 Liter PBS über Nacht unter Rühren gelöst. Das 4%ige PFA wurde in ein Infusionssystem gefüllt und 1,60 m über dem Operationsfeld aufgehängt um einen gleichmäßigen Infusionsdruck bei voll geöffnetem Infusionssystem zu gewährleisten (Infusionsdruck 120 mbar)

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Xylazin/Ketamin (ungefähr die doppelte der zur Narkose verwendeten Dosierung) getötet. Die beiden Carotiden wurden freipräpariert (vgl. oben erwähnten Präparationsweg). Der Bauch wurde mit einem V-förmigen Schnitt, der von der Symphyse bis an die lateralen Kanten der Rippen reichte, eröffnet. Das Zwerchfell wurde von kaudal entlang der Rippen inzidiert. Mit dem Butterfly, der an das Infusionssystem angeschlossen war, wurde der linke Ventrikel punktiert. Die 4%ige PAF-Infusion wurde im Schuss laufen gelassen, nachdem die Lage des Butterflys überprüft wurde. Nachdem die Lösung ca. 2 Minuten im Schuss lief, wurden kleine Bauchvenen geöffnet, ebenfalls wurden die Aorta abdominalis und die V.cava inf. eröffnet, um einen Gegendruck aus dem sich verhärtenden Gefäßsystem zu vermeiden. Nach weiteren 3 Minuten wurde die Infusion abgestellt. Durch Zug an den

Extremitäten wurde der Fixierungsstand der Tiere beurteilt. Bei noch vorhandener Flexibilität der Extremitäten wurde die Infusion erneut für 2 Minuten fortgesetzt (WARD ET AL. 2000). Beide Carotiden wurden vorsichtig bis zum Aortenbogen freipräpariert und herausgenommen. Die Carotiden wurden in 4% PAF in einem Glasröhrchen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.4.2 Einbettung der Carotiden in Paraffin

Nach Lagerung in dem 4%igen PAF für ca. 12-18 Stunden wurden die entnommenen Gefäße über Nacht in einer 80%igen Ethanollösung gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden sie in einen Einbettungsautomaten überführt. Im Automaten wurden die Präparate in Lösungen mit steigendem Alkoholgehalt entwässert, um Platz für das Lösungsmittel des Einbettungsmittels zu schaffen. Danach folgte die Behandlung der Präparate mit einem Intermedium (z.B. Xylol) zur Entfernung des Alkoholes. Im Anschluss an die Vorbehandlung folgte die eigentliche Einbettung der Präparate durch den Einbettungsautomaten in Paraffin. Bei einer Temperatur von 60°C wurden die derart behandelten Gefäße in der Mitte quer mit einem Skalpell halbiert. Die Gefäßstücke wurden dann mit der Schnittfläche nach unten und senkrecht aufgestellt und mit dem zu Beginn flüssigen Paraffin umspült. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die Gefäße in dem flüssigen Paraffin in senkrechter Lage fixiert wurden. Nach Kontrolle der Stellung der Gefäße im Schnittblock wurde dieser über Nacht bei -20°C zum Aushärten gelagert. Pro Schnittblock wurde jeweils ein Gefäß eingebettet.

3.4.3 Herstellung der Paraffin-Schnitte

Die bei Raumtemperatur gelagerten Paraffinblöcke wurden vor der Weiterverwendung zuerst für ca. 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff gelegt. Nach dem Einspannen des Blocks in ein Mikrotom wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Die Objektträger wurden auf einer Wärmeplatte gelagert und mit Wasser angefeuchtet, so dass die Schnitte sich beim Auflegen auf den Objektträger in dem Wasser gut entfalteten. Unter dem Mikroskop erfolgte die Kontrolle der Neointimadicke, nach Überschreiten der größten Neointimaflächen wurden von dem Block noch weitere Schnitte angefertigt, bis

kaum noch Neointimaausprägung zu erkennen war. So konnte sichergestellt werden, dass die Schnitte mit den sechs größten Neointimaflächen definitiv mit erfasst wurden. Die Objektträger mit den Schnitten wurden auf einer 40°C warmen Wärmeplatte getrocknet. Danach wurden sie bei 60°C über Nacht inkubiert, um vor der Färbung ein komplettes Verdampfen des Wassers zu garantieren.

3.4.4 Färbung der Schnitte

Die Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung der Paraffin-Schnitte erfolgte in einem Färbeautomaten. Es wurde eine HE- Färbung durchgeführt, weil hierbei Lamina elastica interna und externa gut abgegrenzt dargestellt werden.

3.4.5 Histomorphometrische Analyse

Die HE-gefärbten Schnitte wurden unter einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss) mit einem 5er Objektiv betrachtet. Aus dem Segment mit der am stärksten ausgeprägten Neointima wurden sechs Schnitte ausgemessen. Dazu wurde das mikroskopische Bild digitalisiert (Scion Image). Auf einem angeschlossenen Monitor wurden mit Hilfe der Maus die Lamina elastica externa (LEE), die Lamina elastica interna (LEI) und das innere Lumen (L) umfahren, die resultierenden Flächen automatisch berechnet und in μm^2 ausgegeben. Durch Subtrahieren der jeweiligen Flächen voneinander erhielt man dann getrennte Werte in μm^2 für die Media (LEE - LEI) und die Neointima (LEI - L).

3.5 Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen der histomorphometrischen Daten wurden mit dem SAS 6.09 Programm durchgeführt. (SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Version 6, Cary, NC: SAS Institute Inc., Forth Edition 1989.) Die Graphiken wurden im SPSS-Programm (Version 11.0 für Windows) erstellt.

Statistisch geprüft wurden die Hypothesen (H_1), dass (1) PD98059 zu einer Reduktion der Neointimabildung nach Ballondilatation führt und (2) dass sich die Lumenfläche unter PD98059 Behandlung nach Ballondilatation nicht

signifikant verkleinert. Nullhypothese (H_0) ist jeweils, dass PD98059 keinen Effekt auf den untersuchten Parameter hat.

Die vier Versuchsgruppen werden mit einem nichtparametrischen Verfahren (Wilcoxon Rangsummentest) verglichen, weil dieses Verfahren robust gegenüber Ausreißern ist, die aber ebenfalls, wenn auch mit geringeren Wichtungen, in die Berechnungen mit eingehen. Der Wilcoxon Rangsummentest liefert als Ergebnis den p-Wert. Der kann dabei als bedingte Wahrscheinlichkeit aufgefasst werden, die Bedingung ist dabei die angenommene Gültigkeit der Nullhypothese (= kein Effekt). Ist der errechnete p-Wert kleiner oder gleich 0,05, so wird die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis wird als statistisch signifikant bezeichnet.

Alle als signifikant bezeichneten Unterschiede haben p-Werte $< 0,05$. Bei sog. tendenziellen Unterschieden liegen die p-Werte nahe 0,05. Die Höhe des p-Wertes wird dann mit angegeben.

Weiter unten sind alle Größen aufgeführt, die als Absolutwerte (μm^2) oder Verhältniswerte auf statistisch signifikante, aussagekräftige Unterschiede untersucht werden, die auf die pharmakologische Wirkung des PD98059 im Sinne der Reduktion der Neointimabildung bzw. die Beeinflussung eines negativen oder positiven Remodelings hindeuten können.

Verwendete Absolutwerte für statistische Auswertungen in μm^2 :

- Externa operierte Seite
- Media operierte Seite
- Lumen operierte Seite
- Interna operierte Seite
- Neointima operierte Seite
- Externa kontralaterale Seite
- Media kontralaterale Seite
- Lumen kontralaterale Seite

Verwendete Verhältniswerte für statistische Auswertungen:

$$\frac{\text{Externa operierte Seite}}{\text{Externa kontralaterale Seite}}$$

$$\frac{\text{Media operierte Seite}}{\text{Media kontralaterale Seite}}$$

$$\frac{\text{Lumen operierte Seite}}{\text{Lumen kontralaterale Seite}}$$

$$\frac{\text{Lumen operierte Seite}}{\text{Externa kontralaterale Seite}}$$

$$\frac{\text{Media operierte Seite}}{\text{Externa kontralaterale Seite}}$$

$$\frac{\text{Neointima operierte Seite}}{\text{Externa kontralaterale Seite}}$$

$$\text{Relativer Lumenverlust} = \frac{\frac{\text{LumenKO}}{\text{ExternaKO}} - \frac{\text{LumenOP}}{\text{ExternaOP}}}{\frac{\text{LumenKO}}{\text{ExternaKO}}}$$

Im ersten Schritt wurden die Vergleiche zwischen allen Gruppen (Kontrolle, Leergel, 40 µM PD98059, 100 µM PD98059 und SOP) durchgeführt.

Bei allen Gruppenvergleichen fand zunächst ein Globaltest nach Kruskal-Wallis statt (Test auf grundsätzliches Vorhandensein von Unterschieden) und im Anschluss der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen nach Wilcoxon (Rangsummentest siehe Kap. 3.5).

3.6 Westernblot

3.6.1 Proteinextraktion

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Xylazin und Ketamin getötet, und die beiden Carotiden wie bei der Ballondilatation freipräpariert. Die Carotiden wurden kaudal bis zum Aortenbogen und kranial bis zur Carotidgabel herausgenommen. Das Gewebe wurde in Plastikröhren direkt nach der Herausnahme auf Trockeneis schockgefroren und dann bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur Herstellung des Proteinextraktionspuffers wurden 0,0183 g Na_3VO_4 in 85 ml Aqua dest. aufgelöst und auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Lösung wurde aufgekocht und erneut auf einen pH von 10 eingestellt, bis die gelbliche Farbe der Lösung nicht mehr vorhanden war. Die weiteren Substanzen wurden nun der Lösung zugefügt (HU ET AL. 1997).

Tab. 3 Inhaltsstoffe des Proteinextraktionspuffers

Proteinextraktionspuffer für 100 ml	
Substanz	Menge
1mM Na_3VO_4	0,01839g
20mM HEPES (pH 7,4)	0,476g
NaH_2PO_4	0,68995g
2mM EGTA	0.07607g
Complete	2 Tab.
1% Triton X 100	1ml
50mM β -Glycerolphosphat	1,08g
1mM DTT	0,01542g
10% Glycerol	10ml

Die schockgefrorenen Arterien wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert. Das Gewebepulver wurde in 15 ml Falcon-Gefäße überführt, in 200 μl 4°C kaltem Proteinextraktionspuffer suspendiert und mit einem Ultra-Turrax (IKA) 2 mal 30 Sekunden auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 Minuten bei 4°C und 5000g und der Überstand erneut bei 4°C 5 Minuten und 14000g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 5 bis 10 Aliquote pro Carotis aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

3.6.2 Durchführung der Proteinmessung

Für die Proteinstandardreihe wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/ml hergestellt. Dazu wurde das BSA in Proteinextraktionspuffer gelöst. Je Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 5 µl Standard bzw. Proteinextrakt mit 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Extinktion in einem Plattenlesegerät (Dynatech MRX) nach 10 Sekunden Schütteln bei einer Wellenlänge von 750nm gemessen. Extinktions-Konzentrations-Kurven wurden mit Hilfe des Programms Revelation erstellt.

3.6.3 Herstellung Westernblotgele

Die Gelplatten wurden vor Gebrauch mit NaOH, H₂O und 70%igem Ethanol gereinigt. Die beiden Glasplatten und die dazwischen liegenden 1mm-Spacer wurden zusammengesetzt und die Polyacrylamid (PAA)-Gellösung erst unmittelbar nach Zugabe von TEMED mittels Kanüle eingefüllt. Das Gel besteht aus Trenn- und Sammelgel. Zuerst wurde das Trenngel gegossen (bis 0,5-1,0 cm unterhalb des Kamms). Für zwei Gele wurden 15 ml Trenngel hergestellt. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel nach Zugabe von TEMED eingefüllt und der Kamm eingesetzt. Für 2 Gele wurden 5 ml Sammelgel hergestellt. Zur Aufbewahrung kann das Gel in feuchtes Papier und in Plastikfolie eingewickelt und bei 4 °C gelagert werden.

Tab. 4 Inhaltsstoffe des Trenn- und Sammelgels

Gelansatz für Trenngel für 15 ml (10% SDS-PAA-Gel)	
Substanz	Menge
Acryl/Bisacrylamid (30:0.8)	4,5 ml
1,5 M Tris-Base pH 8,8	3,75 ml
20% SDS	75 µl
Aqua dest.	6,675 ml
10% APS	150 µl
Temed	15 µl

Gelansatz für Sammelgel für 5 ml (5% SDS-PAA-Gel)	
Substanz	Menge
Acryl-/Bisacrylamid (30:0.8)	835 µl
0,5 M Tris-Base pH 6,8	1,25 ml
20% SDS	25 µl
Aqua dest.	2,89 ml
10% APS	50 µl
Temed	5 µl

3.6.4 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Vor Beladen des Gels (pro Geltasche 10 µg Protein in Laemmli-Puffer) wurde das Protein 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer nach Laemmli bei einer Spannung von 90V für 80 bis 100 Minuten in einer Mini-Protein Kammer (Bio-Rad), bis die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Tab. 5 Elektrophoresepuffer

Puffer	Inhaltsstoffe	Menge ad 5l Aqua dest.
Elektrophoresepuffer (nach Laemmli)	25mM Trisbase	15g
	192mM Glycin	72g
	0,1% SDS	5g

3.6.5 Transfer auf die Nitrozellulosemembran

Nach dem Lauf wurde das Gelsandwich aus der Apparatur ausgebaut und in eine Wanne mit Transferpuffer gelegt. Der Transfer erfolgte mittels *Semi-dry-Blot* (BIOMETRA 1993). Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode, Whatman-Papier, Protran Nitrocellulose-Transfermembran (Schleicher & Schuell), PAA-Gel (nach Entfernen des Sammelgels), Whatman-Papier, Kathode. Sowohl das Whatman-Papier als auch die Membran wurden vorher in Transferpuffer eingeweicht. Beim Aufbau muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen entstehen. Die Apparatur wurde gleichmäßig und fest geschlossen und mit 1-2 kg Gewicht beschwert. Die Wasserkühlung und die Spannung wurden angeschlossen. Die maximale Stromstärke betrug 5 mA pro cm² Gelfläche, die maximale Leistung maximal 10 Watt. Der Transfer dauerte 1 bis 2 Stunden.

Tab. 6 Transferpuffer

Puffer	Inhaltsstoffe
Transferpuffer für 150 ml	25mM Trisbase
	150mM Glycin
	10% Methanol
	auf pH 8,3 einstellen

3.6.6 Färbung der transferierten Proteine

Die Nitrozellulosemembran wurde vorsichtig in eine Plastikschüssel mit Ponceau S gelegt und ca. 30 bis 60 sec. geschüttelt. Die Membran wurde mit Aqua dest. abgespült, bis nur noch die gefärbten Proteinbanden zu sehen waren. Die Membran wurde dann auf Whatman-Papier getrocknet und die Spur mit dem Molekulargewichtsstandard abgetrennt.

3.6.7 Blockade der unspezifischen Proteinbindungen

Blockiert wurde mit 5% Milchpulver in 1xTBS. Pro Blot werden 25 ml verwendet. (2,5 g Milchpulver pro 50ml TBS). Unter leichten Schüttelbewegungen wurden die Blots für 2,0 - 2,5 Stunden in der Blocklösung inkubiert.

3.6.8 Waschen

Die Membran wurde ein Mal in TBS für 10 Minuten und 3 Mal in TBS +1% Tween für 10 Minuten gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Membran mit aqua dest. abgespült.

3.6.9 Inkubation mit dem Primärantikörper

Für den Nachweis der p44/p42 MAP Kinase wurden 2µl/ml [1:1000 Verdünnung] Antikörper und für den Nachweis von phosphoryliertem p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) 1µl/ml [1:1000 Verdünnung] Antikörper verwendet. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper in 5 ml 0,5% Milchpulver in 1x TBS [0,025 g Milchpulver in 5 ml TBS] über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Der Waschvorgang wurde, wie unter 3.6.8 beschrieben, wiederholt.

3.6.10 Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Bei dem p42/44 MAP Kinase Antikörper handelt es sich um einen aus dem Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper. Deshalb wird als Sekundärantikörper ein Anti-Rabbit Antikörper verwendet (1:5000 verdünnt). Der phosphospezifische p42/44 MAP Kinase Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper. Daher wurde als Sekundärantikörper ein Anti-Mouse Antikörper (1:5000 verdünnt) verwendet. Die Sekundärantikörper wurden mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, um später eine Lumineszenzreaktion zu katalysieren. Die Membranen wurden in 5 ml 0,5% Milchpulver + 1xTBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde, wie oben beschrieben, wiederholt, um nicht gebundene Antikörper abzuwaschen.

3.6.11 Detektionsreaktion

Zur Detektion diente ECL- (*enhanced chemo luminescence*) Reagenz. Nach Trockentupfen der Membran wurden pro Membran 2,5 ml Reagenz A und 2,5 ml Reagenz B zusammen gemischt. Anschließend ließ man das Reagenz für 1 Minute unter leichtem Schwenken einwirken. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Whatman-Papier abgetupft und die Membran zwischen zwei Kopierfolien gelegt, die an den Rändern mit Tesafilm zugeklebt wurden. Zur Signaldetektion wurde Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) zwischen 10 und 60 Sekunden exponiert.

4 Ergebnisse

4.1 Morphometrische Analysen der mit PD98059 behandelten Carotiden

In dieser Arbeit wurde der Effekt von PD98059 auf die Schnittflächen von der Neointima-, der Media-, der Gesamtgefäßfläche und die Verhältnisse der einzelnen Flächen untereinander am histologischen Präparat (Gefäßquerschnitt) untersucht. Die histomorphometrischen Untersuchungen der Arteria carotis communis erfolgten vierzehn Tage nach Ballondilatation. Im Folgenden soll anhand der in fünf verschiedenen Behandlungsgruppen gemessenen Carotidenschnittflächen, welche in Abbildung Nr. 4 aufgeführt werden, der Effekt der unterschiedlichen Behandlungen gezeigt werden.

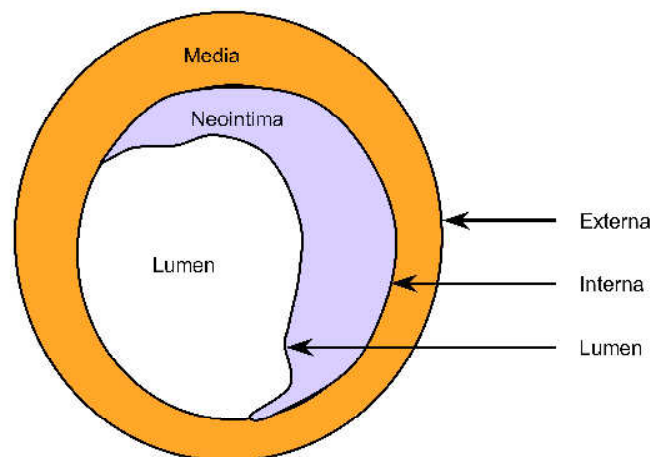


Abb. 4 Schematische Darstellung der einzelnen Flächen und Schichten eines Gefäßes, welches nach einer Ballondilatation ausgemessen wurde.

Die Abbildungen Nr. 5, 6, 7 zeigen repräsentative mikroskopische Darstellungen der einzelnen Schnitte der A. carotis, wie sie in den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet wurden, sowie ein Beispiel der nicht operierten Arterie der kontralateralen Seite. Anhand der Abbildungen ist die unterschiedliche Neointimaproliferation nach Ballondilatation zu erkennen.

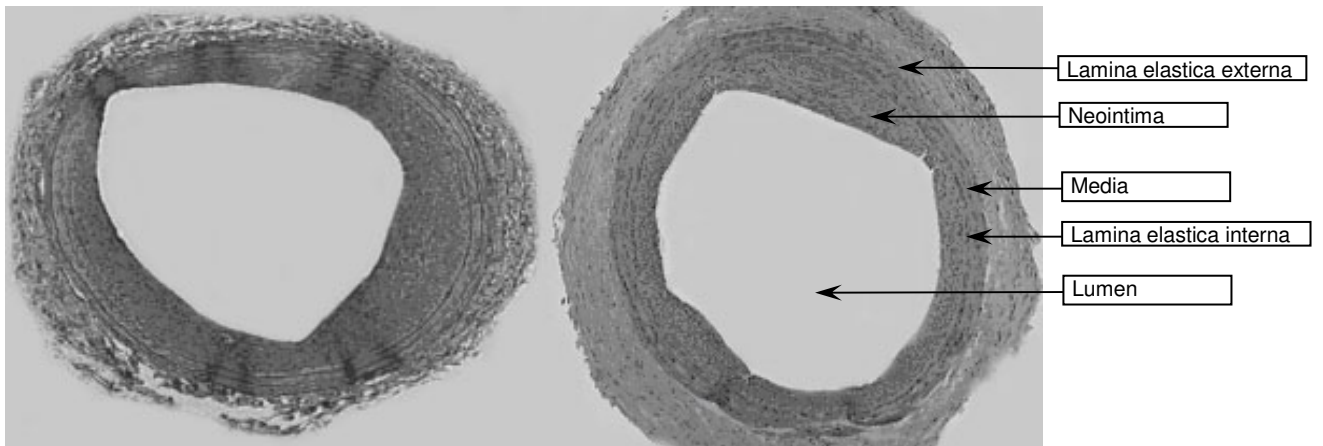


Abb. 5 Darstellung von Kontrollschnitten. Links: A. carotis nach Dilatation ohne jegliche Behandlung. Rechts: A. carotis nach Dilatation und Behandlung mit wirkstofffreiem Pluronic Gel.

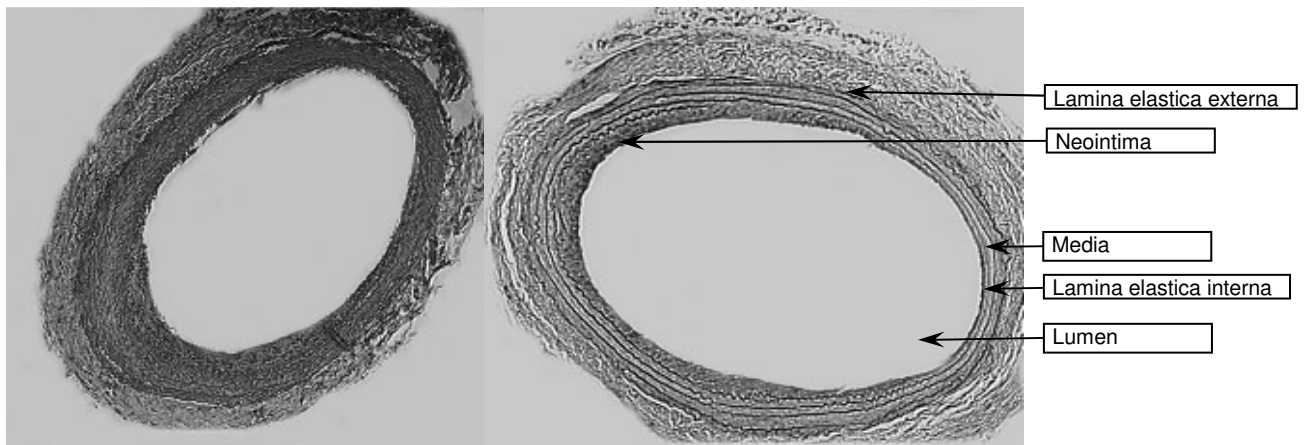


Abb. 6 A. Carotis nach Dilatation und PD98059 Behandlung. Links: 40 µM PD98059. Rechts: 100 µM PD98059.

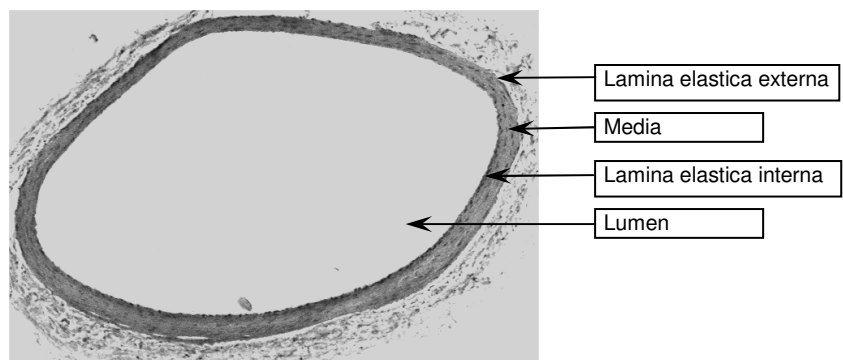


Abb. 7 Darstellung einer nicht operierten Arteria carotis communis

4.2 Vergleiche der Gruppen „Kontrolle“ und „Leergel“ und Beurteilung der Wirkung der Scheinoperation (SOP)

Die statistischen Untersuchungen aller absoluten Messdaten sowie aller vergleichenden Verhältniswerte ergaben zwischen der Kontroll- und Leergelgruppe in keinem einzigen Fall signifikante Unterschiede.

Durch die Scheinoperation war es in keinem Fall zur Ausbildung einer Neointima gekommen. Hinweise auf eine Veränderung der Media, also auf ein eventuelles Remodeling, ergaben sich ebenfalls nicht. Die Entwicklung der Externa, der Media und des Lumens der operierten Seite gegenüber den entsprechenden Werten der kontralateralen Seite zeigte keine Auffälligkeiten.

Aus diesem Grunde wurden in der Folge nur noch Tests zwischen den Messgrößen der Gruppen Leergel, 40 μM PD98059 und 100 μM PD98059 für den Nachweis der Wirksamkeit des PD98059 herangezogen.

4.3 Vergleichende Übersicht der Mittelwerte der Messwerte der Behandlungsgruppen Leergel, 40 μ M PD98059 und 100 μ M PD98059

Vor Beginn der eigentlichen statistischen Vergleiche sollte ein orientierender Vergleich der nichtnormierten Mittelwerte der gemessenen Parameter in den einzelnen Behandlungsgruppen Hinweise auf mögliche Effekte geben (Abb. 8 und 9).

Auffällig sind in diesen Darstellungen drei Beobachtungen:

1. Die Externawerte der kontralateralen Seite liegen in allen drei Gruppen in einem relativ engen Bereich und bieten sich deshalb als Normierungsparameter an. Die spätere statistische Überprüfung auf Unterscheidbarkeit deutet mit Werten für $p < 0,05$ auf keine signifikanten Unterschiede hin.
2. Die Werte für Externa, Interna, Lumen und Neointima in der 100 μ M PD98059 Gruppe erscheinen deutlich größer als die entsprechenden Werte in den anderen operierten Gruppen und ebenso im Vergleich zu den Werten der jeweils kontralateralen Seite. Hier ist jedoch darauf hinzuweisen, dass dieses eine Mittelwertberechnung ist und mögliche Ausreißerwerte den gesamten Wert tendentiell verschieben können.
3. Die Neointimabildung in der Leergelgruppe ist erwartungsgemäß deutlicher als in den Gruppen mit PD98059-Behandlung. In der 100 μ M PD98059-Gruppe ist jedoch keine deutliche Reduktion der Neointimabildung darstellbar. Dagegen zeigt die 40 μ M PD98059-Gruppe eine deutliche Reduktion der Neointimafläche.

Ergebnisse

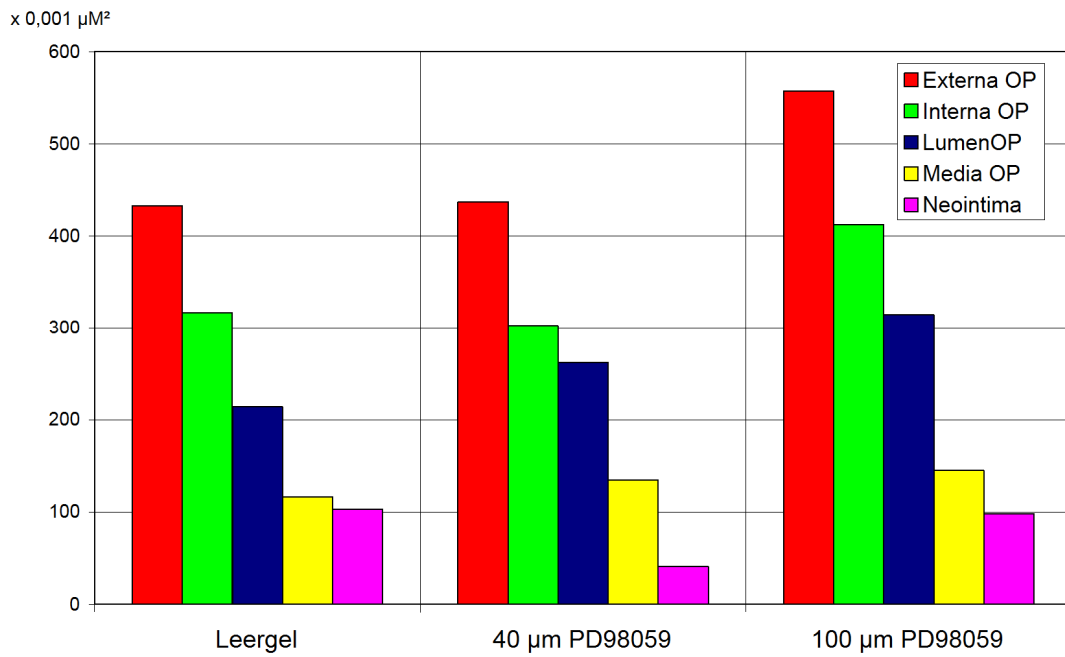


Abb. 8 Darstellung der Mittelwerte (in μm^2) für Externa, Interna, Lumen, Media und Neointima der operierten Seiten

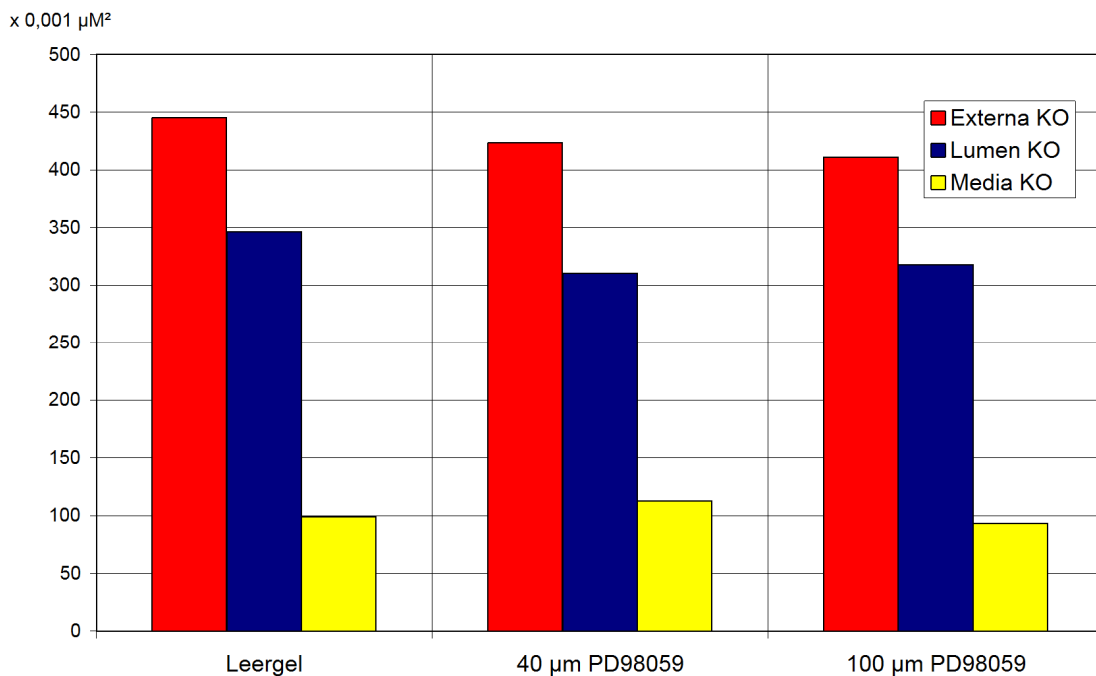


Abb. 9 Darstellung der Mittelwerte (in μm^2) für Externa, Lumen und Media der kontralateralen Seiten

4.4 Vergleichende Untersuchung der absoluten Größen von Externa, Media, Interna, Neointima und Lumen der operierten Seiten

Die Externa der 100 μM PD98059 Gruppe ist sowohl signifikant größer als die der 40 μM PD98059 Gruppe als auch die der Leergelgruppe.

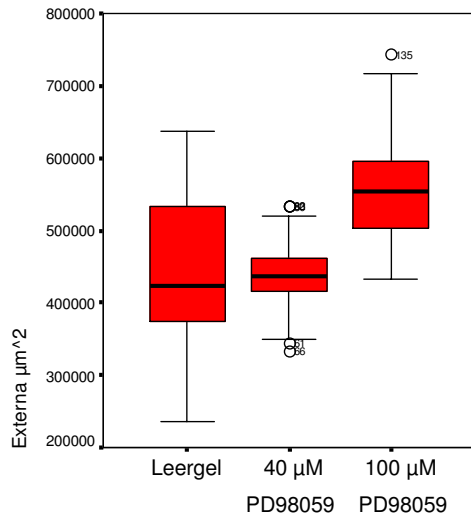
Auch die Interna der 100 μM PD98059 Gruppe ist signifikant größer als die der 40 μM PD98059 Gruppe und tendenziell größer ($p=0,0757$) als die der Leergelgruppe.

Die Neointima der 100 μM PD98059 Gruppe ist signifikant größer als die der 40 μM PD98059 Gruppe, und ebenso ist die Neointima der Leergelgruppe signifikant größer als die der 40 μM PD98059 Gruppe. Zwischen den Werten der 100 μM PD98059 Gruppe und der Leergelgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

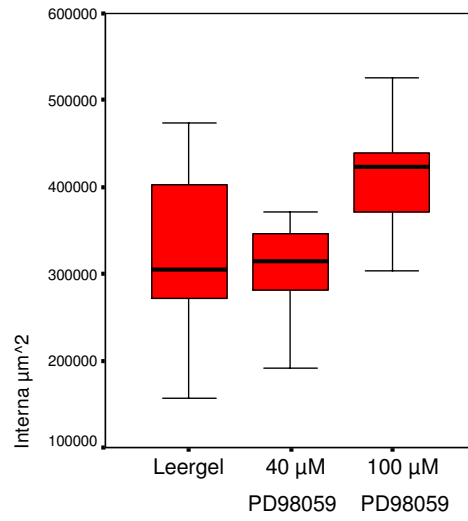
Das Lumen der 100 μM PD98059 Gruppe ist signifikant größer als das der Leergelgruppe und tendenziell größer ($p=0,066$) als das der 40 μM PD98059 Gruppe. Das Lumen der 40 μM PD98059 Gruppe und das der Leergelgruppe zeigen keinen signifikanten Unterschied.

Die Werte der Media zeigen bei keinem der Paarvergleiche innerhalb der Dreiergruppe signifikante Unterschiede. Anzumerken ist jedoch, dass sowohl die 40 μM PD98059 Gruppe als auch die 100 μM PD98059 Gruppe signifikant höhere Werte als die der Kontrollgruppe aufweisen.

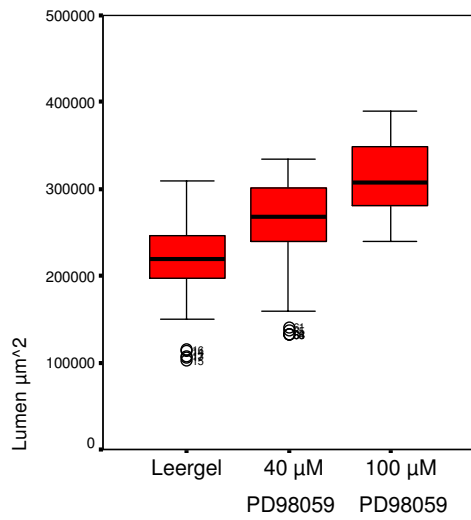
Ergebnisse



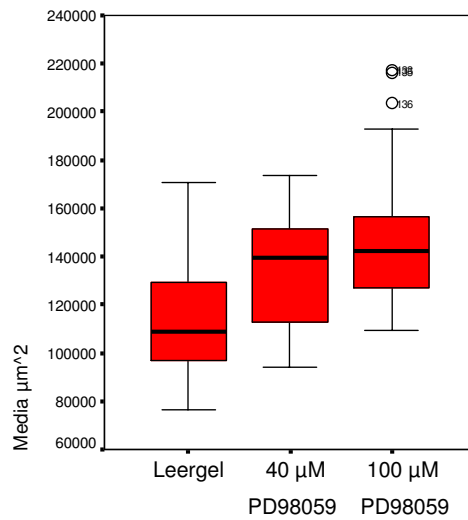
Vergleich absolute Externaflächen operierte Seite		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,7895	0,0576
40 µM PD98059	-	0,0009



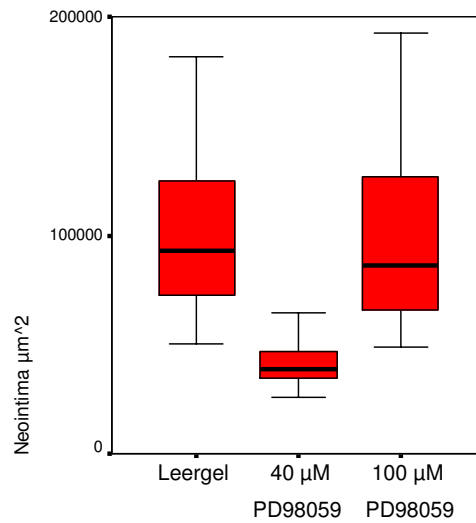
Vergleich absolute Internaflächen operierte Seite		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,7895	0,0758
40 µM PD98059	-	0,0005



Vergleich absolute Lumenflächen operierte Seite		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,1092	0,0040
40 µM PD98059	-	0,0661



Vergleich absolute Mediaflächen operierte Seite		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,1819	0,0982
40 µM PD98059	-	0,4377



Vergleich absolute Neointimaflächen		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,0033	0,6682
40 µM PD98059	-	0,0004

Abb. 10 Auswertungen der absoluten Größen der Messwerte von Externa, Interna, Lumen, Media und Neointima der operierten Seiten für die Behandlungsgruppen Leergel, 40 µM PD98059 und 100 µM PD98059

Diese Vergleiche deuten auf zwei Fakten hin:

1. Die Neointimabildung wird durch PD98059 unterdrückt (40 µM PD98059 << Leergel). Eine Steigerung der Konzentration auf 100 µM PD98059 scheint diesen Effekt nicht zu verstärken.
2. Die verbleibende Lumenfläche ist in der 100 µM PD98059 Gruppe größer als in den beiden anderen Behandlungsgruppen. Dies gilt auch für die Externa und die Interna.

Insgesamt fallen in allen Gruppen Ausreißerwerte auf. In der 100 µM PD98059 Gruppe liegen zum Beispiel bei den Externa-, Media- und Neointimawerten deutliche Ausreißer nach oben vor.

Diese vorläufigen Erkenntnisse sollen in der Folge durch die Untersuchung von Verhältniswerten näher analysiert werden.

4.5 Vergleich der Verhältnisse der Messgrößen der operierten und kontralateralen (nichtoperierten) Seiten

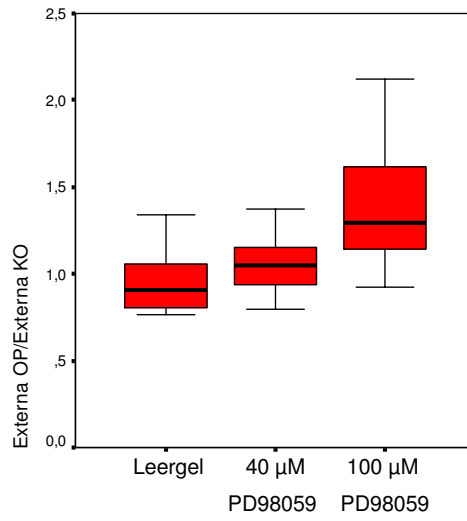
Die Gegenüberstellung der Verhältniszerte Messgröße OP/ Messgröße KO soll weitere Aufschlüsse über die Entwicklung der Gefäßparameter nach Operation und Behandlung ergeben.

Die Verhältniszerte Lumen OP/ Lumen KO sind für beide Gruppen mit Wirkstoffbehandlung signifikant größer als die der Leergelgruppe. Die Gruppen 40 μM PD98059 und 100 μM PD98059 sind nicht signifikant unterschiedlich. In der 40 μM PD98059-Gruppe kommt dieser Effekt durch eine deutliche Reduktion der Neointimafläche zustande. Dagegen ist in der 100 μM PD98059-Gruppe eine Vergrößerung der Lumenfläche ohne deutliche Reduktion der Neointima dafür verantwortlich.

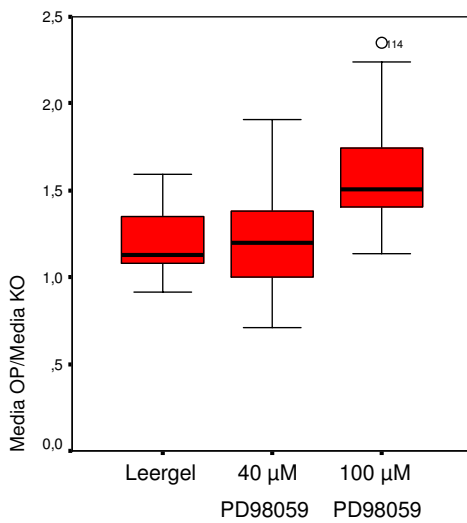
Es fällt auf, dass die Verhältniszerte Media OP/ Media KO in der 100 μM PD98059 Gruppe sowohl signifikant größer als in der Leergelgruppe als auch größer als in der 40 μM PD98059 Gruppe sind. Dies ist ein Indiz für eine Verstärkung der Media in der 100 μM PD98059 Gruppe. Die Werte für die Gruppen 40 μM PD98059 und Leergel sind nicht signifikant unterschiedlich.

Bei dem Vergleich der Verhältniszerte Ext OP/ Ext KO zeigt sich ebenfalls, dass die 100 μM PD98059 Werte signifikant größer sind als die der Leergelgruppe und der 40 μM PD98059 Gruppe. 40 μM PD98059 und Leergel zeigen auch hier keine signifikanten Differenzen.

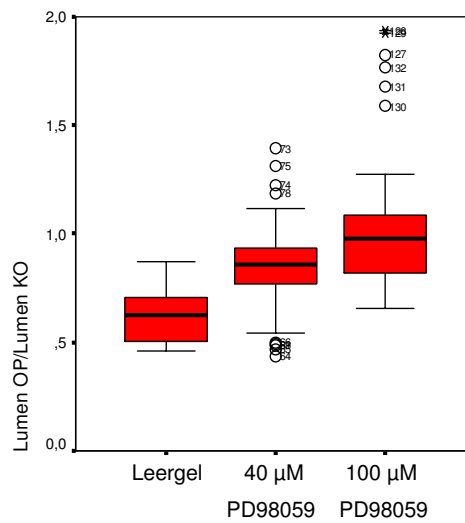
Die Gefäßabmessungen nach der Ballondilatation in der 100 μM PD98059 Gruppe sind insgesamt größer als die in den beiden anderen Gruppen.



Vergleich Externa OP/ Externa KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,3506	0,0120
40 µM PD98059	-	0,0062



Vergleich Media OP/ Media KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,6892	0,0120
40 µM PD98059	-	0,0305



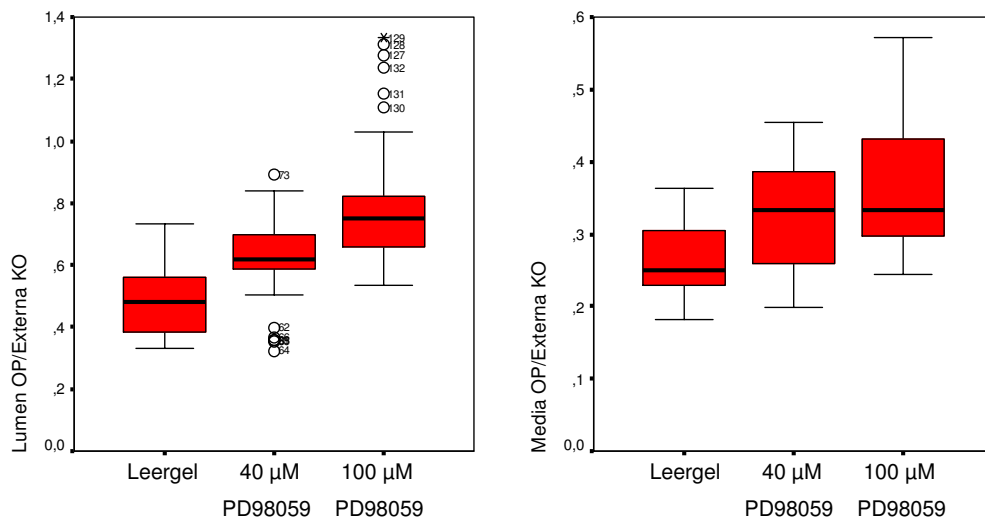
Vergleich Lumen OP/ Lumen KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,0234	0,0027
40 µM PD98059	-	0,2364

Abb. 11 Auswertungen für die Verhältnisse ExternaOP/ExternaKO, MediaOP/MediaKO und LumenOP/LumenKO für die drei Behandlungsgruppen Leergel, 40 µM PD98059 und 100 µM PD98059

4.6 Vergleiche der auf die Externa der kontralateralen Seite normierten Messgrößen

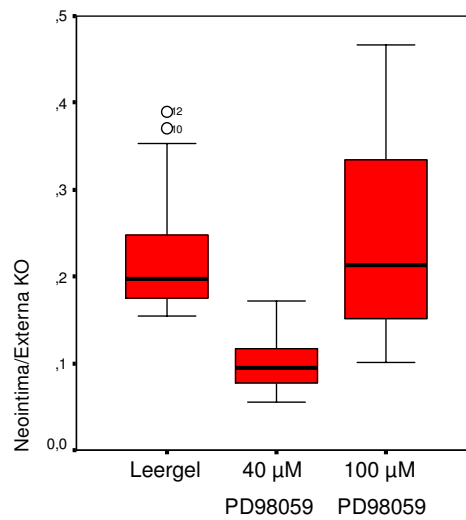
Die Externawerte der kontralateralen Seite zeigten in den Flächenmaßen keinen signifikanten Unterschied. Deshalb eignen sich die Externawerte als Normierungsparameter.

Die Externa der kontralateralen Seite repräsentiert ein Maß für die Größenverhältnisse der unbeeinflussten Gefäße und ist damit am ehesten auch ein Maß für die Größenverhältnisse der operierten Seite vor der Operation. Intraindividuelle Größenunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sollen hiermit bestmöglich normiert werden.



Vergleich Lumen OP/ Externa KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,0234	0,0027
40 µM PD98059	-	0,0373

Vergleich Media OP/ Externa KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,1096	0,0235
40 µM PD98059	-	0,4877



Vergleich Neointima OP/ Externa KO		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,0034	0,8542
40 µM PD98059	-	0,0007

Abb. 12 Auswertungen für die Verhältnisse LumenOP/ExternaKO, MediaOP/ExternaKO und Neointima/ExternaKO für die Behandlungsgruppen Leergel, 40 µM PD98059 und 100 µM PD98059

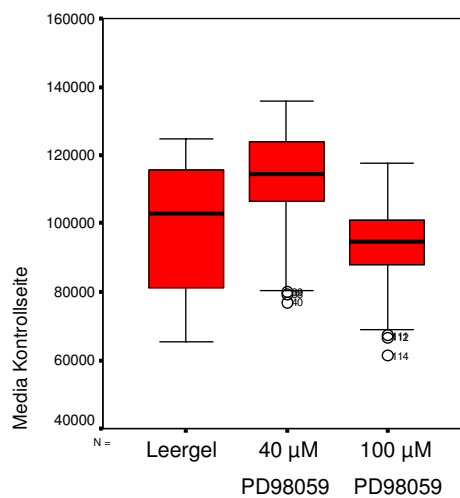
Bei dem Verhältnis Lumen OP/ Externa KO zeigt sich, dass der 100 µM PD98059 Wert signifikant größer ist als der Wert für die Leergel- als auch für die 40 µM PD98059 Gruppe. Der Wert für die 40 µM PD98059 Gruppe ist ebenfalls signifikant größer als der der Leergelgruppe. Dies zeigt sowohl den Effekt der PD98059 Behandlung generell als auch den positivsten therapeutischen Effekt bezüglich des Strömungsquerschnittes bei der höheren Wirkstoffkonzentration trotz geringerer Inhibierung der Neointimabildung in dieser Gruppe.

Das Verhältnis Media OP/ Externa KO zeigt nur bei dem Vergleich 100 µM PD98059 zu Leergel einen signifikant größeren Wert für die 100 µM PD98059 Gruppe.

Beim Vergleich der Neointimabildung der Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Ext KO verstärkt sich das bereits oben gezeigte Bild: Die Verhältniszahl ist für die 40 µM PD98059 Gruppe signifikant kleiner als für die beiden anderen Behandlungsgruppen, während sich für die Leergelgruppe und 100 µM PD98059 Gruppe kein signifikanter Unterschied zeigt.

4.7 Vergleich der auf die Media der kontralateralen Seite normierten Messgrößen

Beim Vergleich der Mediawerte der kontralateralen Seite in den drei relevanten Versuchsgruppen zeigte sich ein anderes Bild als bei den Werten für die Externa: Während letztere sich statistisch nicht unterschieden, zeigte sich in der Gruppe der Mediawerte ein signifikanter Unterschied insbesondere zwischen den Mediagrößen der 40 μM gegenüber 100 μM - Gruppe. Die Werte der Leergelgruppe und der 100 μM - Gruppe unterschieden sich statistisch nicht.



Vergleich Media KO		
P-Werte	40 μM PD98059	100 μM PD98059
Leergel	0,2301	0,5006
40 μM PD98059	-	0,0101

Abb. 13 Absolute Werte der Media der kontralateralen Seite bzgl. Gruppen

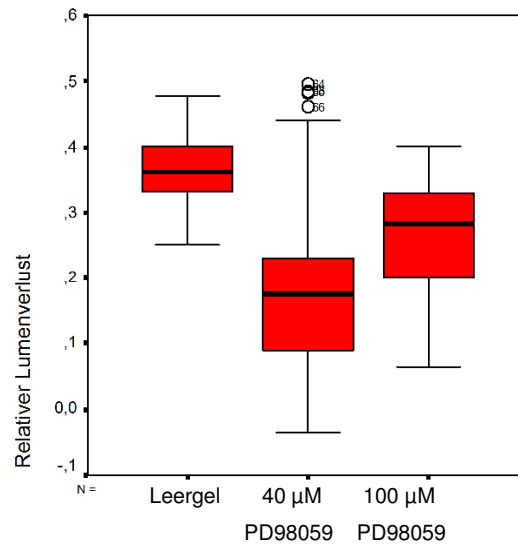
Die Mediaflächen der kontralateralen Seite boten sich wegen der deutlichen Unterschiede in den Gruppen 40 μM und 100 μM deshalb nicht per se als Normierungsparameter an. Die Verhältniswerte MediaOP / Media KO (Abb. 13) sowie Media OP / Externa KO (Abb. 12) zeigten bereits eindeutig die Flächenzunahme der Media insbesondere in der 100 μM Gruppe auf der operierten Seite. Zusätzliche Erkenntnisse wurden deshalb aus der Quotientenbildung Messwert/ Media KO nicht erwartet.

4.8 Relativer Lumenverlust

Als relativen Lumenverlust bezeichnet man das Verhältnis:

$$\text{Relativer Lumenverlust} = \frac{\frac{\text{LumenKO}}{\text{ExternaKO}} - \frac{\text{LumenOP}}{\text{ExternaOP}}}{\frac{\text{LumenKO}}{\text{ExternaKO}}}$$

Dieser Vergleichsparameter berücksichtigt durch die Einbeziehung der Externawerte auch die Größenverhältnisse der operierten und nichtoperierten Seiten. In Abbildung 14 werden die Werte für den relativen Lumenverlust für die drei Behandlungsgruppen dargestellt.



Vergleich Relativer Lumenverlust		
P-Werte	40 µM PD98059	100 µM PD98059
Leergel	0,0234	0,0321
40 µM PD98059	-	0,0662

Abb. 14 Relativer Lumenverlust in den Gruppen Leergel, 40 µM PD98059 und 100 µM PD98059

Der relative Lumenverlust ist signifikant kleiner für beide PD98059 Gruppen im Vergleich zur Leergelgruppe. Der relative Lumenverlust in der 40 µM PD98059 Gruppe war tendenziell (p=0,066) kleiner als in der 100 µM PD98059 Gruppe. Auch diese Ergebnisse zeigen die günstige Entwicklung der Neointimabildung in der 40 µM PD98059 Gruppe, die sich erst bei der vergleichenden Betrachtung der absoluten Werte für die 100 µM PD98059 Gruppe relativiert (siehe Abb. 8 und Abb.9).

4.9 Morphometrische Ergebnisse.

Die Analyse der absoluten und relativen Größen der Gefäßparameter auf der operierten und kontralateralen Seite ergibt folgendes Bild:

1. PD98059 hat einen deutlich positiven (hemmenden) Einfluss auf die Neointimabildung in der 40 μM PD98059 Gruppe. Diese spiegelt sich in einer Verringerung der Neointimabildung von 60% gegenüber der Leergelgruppe wider.
2. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Neointimabildung konnte bei den gewählten Konzentrationen auf Grund der unerwarteten Ergebnisse in der 100 μM Gruppe (geringere Neointimahemmung bei gleichzeitiger Lumenverbesserung) nicht gezeigt werden.
3. Unter der höheren Wirkstoffkonzentration 100 μM PD98059 kommt es zu einer deutlichen Größenzunahme des Gefäßumfangs. Zusätzlich sind hierdurch fast alle Gefäßparameter in dieser Gruppe im Vergleich zur kontralateralen Seite und im Vergleich zu den anderen Gruppen größer. Das absolute Lumen ist, trotz geringerer Neointimahemmung, 47% größer als das der Leergelgruppe (vgl. Abb 8 und 9).

4.10 Expression von p42/44 MAPK

Es wurde mittels Western blot untersucht, ob eine Hemmung durch PD98059 auch zu einer Reduktion der Phosphorylierung der p42/44 MAPK kommt. Zur Untersuchung der Phosphorylierung der p42/44 MAPK wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung die Gefäße entnommen und vier verschiedene Formen der Behandlung gewählt. Bei der Festlegung der Zeitpunkte erfolgte eine Anlehnung an die Ergebnisse aus bereits durchgeführten Studien der pharmakologischen Hemmung der Mitogen-aktivierten ERK Kinase auf morphometrische Gefäßparameter im Verletzungsmodell der A. carotis der Ratte. Hier wurde gezeigt, dass eine Aktivierung bereits nach 5 Minuten beginnt und nach einer Stunde noch auf einem hohen Niveau liegt. Nach 7 Tagen ist die Aktivierung noch deutlich vorhanden und zeigt ein zweites, flacheres Maximum (HU ET AL. 1997).

Tab. 7 Einteilung der einzelnen untersuchten Gruppen

Gruppen	Behandlung	Zeitpunkt der Entnahme
1	Nicht operierte Kontrollseite linke Carotide	Tag 7
2	Ballondilatation und Behandlung mit Leergel	Tag 7
3	Ballondilatation und Behandlung mit 40 µM PD 98059 in Pluronicgel	Tag 7
4	Keine Dilatation, keine Behandlung. Scheinoperation	1 Stunde
5	Ballondilatation und Behandlung mit Leergel	1 Stunde
6	Ballondilatation und Behandlung mit 40 µM PD 98059 in Pluronicgel	1 Stunde

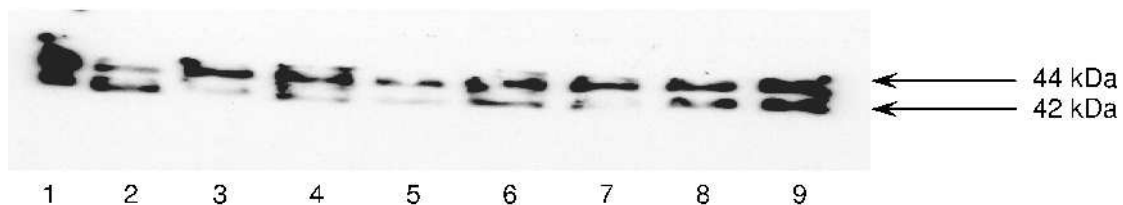


Abb. 15 Proteinexpression von Erk1/2 (p44/p42) in der A. carotis der Ratte (Western blot). Spur 1 bis 3: Kontralaterale Seite. Spur 4 bis 6: Leergel, Tag 7 nach OP. Spur 7 bis 9: 40 µM PD98059, Tag 7 nach OP

Die Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse, bei welchen der Primärantikörper p42/44 Kinase Antikörper unabhängig vom Zustand der Phosphorylierung von ERK 1/2 detektiert.

Die Analyse der Proteinexpression von p42/44 am Tag 7 nach der OP zeigt keine wesentliche Differenz im Vergleich der kontralateralen Seite, der Leergelgruppe und der 40 μ M Gruppe. Es zeigt sich insbesondere, dass es zu keiner wesentlichen Induktion der p42/44 Expression durch die arterielle Verletzung kommt. Ein wesentlicher Effekt der Behandlung mit PD98059 ist ebenfalls nicht zu erkennen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Expression von Phospho-ERK1/2 1 Stunde nach OP zeigt Abbildung 16.

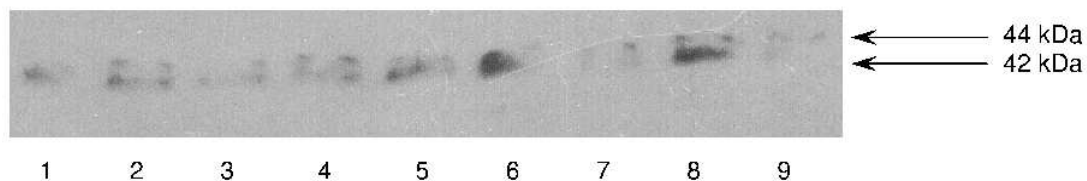


Abb. 16 Proteinexpression von der phosphorylierten ERK1/2 (p44/p42) in der A. carotis (Westernblot). Spur 1 bis 3: scheinoperierte Tiere. Spur 4 bis 6: Leergel 1 Std. nach OP. Spur 7 bis 9: 40 μ M PD98059 1 Std. nach OP.

Der Westernblot zeigt bereits bei den scheinoperierten Tieren eine geringe basale ERK1/2-Phosphorylierung (d.h. Aktivierung). Eine eindeutige Änderung des Phosphorylierungsstatus in den operierten bzw. in den mit PD98059 behandelten Arterien ist jedoch nicht nachweisbar. Allenfalls ist eine Tendenz zu stärkeren Signalen bei den mit Leergel behandelten Gefäßen ein Hinweis darauf, dass eine Aktivierung der p42/44 MAPK durch Phosphorylierung stattgefunden hat. Insgesamt kann für den untersuchten Zeitpunkt eine Verminderung der Aktivierung von ERK1/2 durch PD98059 nicht gezeigt werden.

5 Diskussion

5.1 Versuchsmodell

Zur Überprüfung interventioneller Techniken in der Entwicklungsphase sowie deren Verbesserung sind experimentelle Ansätze an Tiermodellen unverzichtbar. Die Aussagekraft von in vivo Versuchen ist umso höher, je mehr sich Anatomie, Histologie und Metabolismus des Versuchsmodells denen des Menschen ähneln.

Atherosklerotische Herzerkrankungen und Restenosen entwickeln sich nicht entsprechend der klinischen Situation beim menschlichen Patienten. Deshalb muß der Stenosereiz artifiziell erzeugt werden, wie z. B. in dieser Arbeit durch Ballondilatation der Arteria carotis communis der Ratte.

Kleintiere (Ratten, Hamster oder Kaninchen) sind leichter verfügbar und standardisierbar als Großtiere (Hunde, Schweine, Primaten). Jene erlauben jedoch wegen der Größenverhältnisse eher den Einsatz der Katheter, die im Humanbereich angewendet werden.

Die Arteria carotis communis der Ratte wird häufig als Modell für eine proliferative Reaktion auf einen Verletzungsstimulus genutzt. Dies obwohl sich die Struktur der Rattengefäße deutlich von der humaner Arterien unterscheidet. Im Rattengefäß finden sich deutlich weniger elastische Fasern in der Media. Subendothelial finden sich bei der Ratte keine glatten Muskelzellen sowie Kollagene oder elastische Fasern (MUELLER ET AL. 1992). In den Arterien der Ratte befinden sich die Vasa vasorum nur in der Adventitia. Im Humanbereich spielt die Vasa vasorum eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf und Heilung von mechanischen Verletzungen (JENKINS ET AL. 1999, MCGEACHIE ET AL. 1982, PINTO ET AL. 1998).

Für das Rattenmodell sprechen die Neointimabildung und die Reaktion der Media nach Verletzungen. Ähnlich wie beim Menschen findet die Neointimabildung ihren Ausgang sowohl durch Proliferation und Migration von VSCMs der Media. Jedoch muß kritisch betrachtet werden, dass es sich bei dem gewählten Rattenmodell um nicht genetisch belastete oder durch äußere Faktoren bereits vorgeschädigte Arterien (Nikotinabusus, arterielle Hypertonie,

Diabetes mellitus etc.) handelt. Um hier eine bessere Übertragbarkeit des Rattenmodells auf den Menschen zu erreichen, bestünde die Möglichkeit, Tiere mit höherem Lebensalter zu verwenden. Hier zeigten Studien, dass es z.B. zu einer altersabhängigen gesteigerten Muskelproliferation nach Ballonkatheterverletzung gekommen ist. (STEMERMANN ET AL. 1982). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zu einer altersabhängigen erhöhten Aktivität der MAPK-Aktivierung kommt. Erhöhte Blutdruckwerte gingen ebenfalls mit einer deutlichen Erhöhung der aktivierten MAP-Kinasen einher (RICE ET AL. 2005). Es konnten bereits altersabhängige Unterschiede gezeigt werden, bei denen PD98059 eine deutliche Hemmung der aktivierten MAPK und damit eine Reduktion der Proliferation der VSMC aus Rattenaorten hervorgerufen hat (LI ET AL. 2003).

Auch in caninen A. femoralis konnte der Nachweis einer erhöhten Neointimabildung bei älteren Tieren erfolgen. Dieser ging mit einer erhöhten ERK-Aktivität einher, bei der eine signifikante Hemmung durch PD98059 erreicht werden konnte (GENNARO ET AL. 2003).

Auch das Kaninchen wurde häufig und erfolgreich als Modell für künstlich induzierbare Atherosklerose eingesetzt (SCHWARTZ ET AL. 1994, SERRUYS ET AL. 1994, SIEVERT ET AL. 1999, SIGWART ET AL. 1995). Die peripheren Arterien des Kaninchens sind fast mit der Größe humaner Koronargefäße vergleichbar. Sie weisen aber zahlreiche Abzweigungen auf, so dass sich eine standardisierte Medikamentenapplikation nur schlecht realisieren lässt. Die starke Vasoreaktivität beim Einsatz von Kathetern wird ebenfalls als nachteilig angesehen (MUELLER ET AL. 1992).

Die Größenverhältnisse von Koronargefäßen großer Hunde kommen denen des Menschen sehr nahe (SCHWARTZ ET AL. 1994). Die Reaktionen von Koronargefäßen nach artifiziellen Verletzungen unterscheiden sich jedoch deutlich von denen beim Menschen, was u.a. der hohen fibrinolytischen Aktivität des Blutserums zugeschrieben wird.

Primaten wie Rhesusaffen (VESSELINOVITCH ET AL. 1988) und Paviane (HANSON ET AL. 1991) zeigten nach dem Einsatz von klinisch relevanten Kathetern und standardisierten Verletzungen uneinheitliche Reaktionen der Koronargefäße, was die Übertragbarkeit auf die klinische Situation unsicher macht. Primaten

sind überdies sehr teuer, ihre Haltung ist schwierig, und der Einsatz ist in vielen Ländern der Erde an strenge ethische Kriterien gebunden.

Schweine zeigen bezüglich des Koronarsystems (Größe, Histologie) die größte Ähnlichkeit mit dem des Menschen (FRENCH ET AL. 1965). Die Arterien sind operativ leicht zu handhaben und die Größenverhältnisse erlauben den Einsatz von in der Humanmedizin verwendeten Katheter- und Stentsystemen. Auch ist die Neointimabildung beim Schwein modellhaft der des Menschen sehr ähnlich (DARTSCH ET AL. 1989, GONSCHIOR ET AL. 1994, HÖFLING ET AL. 1996).

In den letzten Jahren wird auf fast allen Gebieten, in denen Tiermodelle Verwendung finden, intensiv nach Möglichkeiten geforscht, mit humanen Zellkulturen über in vitro Versuche zu Vorhersagen zu kommen, die die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erlauben und den Einsatz von Versuchstieren minimieren. Diese Versuche stehen trotz einiger positiver Ergebnisse wie z.B. der Erzeugung einer atherosklerotischen Plaque (BAIM ET AL. 1992) noch am Anfang.

Für diese Arbeit wurde das Rattenmodell gewählt. Die Gründe dafür lagen in den zum Menschen weiter oben beschriebenen Ähnlichkeiten: der Neointimaformierung, der Proliferation der SMC und der besseren Verfügbarkeit weitgehend ähnlicher, standardisierter Einzeltiere.

Da in den Versuchen der Wirkstoff von außen auf das Gefäß aufgetragen werden musste, wurde ein Modell gewählt, bei dem eine Arterie dilatiert wird, die zum Einen nach der Operation weiter durchblutet wird und zum Anderen von außen gut zugänglich ist. Beide Anforderungen sind beim Rattenmodell mit Verwendung der A. carotis communis gewährleistet.

Pro Behandlungsgruppe wurden 5-10 Tiere eingesetzt. Dies stellte sich bei der späteren statistischen Auswertung der Ergebnisse als hinreichend heraus, um primäre Aussagen treffen zu können. Kritisch betrachtet werden muss jedoch die Tatsache, dass es in einigen Gruppen zu deutlichen Ausreißern gekommen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine deutliche Tendenz und in vielen Bereichen eine signifikante Veränderung der Parameter. Dies muss jedoch auf Grund der Fallzahl und der Ausreißerwerte kritisch betrachtet werden. Eine weiterführende Studie sollte mit einer deutlich erhöhten Fallzahl und auf Grund der oben beschriebenen Veränderungen ggf. mit älteren Tieren erfolgen.

In den bereits vorliegenden Studien konnte gezeigt werden, dass PD98059 auch beim Vorliegen von Risikofaktoren, z.B. bei erhöhtem Alter oder Bluthochdruck, eine Proliferationshemmung der VSMC erreicht.

5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsdurchführung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Dosisabhängigkeit der Inhibierung der Neointimabildung zu zeigen. Da wir zum Einen den Ergebnissen nach die Wirkungsgrenze des PD98059 für die gewählte Art der Applikationsform erreicht haben und zum Anderen bei der höheren Konzentration von 100µM eine Entwicklung beobachtet haben, die als positives Remodeling interpretiert werden kann, ohne dass eine Verbesserung der Neointimabildung gegenüber der 40µM-Gruppe beobachtet werden konnte, soll noch einmal eine kritische Betrachtung möglicher Einflussfaktoren vorgenommen werden.

1. Alter und Größe der Versuchstiere

Für unsere Untersuchungen wurden junge männliche Versuchstiere gewählt. Diese wurden bei zu geringem Körpergewicht noch so lange gehalten, bis sie in eine vergleichbare Gewichtskategorie gelangten. Die Auswahl der Tiere für die einzelnen Versuchsgruppen sowie die Reihenfolge der Behandlung innerhalb einer Versuchsgruppe geschahen darüber hinaus nach dem Zufallsprinzip. Ein maßgeblicher Einfluss auf die Versuchsergebnisse kann deshalb ausgeschlossen werden. Dies zeigen auch die dicht beieinander liegenden Gefäßdimensionen der kontralateralen Seiten der einzelnen Versuchsgruppen. Die generelle Frage, ob für zukünftige Experimente nicht auch ältere Tiere mit einbezogen werden sollten, um die Analogie zu den meist älteren Patienten in der klinischen Situation zu simulieren, stellt sich natürlich. Es konnten bereits, wie unter 5.1 beschrieben wurde, in verschiedenen Studien eine altersabhängige Erhöhung der ERK-Aktivität und Proliferation der VSMC dargestellt werden.

Die Arbeitsgruppe um URANO ET AL. 1999 zeigte ebenfalls Unterschiede bei Versuchstieren unterschiedlichen Alters durch in vivo Versuche am Rattenmodell. Danach zeigten junge Versuchstiere ein signifikant stärkeres

Wachstum der VSCMs nach Ballondilatation der Aorta als ältere Versuchstiere. Diese Studie zeigt also eine andere Verteilung der Proliferationsrate. Die Wahl des Versuchsmodells stellt sich somit zukünftig je nach Fragestellung immer wieder aufs Neue.

2. Zeitliche Faktoren - Dauer und „Schwere“ der Operation

Die Dauer der Operationen schwankte zwischen 25 und 60 Minuten. Durch die Randomisierung der Versuchstierauswahl verteilt sich dieses zeitliche Spektrum aber wiederum über alle Versuchsgruppen in vergleichbarer Weise. Bei der Operation stehen ganz eindeutig die Einflüsse der Ballonkatheterisierung, eventuelle Dehneffekte und die Tatsache, dass ein offenes operatives Verfahren an den Gefäßen durchgeführt wurde, im Vordergrund. Alle Parameter wurden bei den Operationen strikt normiert und konstant gehalten (vgl. Kap. 3.2.2), so dass ein systematischer Einfluss von dieser Seite nicht erwartet wird. Es erfolgte eine kurzfristige Längsdehnung der A. carotis communis um ca. 15% ihrer Länge. Es wurde in Untersuchungen von HU ET AL gezeigt, dass eine Längsdehnung des Gefäßes um 10-15% bereits zu einer signifikanten ERK-Aktivierung führt (HU ET AL. 1997).

Als zweiter Punkt ist das offene operative Verfahren zu betrachten. Im klinischen Alltag stellt die PTA und die PTCA ein rein transluminales Verfahren dar, bei der das Gefäß nicht von außen tangiert wird und auch keinen Keimen oder Lufteinflüssen ausgesetzt ist. Das Austrocknen der A. carotis communis wurde durch ein kontinuierliches Anfeuchten der Arterie mit 0,9% NaCl verhindert. Jedoch kann keine Aussage über die ggf. aufgetretenen Mikroverletzungen kleinster Nerven, Vaso vasorum oder der Adventitia getroffen werden.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Gruppe „Scheinoperation“, in der die Operation mit Dehneffekten aber ohne Ballondilatation durchgeführt wurde und in der keine signifikanten Unterschiede von Messwerten zur kontralateralen Seite auftraten, nicht bestätigt.

Im gesamten Versuchsverlauf ist die Zeitspanne von der Gelapplikation bis zur ersten Probenahme von Bedeutung. Da der Zeitbedarf nach der Gelapplikation, also nach erfolgter Operation, durch relativ einfache, standardisierte operative

Tätigkeiten bestimmt ist, war diese Zeitspanne nicht für die Streuung der Gesamtzeit der Operation maßgeblich. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Zeiten von der Gelapplikation bis zur ersten Probenahme in einem engen Zeitrahmen gleich waren. (Diese Überlegungen gelten vor allem für die untersuchten Kurzzeiteffekte bei der Untersuchung der Aktivierung der MAPK-Kaskade)

3. Menge und Konzentration der Wirksubstanz in situ

Die Applikation der Gelmenge geschah nach einem gleichbleibenden Protokoll (vgl. Methodenteil 3.2.2). Ein maßgeblicher Einfluss von dieser Seite wird deshalb nicht für wahrscheinlich gehalten. Die in den einzelnen Versuchsgruppen eingesetzten Gele mit Wirksubstanz wurden portionsweise nur für einen Versuchsdurchlauf angesetzt und genutzt und dazwischen kühl gelagert (s. Kapitel 3.1). Sollte es dennoch einen geringen Abfall der Konzentration des Wirkstoffes gegeben haben, so würde er alle Versuchsgruppen proportional gleich beeinflusst haben. Die randomisierte Auswahl der Versuchstiere, die sowohl nach Gruppenzugehörigkeit (Leergel, Scheinoperation und PD98059-Gruppen) als auch nach zeitlicher Reihenfolge zufällig gewählt wurden, sowie die relativ kurze Lagerungsdauer pro Versuchszyklus lassen einen maßgeblichen Einfluss von dieser Seite auch als unwahrscheinlich erscheinen.

4. Histologische Aufarbeitung

Die Gefäßentnahme und histologische Aufarbeitung erfolgte bei allen Arterien ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit, um einen systematischen Fehler auszuschließen. Alle Ratten wurden mit der in der Einleitung beschriebenen Methode in vivo fixiert. Die Gefäßstücke wurden dann mit der Schnittfläche nach unten senkrecht aufgestellt. An der quantitativen Auswertung der gleichbehandelten Kontrollseite kann erkannt werden, dass es nur zu einer geringen Streuung durch schräges Einbetten oder Anschneiden kommt. (siehe Abb. 9/10)

Zusammenfassend betrachtet kristallisiert sich als relevanter beeinflussender Faktor praktisch nur die Konzentration des Wirkstoffes selbst und damit seine Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik in der in vivo Situation als variable Einflussgröße heraus. Die anderen Faktoren können jedoch durch mögliche erwähnte Störfaktoren auf die Ergebnisse Einfluss nehmen.

5.3 Diskussion der Wirkung des PD98059 auf die Neointimabildung

5.3.1 ERK 1/2 Aktivierung im Rattenmodell

In dieser Arbeit konnte in als vorläufig zu bewertenden Untersuchungen eine deutlich erkennbare Steigerung der ERK1/2 Aktivität (analysiert als Phosphorylierung mittels Western Blot) 1 bzw. 7 Stunden nach Gefäßverletzung nicht dargestellt werden. Einschränkend muss festgestellt werden, dass auch in den nichtverletzten Kontrollarterien ein Phosphorylierungssignal detektiert wurde. Dieses Ergebnis widerspricht Ergebnissen aus einer früheren Studie, in der die Aktivität von ERK2 biochemisch gemessen wurde (HU ET AL. 1997). Im Rahmen einer später in der Arbeitsgruppe unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchung wurden die hier gezeigten Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt und eine triphasische Aktivierung mit Phosphorylierungsmaxima nach 10 Minuten, 24 Stunden und 4 Tagen beschrieben (Dissertation M. FAHRENHOLZ 2008).

Die Aktivierung von MAPKs konnte bereits 30 Sekunden nach mechanischem Stress an Schweineaorten nachgewiesen werden (PYLES ET AL. 1997). Auch in Studien an der Rattenaorta konnte ein schneller Anstieg mit Maximalwerten nach 30 Minuten gezeigt werden (LILLE ET AL. 1997) und eine Rückkehr zu Normalwerten nach ca. 11 Stunden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die zum Nachweis der ERK-Phosphorylierung gewählten Zeitpunkte in dieser Arbeit nicht optimal gewählt waren.

Für die Phosphorylierung der MAPK wurden an anderer Stelle bei in vitro Versuchen an vorher eingefrorenen Zellen der Rattenaorta andere Zeitabläufe festgestellt (LAI ET AL. 1996). Danach stieg die Tyrosin Phosphorylierung der

MAPKinase vom zweiten bis zum achten Tag nach Verletzung an und fiel erst nach 14 Tagen wieder leicht ab. Die Aktivität der p44 Tyrosinkinase stieg dabei deutlich an, während die der MAPKinase p42 nur leicht anstieg. Die Phosphorylierung anderer Kinasen wurde dabei nicht beobachtet.

In anderen Studien (WATSON ET AL. 2000) wurde die Expression von c-Jun in Rattenaorten nach Ballondilatation bereits nach 30 Minuten in ausgeprägter Form festgestellt. Sie blieb 24 Stunden auf hohem Niveau und war nach 3 Tagen wieder auf dem ursprünglichen Niveau. Die Expressionsmuster von JNK und phosphoryliertem c-Jun waren praktisch kongruent zu derjenigen von c-Jun. Ebenso war die Expression kongruent zur Bildung von ERK; ein Ablauf, wie er auch von HU ET AL. 1997 beobachtet worden war. Neointimabildung und proliferierende Zellen konnten sieben Tage nach der Verletzung beobachtet werden. Die Proliferation hielt bis 14 Tage danach an. Am 28. Tag konnte kein weiteres Wachstum mehr festgestellt werden. Dass die Neointimabildung innerhalb der ersten 14 Tage nach Ballondilatation geschieht, stellten auch CLOWES ET AL. 1983 in ihren Studien fest. LAI ET AL. 1996 stellten das erste Wachstum von VSCMs 48 Stunden nach Ballondilatation und das Maximum nach 96 Stunden fest. HEIJENBROK ET AL. 1998 zeigte, dass es etwa 8 Wochen dauert, bis die Neointimabildung Ihre maximale Ausdehnung erreicht hat. Die Aktivierung der MAPK Kaskade findet demnach um Größenordnungen schneller statt als die Proliferation von Zellen in den Gefäßen. Das Zellwachstum findet selbst dann noch statt, wenn die Konzentration der Kinasen schon wieder Normalniveau erreicht hat.

Die bisherigen Forschungsergebnisse aus verschiedenen Arbeiten zeigten, wie unter 1.6.6. beschrieben, eine schnelle Aktivierung bereits nach Minuten und ein Erreichen des Basalniveaus nach 14 Tagen. Bis zum Erreichen des Basalniveaus gab es variable Aktivierungsausprägungen. Deshalb lassen die Ergebnisse dieser Arbeit keine definitive Schlussfolgerung auf die Wirksamkeit von PD98059 auf die Phosphorylierung von ERK zu.

5.3.2 Diskussion der Unterschiede zwischen der 40 µM- und 100 µM – Gruppe

Die inhibierende Wirkung von PD98059 (40µM) auf die Neointimabildung (vgl. Abb.10) zeigt sich durch einen relativen Lumenverlust (vgl. Abb.14) von nur 18,6%, der damit nur halb so groß war wie in der Leergelgruppe, was die gute therapeutische Wirkung schon bei niedrigen Konzentrationen unterstreicht.

Die deutlichste Inhibierung der Neointimabildung gemessen am Verhältnis Neo/ExtOP zeigt sich signifikant bei der Konzentration von 40 µM, während die Konzentration von 100 µM nur zu einer tendenziellen Verringerung des Verhältnisses Neo/ExtOP führte. Andere Versuche an unserem Institut mit einer Konzentration von 200µM (Dissertation R. REAL 2010) führten ebenfalls zu einer Reduktion der Neointimabildung. Sie war aber nicht ausgeprägter als bei der Konzentration von 40µM in dieser Arbeit.

Die Mittelwerte für das Verhältnis Lumen/ExtOP für die Leergel- und OP-Gruppen unterschieden sich in den beiden Arbeiten nicht signifikant, sondern lagen eng beieinander. Leergel-Gruppe (Dissertation R. REAL 2010) 0,48 vs. 0,49 in dieser Arbeit und 200µM-Gruppe (Dissertation R. REAL 2010) 0,63 vs. 0,59 in der 40 µM-Gruppe dieser Arbeit.

Die Ergebnisse zeigten keine stärkere Inhibierung der Neointimabildung durch PD98059 Konzentrationen über 40 µM (100 µM und 200 µM). Somit wird eine Konzentration um 40 µM als derzeitige Schwellenkonzentration in Bezug auf die maximal erreichbare in vivo Wirkung an dem hier untersuchten Modell bei den gewählten Versuchsbedingungen interpretiert.

In frühen Studien hat es immer wieder Hinweise auf Konzentrations-Wirkungsgrenzen des PD98059 gegeben, was sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt. So beschreiben ALESSI ET AL. 1995 in vitro bei einer Konzentration von > 50µM keine Verstärkung der Inhibierung von MAPKK1 mehr. GENNARO ET AL. 2003 fanden in ihren in vitro Experimenten, dass die Aktivierung von p44/p42 MAPK in VSMCs alter Kaninchen selbst bei hohen Dosen von PD98059 nicht komplett unterdrückt werden konnte.

GRAF ET AL. 1997 beschreiben die chemotaktische Reaktion von SMCs der Rattenaorta und die humaner Zellen der Umbilicalvene auf PDGF-BB und die

Hemmung durch PD98059. Er findet vergleichbare Werte für die Konzentrationen 10 μM und 30 μM , also ebenfalls eine Sättigungserscheinung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keine stärkere Inhibierung der Neointimabildung durch PD98059 Konzentrationen über 40 μM .

Bei der Untersuchung des Parameters „Relativer Lumenverlust“ zeigte sich sowohl in der Gruppe 40 μM als auch in der Gruppe 100 μM eine signifikant bessere Entwicklung im Vergleich zur Leergelgruppe. Die 40 μM Gruppe zeigt jedoch im Vergleich zur 100 μM Gruppe tendenziell noch bessere Werte ($p=0,066$).

Die positive Entwicklung dieses Parameters in der 100 μM Gruppe lässt sich nur dadurch erklären, dass in dieser Gruppe die Parameter LumenOP/ExternaKO und auch MediaOP/ExternaKO signifikant größer sind als in den beiden anderen Gruppen Leergel und 40 μM .

Diese Fakten ließen sich als positives (expansive) Remodeling interpretieren, bei dem der sogenannte Remodeling Index, das Verhältnis ExtOP/ExtKO, größer als 1 ist (in den Ergebnissen der 100 μM Gruppe lag der Remodeling Index bei 1,39) (LAFONT ET AL. 2007).

Dieses positive Remodeling an einem Tiermodell wurde bisher nur an einem anderen Tiermodell (Kaninchen) nach PTA der thorakalen Aorta unter Einfluss des Wirkstoffes Probucol gezeigt, der wie PD98059 inhibierend in den ERK 1/2 Signalweg eingreift (YANG ET AL. 2007).

Im Unterschied zu YANG ET AL. wurden weder in der Leergelgruppe noch in der Kontrollgruppe Anzeichen von negativem Remodeling festgestellt. Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse wurde keine Erklärung dafür gegeben, unter welchen (Konzentrations-) Bedingungen es zu einer stärkeren Hemmung der Neointimabildung und zu einem positiven Remodeling kommen kann.

Das Ergebnis, das eine Konzentration von 200 μM (Dissertation R. REAL 2010) bei vergleichbaren Versuchsbedingungen zu ähnlichen Werten wie in der 40 μM Gruppe dieser Arbeit führte, legt eine intensivere Betrachtung der Messwerte der 100 μM Gruppe nahe.

Auffällig sind hier zwei Fakten:

1. Die absoluten Parameter der operierten Seite (vgl. Abb. 10) und die Verhältniswerte im Vergleich zur kontralateralen Seite (vgl. Abb. 11) deuten auf eine deutliche Vergrößerung der operierten Gefäße hin.

2. Die Werte in der 100 μM Gruppe zeigen eine große Streuung und eine hohe Zahl an sog. Ausreißern, wie in den Abbildungen 11 und 12 zu erkennen ist.

Dies lässt offen, ob es sich tatsächlich um ein positives Remodeling oder ein Artefakt durch hohe Streuung von Einzelwerten bei einer geringen Anzahl von Versuchstieren handelt. Weitere Versuche in dem Konzentrationsbereich von 40 bis 200 μM mit einer höheren Fallzahl könnten darüber Aufschluss geben.

5.4 Klinische Anwendungsgebiete

5.4.1 Hemmung der Neointimaproliferation und der Restenose

Eine Aufgabe dieser Studie war es, einen neuen Behandlungsansatz zur Minderung der Restenoserate nach Ballondilatation zu finden. Der Ansatz, die Proliferation der Neointima durch PD98059 zu hemmen, zeigte schon in anderen Studien Effektivität.

Es wurde demonstriert, dass durch die topische Behandlung mit PD98059-haltigem Gel eine Reduzierung der Neointimaproliferation sowie eine Reduzierung des Lumenverlustes im Vergleich zur Nichtbehandlung erreicht werden kann. Dies stellt einen guten Ansatz für die therapeutische Anwendung zur Minderung der Restenose und zu Verbesserung der Hämodynamik dar.

Insgesamt konnte in beiden Gruppen gezeigt werden, dass nach zwei Wochen ein positiver Effekt auf die Hämodynamik erzielt werden konnte. Denn nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ist die Durchflussmenge pro Zeiteinheit linear von der Druckdifferenz und von der vierten Potenz des Radius abhängig und damit vom Quadrat des Strömungsquerschnitts. Während sich in der Leergelgruppe das Lumen um 39% und damit der Durchfluss um 63% verschlechterte, betrug diese Reduktion in der 40 μM Gruppe nur 14% beim Lumen und entsprechend 26% beim Durchfluss. In der 100 μM Gruppe zeigte sich dagegen eine Verbesserung von 3% im Lumen und 6% im Durchfluss. (Basis: Verhältniswerte Lumen OP/KO und konstante Druckverhältnisse). In der Arbeitsgruppe BRUUS ET AL. 2008 konnte gezeigt werden, dass bereits eine geringe Verengung in den Kapillaren eine deutliche Erhöhung des Blutdruckes erfordert um die gleiche Versorgung distal der Stenose zu gewährleisten. Umso positiver ist der in dieser Arbeit gezeigte Erhalt einer guten Durchlässigkeit durch Unterdrückung einer Restenose bzw. der Erhalt der Lumengröße zu werten.

Es liegen bereits andere Ansätze vor, um die Neointimabildung und Restenoserate zu reduzieren. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass es durch Hemmung der Zellzyklus-Progression durch Überexpression von p27^{KIP 1}, eines Inhibitors der Cyclin abhängigen Kinase 2, zu einer Hemmung der Neointimaformation kommt. Diese Studie wurde auch am Carotidenrattenmodell durchgeführt (CHEN ET AL. 1997). Eine weitere Studie zeigt, dass die Implantation von Sirolimus (Rapamycin)-beschichteten Stents, zu einer Inhibierung der Restenose nach Implantation führt (SOUSA ET AL. 2003).

Für die In Stent-Restenose besteht prinzipiell die Möglichkeit über beschichtete Stents eine lokale Wirkstoffapplikation durchzuführen. BMS (bare metal stents) und DES (drug eluting stents) sind in den letzten Jahren wieder in den Brennpunkt des Interesses gerückt, da trotz anfänglicher Überlegenheit der DES mit den zwei wichtigsten aktiven Substanzen Sirolimus und Paclitaxel in klinischen Langzeitstudien höhere Mortalitätsraten für die DES gegenüber den BMS gezeigt wurden (PFISTER ET AL. 2006).

In der Zwischenzeit sind weltweit in klinischen Studien immer größere Fallzahlen über längere Zeitabschnitte der Anwendung von DES und BMS statistisch untersucht worden, und die anfänglich negativen Ergebnisse wurden relativiert (CARLSSON ET AL. 2007). Es konnte in Studien der deutschen Gesellschaft für Kardiologie (19. HERZBERICHT DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KARDIOLOGIE, 2006) gezeigt werden, dass die Restenoserate von ca. 25% auf 3% gesenkt werden konnte. Dennoch stehen DES mit ihren hauptsächlich über Cytostase/Cytotoxizität wirkenden aktiven Substanzen weiterhin unter kritischer Beobachtung. So wurde z.B. in der randomisierten BASKET-LATE Studie gezeigt, dass nach routinemäßigem Absetzen von Clopidogrel 6 Monate nach Stentimplantation die Spätthrombosen bei DES zwei bis dreimal häufiger auftraten als bei BMS. Die Häufigkeit für Herzinfarkte lag danach bei 4,9% in der DES-Gruppe versus 1,3% in der BMS-Gruppe. Und ebenfalls die In-Stent-Spätthrombosen waren in der DES-Gruppe doppelt so hoch wie in der BMS-Gruppe.

Ein deutlicher Vorteil des PD98059 und anderer MEK-Inhibitoren ist die gegenüber DES abweichende Wirkungsweise und ihr fehlender Einfluss auf die Apoptose. So wurde in der Arbeitsgruppe DUDLY ET AL. 1995 eine cytotostatische

ohne cytotoxische Wirkung des PD98059 gezeigt und in einer nachfolgenden Studie eine Konzentration von 50 μM PD98059 ebenfalls als nicht toxisch bestätigt (ZHOU ET AL. 2005). Eine Kombination verschiedener Inhibitoren der Restenose könnte - mit oder ohne gleichzeitige Anwendung cytostatischer Wirkungsmechanismen - in der Zukunft gute Effekte bei der Behandlung zeigen. Unbekannt ist jedoch noch, ob sich eine Potenzierung der verschiedenen Effekte bei kombinierten Behandlungen tatsächlich ergibt und zu einer langfristigen Verbesserung der klinischen Situation führt.

Gleichzeitig sollten Anwendungsgebiete nicht außer Acht gelassen werden, die nichts mit der coronaren Restenose zu tun haben wie z.B. periphere Dilatationen an Extremitäten, Shuntanlagen oder Anlagen von Stents, welche nicht im Bereich der Coronaren zu finden sind. In all diesen Bereichen wäre das Thema der Applikation eines Wirkstoffs wie PD98059 keine große Herausforderung und könnte bei Eingriffen dieser Art durch eine lokale Therapie und Applikation einen guten Ansatz zur Prävention der Restenose darstellen. Hier wäre die Applikationsform in einer bei Körpertemperatur fest werdenen Trägersubstanz, wie in dieser Versuchsreihe bereits verwendet, ein Vorteil. Bereits einige in der Chirurgie verwendeten intraoperativen Hilfsmittel arbeiten mit einem solchen Trägermedium.

5.4.2 MEK-Inhibitoren in klinischen Studien

Die bisher in klinischen Studien befindlichen MEK-Inhibitoren werden zum größten Teil in der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Es existiert aktuell keine klinische Studie mit der Anwendung von MEK-Inhibitoren in einem chirurgischen gefäßspezifischen Bereich.

Diverse selektive MAPK/ERK-Kinase-(MEK-)Inhibitoren (PD184352, PD0325901, ARRY-142886) befinden sich zurzeit bei verschiedenen Tumorentitäten in der klinischen Prüfung. Der MEK-Inhibitor PD0325901 befindet sich bereits in einer Phase-II-Studie zum kleinzelligen Bronchialkarzinom, zum Kolonkarzinom und zum Brustkrebs (FIRMA PFIZER, HAURA EB ET AL. 2010). Des Weiteren erzielte eine Phase-I-Studie bei drei der 48 Melanompatienten ein partielles Ansprechen und bei weiteren zehn zumindest eine Stabilisierung der Erkrankung. Die Studie wurde noch vor Erreichen der

geplanten Patientenzahl aufgrund ausgeprägter Nebenwirkungen, im Speziellen Thrombosen der Retinagefäße und Neurotoxizität, abgebrochen (LO RUSSO PM ET AL. 2010). Noch in der klinischen Phase-II-Studie des metastasierten Melanoms befinden sich die MEK-Inhibitoren AZD6244 und CSK1120212 sowie in der klinischen Phase-I-Studie TAK-733 (FLAHERTY KT ET AL. 2010).

Der MEK-Inhibitor Selumetinib (ARRY-142886) wird aktuell in klinischen Studien zum Kolonkarzinom, zum Mammakarzinom und zum Melanom angewandt.

Einen weiteren Ansatzpunkt stellt die antivirale Therapie dar, bei der z.B. die Substanz UO126 in einer Studie untersucht wurde (PLANZ O ET AL. 2001). Aber auch andere MEK-Inhibitoren stellen hier eine derzeit diskutierte Therapiemöglichkeit dar.

Eine Hemmung des Signaltransduktionsweges ist auf vielen Ebenen möglich und es befinden sich bereits multitarget-MAP-Kinasen-Inhibitoren für den Menschen, wie z.B. Sorafenib und Sunitinib, in verschiedenen klinischen Studien.

In diesem und dem vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die MEK Inhibitoren in vielen Bereichen durch ihren Wirkungsmechanismus sowohl als Singlemedikation, als auch in Kombinationen angewandt werden können.

Die verschiedenen Ansatzpunkte wie Tumorerkrankungen, antivirale Medikation und Restenoseprävention zeigen nur einen kleinen Teil der vorstellbaren Indikationsstellungen, so dass man auf die in Zukunft kommenden klinischen Ergebnisse und weiterführenden Indikationsstellungen gespannt sein kann.

6 Zusammenfassung

Die Restenose atherosklerotischer Gefäße nach Eingriffen wie der PTCA oder der Stentimplantation stellt auch nach Jahren der Einführung dieser Methoden noch immer ein klinisches Problem und eine Herausforderung für die Forschung dar. Einer der Mechanismen, der zu einer Neointimabildung und damit Restenose führt, wird über die Aktivierung von mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gesteuert.

Zuvor konnte in Studien gezeigt werden, dass durch adventitielle Applikation des MEK-Inhibitors PD98059 die Neointimabildung nach Angioplastie der A. carotis der Ratte signifikant vermindert wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der MEK-Inhibitor PD98059 nach einmaliger lokaler Anwendung nach Ballondilatation der A. carotis communis der Ratte in den verschiedenen Dosierungen einen positiven Einfluss auf die Neointimahemmung bzw. auf die Lumenfläche hat.

Bereits in einer Konzentration von 40 μM PD98059 konnte ein inhibierender Effekt auf die Neointimabildung (60% Reduktion) und den damit assoziierten geringeren Lumenverlust (20%) dargestellt werden.

Bei den mit 100 μM PD98059 behandelten Tieren wurde keine statistisch signifikante Inhibition der Neointimabildung beobachtet. Die Vergrößerung der Gefäßparameter und insbesondere des um 47% vergrößerten Lumens (positives Remodeling) müsste durch weitere Versuche verifiziert werden; sie wären im Falle einer positiven Studie jedoch interessante und klinisch relevante Veränderungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass der MEK-Hemmer PD98059 bereits in niedrigen Konzentrationen ein interessanter klinischer Entwicklungskandidat für die lokale pharmakologische Hemmung der Neointimabildung während revaskularisierender Eingriffe an Koronararterien, aber auch an anderen arteriellen Gefäßen des Menschen ist.

7 Anhang

7.1 Liste verwendeter Substanzen mit Quellen

Substanz/Material	Artikelnummer	Firma
Acryl-/Bisacrylamid (30:0.8)	3029.1	Roth
Ammoniumpersulfat(APS)	A-9164	Sigma
Anti Mouse	Sc-2006	Santa Cruz, Biotechnology
Anti Rabbit	Sc 2006	Santa Cruz, Biotechnology
APS (Ammoniumpersulfat)	A-9164	Sigma
Complete™,Mini,EDTA-frei (Proteinaseinhibitorcocktail)	1836170	Roche
BSA	A-2153	Sigma
Deckgläser	Nr.1 18x18mm	Merck KGaA
DMSO	D-8418	Sigma
DTT	197777	Boehringer Mannheim
ECL-Reagenz	RPN 2209	Amersham
EGTA	E-3889	Sigma
Elektrophoresekammer (Kammer,Spacer,Kämme)		Bio-Rad
Entwässerungsautomat Histokinette		Reichert Jung
Ethanol	8006	JT-Baker
Filmkassette		Kodak
Glycerol	G-5516	Sigma
β-Glycerolphosphat	G-9891	Sigma
Glycin	3908-2	Roth
HEPES	Z617110	Merck
Hyperfilm™ ECL		RPN 2114 Amersham
Blotting Grade BL(non fat dry milk)	170-6460	Bio-Rad
Mikroskop		Axioskop 40, Zeiss
Mikrotom HM 355		Microm
3MM Whatmann Filterpapier		Schleicher&Schnell
Molekulargewichtsmarker SDS-6H Standard	SDS-6H	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Roth
NaH ₂ PO ₄	6345	Merck
NaOH	677,1	Roth
Na ³ VO	S6508	Sigma
Objekträger		Menzel-Gläser
Objekträger-Kasten		Kobe
Objekträger Trockner		Medax
PBS	L1815	Biochrom
PD 98059	513000	CALBIOCHEM
PFA (Paraformaldehyd)	UN 2213	Merck
P42/44 Antikörper	9102	CTS Cell Signaling
Phospho p42/44 MAP Kinase(Thr202/Tyr204)	E 10 monokl. AK 9106	New England Biolabs
Photoentwickler	171-9004	Kodak XOMAT 5000 RA Processor
Pluronic Gel	583106	BASF
Ponceau S	P-7170	Sigma
Protran Nitrocellulose Transfermembran	BA 85	Schleicher&Schnell
Reagenz A	500-0166	Bio-Rad
Reagenz B	500-0166	Bio-Rad
Reagenz S	500-0166	Bio Rad
SDS(Sodium-dodecyl-sulfat)	2326.2	Roth
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminoethan)	1.08382.	Merck, Darmstadt
Temed(N,N,N',N',Tetramethyl-ethylenediamine)	T-9281	Sigma
Triton X 100	6883	Roth
Tween 20	P1379	Sigma
Videokamera F15 HS		Panasonic
Wärmeschrank (60 °C)		Heraus Instruments

8 Quellenverzeichnis

ADAM LP, MICHAEL T, FRANKLIN MT, ET AL. - Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Porcine Carotid Arteries. *Circ.* (1995); 76: 183-190

AHN NG, SEGER R, BRATELIEN RL, ET AL. - Multiple componenta in an epidermal growth factor stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated proetein 2 kinase. *J. Biol. Chem.* (1991); 266: 4220-4227

ALESSI DR, CUENDA A, COHEN P, ET AL. – PD98059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of mitogen-activated Protein Kinase Kinase in vitro an vivo. *J. Biol. Chem.* (1995); 270 (46): 27489-27494

AL SUWAIDI J, BERGER PD, HOLMES JR. DR, ET AL. – Coronary Artery Stents. *JAMA.* (2000); 284(14): 1828-1836

AMBROSE JA, SHARMA SK, MARMUR JD, ET AL. – Balloon angioplasty vs. Stent Study (BOSS). *Circulation.* (1997); 96 (suppl)(1): 592

BAIM DS, ET AL. – Interventional catheterization techniques: percutaneous transluminal balloon angioplasty, valvuloplasty, and related procedures. In: Braunwald, E. (Hrsg.) : Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. Fourth edition. W. B. Saunders, Philadelphia. (1992): 1365-1381

BETRIU A, MASOTTI M, SERRA A, ET AL. – Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions. *J Am Coll Cardiol.* (1999); 34: 1498-1506

BIER JD, ZALESKY P, SASKEN H, ET AL. – A new bioabsorbable intravascular stent: In vitro assessment of hemodynamic and morphometric characteristics. *Circulation.* (1991); 82(4)

BIOMETRA MANUAL Nov. 1993: Fastblot

BRUNET A, POUSSEGUR J, ET AL. – Mammalian MAP kinase modules : how to transduce specific signals. *Essays in Biochemistry* (1997); 32: 1-16

BRUUS, ET AL. – Theoretical Microfluidics. *Oxford University Press* (2008)

BULT H, ET AL. – Restenosis : a challenge for pharmacology. *TIPS* (2000); 21

CALIFF RM, FORTIN DF, FRID DJ, HARLAN WR 3RD, ET AL. – Restenosis after coronary angioplasty : overview. *J Am Coll Cardiol.* (1991); 17 (6Suppl B): 2B-13B

CANAGRAJAH BJ, KOHKHLATCHEV A, COBB MH, ET AL. – Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK 2 by Dual Phosphorylation. *Cell* (1997); 90: 859-869

CARLSSON J, ET AL. – Medikamentenbeschichtete Stents. Verwirrung und Ernüchterung in der invasiven Kardiologie. *Deutsches Ärzteblatt* (2007); 104(3): 86-87

CASILLAS AM, AMARAL K, CHEGINI-FARAHANI S, ET AL. – Okadaic acid activates p42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK-2) in B-lymphocytes but inhibits rather than augments cellular proliferation: contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem.* (1993); 290: 545-550

CELL SIGNALING TECHNOLOGY – Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades

CHEN D, KRASINSKI K, SYLVESTER A, ET AL. – Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP 1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J.Clin. Invest* (1997); 99: 2334-2341

CHEN Q, KINCH MS, LIN TH, ET AL. – Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinase. . *J. Biol. Chem* (1994); 269: 26602-26605

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM, ET AL. – Kinetic of Cellular Proliferation after Arterial Injury. *Lab. Investigation* (1983); 49 (3): 327-333

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM, ET AL. – Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab. Investigation* (1983); 49, 208-215

COHEN P, ET AL. – The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Cell Biol.* (1997); 7: 353-361

COHEN EA, SYKORA K, KIMBALL BP, ET AL. – Clinical outcomes of patients more than one year following randomization in the Canadian Coronary Atherectomy Trial (CCAT). *Can J Cardiol.* (1997); 13(9): 825-30

COSPEDAL R, ABEDI H, ZACHARY I ET AL. – Platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases. *Cardiovascular research, Volume 41, Issue 3, 1* (1999): 708-721

DARTSCH PC, BAURIEDEL G, SCHINKO I, ET AL. – Cell constitution and characteristics of human atherosclerotic plaques selectively removed by percutaneous atherectomy. *Atherosclerosis.* (1989); 80 : 149-157

DAUB H, WEISS FU, WALLASCH C, ET AL. – Role of transactivation of EGF receptor in signalling by –protein-coupled receptors. *Nature* (1996); 379: 557-560

DAVIS SP, REDDY H, CAIVANO M, ET AL. – Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* (2000); 351: 95-105

DENHARDT DT, ET AL. – Signaling-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* (1996); 318, 729-747

DETRE K, HOLUBKOV R, KELSEY S, ET AL. – One –Year follow-up results of the 1985-1986 national Heart, Lung, and Blood Institute`s Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Registry. *Circulation* (1989); 80 (3): 421-428

DE VOS J, JOURDAN M, TARTE K, ET AL. – JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrohostin AG 490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *British J. of Haematology* (2000); 109 (4): 823-828

DIETZ U, ERBEL R, RUPPRECHT HJ, ET AL. – Akut- und Langzeitergebnisse der percutanen transluminalen koronaren Rotationsangioplastie (PTCR). *Z Kardiol.* (1991); 80 (suppl VI) (23)

DI MARIO C , ET AL. – New recipes for in-stent restenosis: cut, grate, roast, or sandwich the neointima? *Heart.* (2000); 84: 471-475

DOTTER CT, ET AL. – Arterial catheterization for diagnosis and therapy. *Nippom-Igaku-Hoshasen-Gakki-Zashi.* (1965); 25(6): 495-500

DOWNWARD J, ET AL. – Control of ras activation. *Cancer Surv.* (1996); 27: 87-100

DUDLEY DT, PANG L, DECKER SJ, ET AL. – A Synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biochem.* (1995); 92: 7686-7689

DUSSAILLANT GR, MINTZ GS, PICHARD AD, KENT KM, SATLER LF, POPMA JJ, WONG SC, AND LEON MB, ET AL. – Small stent size and intimal hyperplasia

contribute to restenosis: a volumetric intravascular ultrasound analysis. *J Am Coll Cardiol.* (1995); 26(3): 720-724

ELEZI S, KASTRATI A, NEUMANN FJ, ET AL. – Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation* (1998); 98(18): 1875-1880

FAHRENHOLZ M - Einfluss der pharmakologischen MEK-Inhibition auf Phosphorylierung und Expression der extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1/2 und deren Substrate nach intraluminaler Verletzung der Arteria carotis der Ratte. *Dissertation Berlin* (2007)

FAVATA MF, HORIUCHI KY, MANOS E, ET AL. – Identification of Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J Biol Chem* (1998); 273 (29): 18623-18632

FERGUSON JJ, ET AL. – Highlights of the American College of Cardiology. *Circulation.* (1999); 100: 570-575

FISCHMAN DL, LEON MB, BAIM DS, SCHATZ RA, ET AL. – A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med.* (1994); 331: 496-501

FLAHERTY KT, PUZANOV I, KIM KB ET AL. – Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* (2010); 363: 809–819

FRENCH JE, JENNINGS MA, FLOREY HW, ET AL. – Morphological studies on atherosclerosis in swine. *Ann NY Acad Sci.* (1965); 127: 780-794

GENNARO G, MENARD C, GIASSON E, ET AL. – Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2003); 23: 204-210

GENNARO G, MENARD C, MICHAUD SE, ET AL. – Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation.* (2003); 107(2): 230-3

GEORGE CJ, BAIM DS, BRINKER JA, ET AL. – One-year follow-up of the Stent Restenosis (STRESS I) Study. *Am J Cardiol.* (1998); 81: 860-865

GONSCHIOR P, NERLICH A, MACK B, ET AL. – Immunocytological characteristics of primary and restenosis tissue obtained at atherectomy. *VASA.* (1994); 1: 15-22

GOULD MC, STEPHANO JL, ET AL. – Inactivation of Ca^{2+} Action Potential Channels by the MEK Inhibitor PD98059. *Exp. Cell. Res.* (2000) ; 260 : 175-179

GRAF K, XI X-P, YANG D, ET AL. – Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Involved in Platelet- Derived Growth factor- Directed Migration by vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* (1997); 29 (1): 334-339

GRUENTZIG AR, KING SB 3RD, SCHLUMPF M, ET AL. – Long-term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Eng. J.Med.* (1987); 316 (18): 1127-1132

GRUENTZIG AR, MYLER RK, HANNA ES, ET AL. – Coronary transluminal angioplasty. *Circulation.* (1977); 55-56 (suppl III)

GRUENTZIG AR, ET AL. – Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet.* (1978); 1: 263

HANSON SR, POWELL JS, DODSON T, ET AL. – Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon. *Hypertension.* (1991); 18: 1170-76

HATTORI Y, KAKISHITA H, AKIMOTO K, ET AL. – Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of mitogen-

activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase Signalweg by protein kinase C. *Biochem. Biophys Res. Commun.* (2001); 281: 891-896

HAURA EB, RICART AD, LARSON TG, STELLA PJ, ET AL. – A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* (2010); 16(8): 2450-2457

HEIJENBROK FJ, VAN DER WAL AC, PFAFFENDORF M, ET AL. – Morphologic and functional consequences of intimal hyperplasia in the rat carotid artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (1998); 357(2): 133-42

HERRMANN JPR, HERMANS WR, VOS J, ET AL. – Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (Part I). *Drugs.* (1993); 46: 18-52

HÖFLING B, REICHART B, SIMPSON J, ET AL. – Ballondilatation und Weiterentwicklungen. *R.S. Schulz-Verlag Kempfenhausen.* (1989)

HÖFLING B, GONSCHIOR P, SIMPSON L, ET AL. – Efficacy of directional coronary atherectomy in cases unsuitable for percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and after unsuccessful PTCA. *Am Heart J.* (1992); 124(2): 341-348

HÖFLING B, HUEHNS TY, GONSCHIOR P, ET AL. – Medikamentöse und instrumentelle Therapieansätze zur Restenoseprophylaxe. *Z Kardiol.* (1995); 84 (suppl)(4): 151-158

HÖFLING B, HUEHNS TY., ET AL. –Restenosis after angioplasty - an update on relevant animal models. *J Invas Cardiol.* (1996); 8: 388-395

HOLMES DR, VLIETSTRA RE, SMITH HC, ET AL. – Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of

the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am. J Cardiol.* (1984); 53 (12): 77C-81C

HU Y., CHENG L., HOCHLEITNER BW, ET AL. – Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases (ERK/JNK) and AP-1 Transcription Factor in Rat Carotid Arteries After Ballon Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vasc. Biology* (1997); 17 (11): 2809-2816

HULTGARDH-NILSSON A, CERCEK B, WANG JW, ET AL. – Regulated Expression of the ets-1 transcription factor in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Circ. Res.* (1996); 78: 589-595

JENKINS MP, ET AL. – Clinical study of adjuvant photodynamic therapy to reduce restenosis following femoral angioplasty. *Br J Surg.* (1999); 86: 1258-1263

JOHNSON GJ, VAILLANCOURT RR, ET AL. – Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol* (1994); 6: 230-238

KOYAMA H, OLSON NE, DASTVAN FF, ET AL. – Cell replication in the arterial Wall: activation of signaling Signalweg following in vivo injury. *Circ. Res.* (1998); 82: 713-721

KRAEMER R, NGUYEN H, MARCH KL, ET AL. - NGF Activates Similar Intracellular Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells as PDGF-BB But Elicits Different Biological Responses; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1999); 19: 1041-1050

KUNTZ RE, BAIM DS, ET AL. – Defining coronary Restenosis. Newer clinic angiographic paradigms. *Circ.* (1993); 88: 1310-1323

LAFONT A, GUZMAN LA, ET AL. – Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ.* (1995); 76: 996–1002

LAI K, WANG H, LEE WS, ET AL. – Mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in rat arterial smooth muscle cell proliferation. *J. Clin. Invest.* (1996); 98: 1560-1567

LEV S, MORENO H, MARTINEZ R, ET AL. – Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺- induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* (1995); 376: 737-745

LI M, TANAKA H, WANG HH, ET AL. – Age-related differences in MAP Kinase activity in VSMC in response to glucose or TNF-alpha. *J. Cell Physiol.*, 2003; 197(3): 418-425

LILLE S, DAUM G, CLOWES MM, ET AL. – The Regulation of p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinases in the Injured Rat Carotid Artery. *J. Surg. Res.* (1997); 70: 178-186

LIN LL, WARTMANN M, LIN AY, ET AL. – cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* (1993); 72: 269-278

LOPEZ-ILASACA M, CRESPO MP, PELLICI PG, ET AL. – Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling Signalweg through PI 3-kinase gamma. *Science* (1997); 275: 394-397

LoRUSSO PM, KRISHNAMURTHI SS, RINEHART JJ ET AL. – Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD- 0325901 in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* (2010); 16:1924–1937

LOWE HC, OESTRELE SN, KHACHIGIAN LM, ET AL. – Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol.* (2002); 39(2): 183-193

MARAIS R, MARSHALL CJ, ET AL. – Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* (1996); 27: 101-125

MCGEACHIE J, CAMPBELL P, SIMPSON S, ET AL. – Arterial vasa vasorum: a quantitative study in the rat. *J Anat.* (1982); 134: 193-197

MISCHAK H, SEITZ T, JANOSCH P, ET AL. – Negative regulation of Raf1 by phosphorylation of serine 621. *Mol. Cell. Biol.* (1996); 16(10): 5409-5418

MOSES S, DERJA K, LINDQVIST A, ET AL. – Smooth Muscel cell Response to Mechanical Injury Involves Intracellular Calcium Release and ERK1/ERK2 Phophorylation. *Exp. Cell Res.* (2001); 269: 88-96

MULLER DW. M, ELLIS SG, TOPOL EJ, ET AL. – Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol.* (1992);19: 418-432

NAITO S, SHIMIZU S, WANG J, ET AL. – Ets-1 is an early response gene acivated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscel cells. *Am. J. Physiol.* (1998); 274: C472-C480

NELSON PR, YAMAMURA S, MUREEBE L, ET AL. – Smooth muscel cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of intracellular messenger mitgen-activates protein kinase. *J Vasc Surg.* (1998); 27(1): 117-125

NOBUYOSHI M, KIMURA T, NOSAKA H, ET AL. – Restenosis after Successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* (1988); 12 (3): 616-623

PARISI AF, FOLLAND ED, HARTIGAN P, ET AL. – A comparison of angioplasty with medical therapy in the treatment of single-vessel coronary artery disease. Veterans Affairs ACME Investigators. *N Engl J Med.* (1992); 326(1): 10-16

PFISTERER M, BRUNNER-LA ROCCA HP, BUSER PT, ET AL. – Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stent. *J AM Coll Cardiol.* (2006); 48(12): 2584-2591

PFUND A , ET AL. – Die Stentimplantation als initiale koronarinterventionelle Therapie? *Herz.* (2000); 25(5): 495-501

PINTO YM, PINTO SJ, PAUL M, ET AL. – The electron microscopic morphology of the common carotid artery in rats. *Ann Anat* (1998); 180: 223-235

PLANZ O, PLESCHKA S, LUDWIG S, ET AL. – MEK-Specific Inhibitor U0126 Blocks Spread of Borna Disease Virus in Cultured Cells. *J Virol.* (2001); 75(10): 4871–4877

POPMA JJ, CALIFF RM, TOPOL EJ, ET AL. – Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* (1991); 84(3): 1426-1436

PRATT RE, DZAU VJ, ET AL. – Pharmacological Strategies to Prevent Restenosis. *Circulation* (1993); 5: 848-852

PYLES JM, MARCH KL, FRANKLIN M, ET AL. – Activation of MAP Kinase in Vivo Follows Ballon Overstretch Injury of Porcine Coronary and Caritid Arteries. *Circ.Res.* (1997); 81: 904-910

REAL M. – Histologische Veränderung nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis communis der Ratte und Wirkung einer pharmakologischen Inhibition der Proteinkinase MEK und p38 auf die Neoitnimabildung. *Dissertation Berlin* (2010)

REINERS JJ, JR, JING-YU LEE, CLIFT RE, ET AL. – PD98059 Is an Equipotent Antagonist of Aryl Hydrocarbon Receptor an Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Mol. Pharmacol.* (1998); 53: 438-445

RENSHAW MW, TOKSOZ D, SCHWARTZ MA, ET AL. – Involvement of the small GTPase Rho on integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1996); 271: 21691-21694

RICE KM, KINNARD RS, HARRIS R, ET AL. – effects of aging on pressur-induced MAPK activation in the rat aorta. *Pfluger Arch*; 2005: 450(3) : 192-199

RODRIGUEZ A, AYALA F, BERNARDI V, ET AL. – Optimal coronary balloon angioplasty with provisional stenting versus primary stent (OCBAS). *J Am Coll Cardiol.* (1998); 32: 1351-1357

ROSS R, ET AL. – Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* (1999);138:419-420. Review.

SCHEIDT VON, W, UBERFUHR P, REICHART B, ET AL. – The role of PTCA in the management of focal critical lesions in transplant coronary artery disease. *Transplant Proc.* (1995); 27(3): 1936-8

SCHÖMIG A, KASTRATI A, DIETZ R, ET AL. – Emergency coronary stenting for dissection during percutaneous transluminal coronary angioplasty: angiographic follow-up after stenting and after repeat angioplasty of the stented segment. *J Am Coll Cardiol.* (1994); 23(5): 1053-1060

SCHÖMIG A, KASTRATI A, MUDRA H, ET AL. – Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with treated or present vessel closure. *Circulation.* (1994); 90(6): 2716-2724

SCHWARTZ SM, ET AL. – How vessels Narrow. *Cardiol.* (1995); 84: 129-135

SCHWARTZ RS, ET AL. – Pathophysiology of Restenosis : Interaction of Thrombosis, Hyperplasia, and/or Remodeling. *Am J Cardiol.* (1998); 81 (7A): 14E-17E

SCHWARTZ RS, TOPOL EJ , ET AL. – Artery Size, Neointima, and Remodeling *J. Am. Coll. Cardiol.* (1998); 32 (7): 2087-2094

SCHWARTZ RS, EDWARDS WD, BAILEY KR, ET AL. – Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs. *Arterioscler Thromb.* (1994); 14: 395-400

SCOTT NA, CIPOLLA GD, ROSS CE, ET AL. – Identification of a Potential Role for the Adventitia in Vascular Lesion Formation After Ballon Overstretch Injury of Porcine Coronary Arteries. *Circulation* (1996); 93 (12): 848-852

SEGER R, KREBS EG, ET AL. – The MAPK signaling cascade. *FASEE J.* (1995); 9: 726-735

SERRUYS PW, DE JAEGERE P, KIEMENEIJ F, ET AL. – A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* (1994); 331: 489-495

SIEVERT H, ROHDE S, UTECH A, ET AL. – Stent or angioplasty after recanalization of chronic coronary occlusions? *Am J Cardiol.* (1999); 84: 386-390

SIGWART U, ET AL. – Coronary stents. *Z Kardiol.* (1995); 84 (suppl.)(2): 65-77

SIMPSON JB, BAIM DS, ROBERT EW, ET AL. – A new catheter system for coronary angioplasty. *Am J Cardiol.*(1982); 49: 1216-1222

SOUSA JE, COSTA MA, SOUSA AG, ET AL. – Two-Year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation* (2003); 107: 381-383

SUGDEN PH, CLERK A, ET AL. – Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascade through G-Protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* (1995); 9: 337-351

STEMERMANN MB, WEINSTEIN R, ROWE JW, ET AL. – Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1982); 79(12): 3863-3866

TOPOL EJ, LEYA F, PINKERTON CA, ET AL. – A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* (1993); 329: 221-227

TOUZY RM, ODA N, IWASAKA C, ET AL. – Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J. Hypertens.* (1999); 17: 907-916

URANO Y, SHIRAI K, WATANABE H, ET AL. – Vascular smooth muscle cell outgrowth, proliferation, and apoptosis in young and old rats. *Atherosclerosis* (1999); 146: 101-105

VERSACI F, CASPARDONE A, TOMAI F, ET AL. – A comparison of coronary-artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med.* (1997); 336: 817-822

VESELINOVITCH D, ET AL. – Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab med.* (1988); 112: 1011-1017

WANG X, STUDZINSKI GP, ET AL. – Phosphorylation of Raf-1 by Kinase suppressor of Ras is inhibited by “MEK-Specific” inhibitors PD98059 and U0126 in differentiating HL60 cells. *Exp. Cell Res.* (2001); 268: 294-300

WARD MR, KANELAKIS P, RAMSEY D, ET AL. – Response to balloon injury is vascular bed specific A consequence of de novo vessel structure. *Artherosklerose* (2000); 151: 407-414

WASYLYK B, HAGMAN J, GUTIERREZ-HARTMANN A, ET AL. – Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling Signalweg. *TIBS* (1998); 23: 213-216

WATSON L, HERDGEN T, BUSCHMANN T, ET AL. – JNK and c-Jun but not ERK and c-Fos are associated with sustained neointima-formation after ballon injury. *Eur.J.Clin. Invest.* (2000); 30: 11-17

WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, ET AL. – Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiological Reviews* (1999); 79(1): 143-169

YANG CM, DHIEH CS, HSIAO LD, ET AL. – Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscel cells mediated by activation of Ras/Raf/MAPK Signalweg. *Br. J. Pharmacol.* (2001); 132: 1531-1541

YANG YB, YANG YX, SU B, ET AL. – Probucol mediates vascular remodeling after percutaneous transluminal angioplasty via down-regulation of the ERK1/2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* (2007); 570(1-3): 125-34

YU JC, LOKKER NA, HOLLENBACH S, APATIRA M, LI J, ET AL. – Efficacy of the Novel Selective Platelet-Derived Growth Factor Receptor Antagonist CT52923 on Cellular Proliferation, Migration, and Suppression of Neointima following Vascular Injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2001); 298: 1172-1178

ZHU X, ASSOIAN RK, ET AL. – Integrin-dependent activation of MAP kinase : a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* (1995); 6: 273-282

ZHOU H, VLADIMIR N, GILLESPIE ET AL. – Mechanism of Radiation-Induced Bystander Effect : Role of the Cyclooxygenase-2 Signaling Pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005); 102 (41): 14641-14646

9 Curriculum Vitae

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

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

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

FAHRENHOLZ M, REAL R, KÜKEN A, SAXENA A, ORZECOWSKI 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) ;617(1-3):90-6

10.2 Poster, Präsentationen

STRASDAT M, REAL R, WEINSTRACH A, PAUL M, ORZECOWSKI HD - 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, Gemeinsame Herbsttagung der GBM und DGPT Frankfurt, 2002)

ORZECOWSKI HD, STRASDAT M, WEINSTRACH A, KOVACEVIC S, REAL R, PAUL M - Effect of MAP/SAP kinase inhibitors on neointima formation in the rat carotid artery (Halle, 2002)

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anne Kathrin Küken geborene Weinstrauch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation „Effekte einer pharmakologischen Hemmung der Mitogen-aktivierten ERK Kinase auf morphometrische Gefäßparameter im Verletzungsmodell der Arteria carotis der Ratte - Eine Dosis-Wirkungsstudie“ 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.

Kaarst, den 01.11.2011

Anne Kathrin Küken, geb. Weinstrauch