

Universität Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach

**Der Effekt von Clopidogrel Hydrogen Sulfate auf
Proliferation und Expression des
Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in humanen koronaren
Gefäßwandzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Barbara Felbecker
Karlsruhe

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Khosro Hekmat

Tag der Promotion: 17.01.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
A. Einleitung	1
1. Grundlagen der Restenose-Entstehung	2
2. Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD 54)	3
3. Clopidogrel Hydrogen Sulphate (CHS)	4
4. Die SI/MPL-Ratio (significant inhibition/maximal plasma level)	5
5. Thematik und Ziel der vorliegenden Arbeit	5
B. Material und Methoden	6
1. Material	6
1.1. Zellkultur	6
1.2. Proliferationsmessung	10
1.3. Vitalitätsbestimmung	10
1.4. Durchflusszytometrie zur Messung der ICAM-1-Expression	11
1.5. Statistiksoftware	13
2. Methoden	14
2.1. Zellkultur	14
2.2. Proliferationsmessung	15
2.3. Vitalitätsmessung	17
2.4. Durchflusszytometrie zur Messung der ICAM-1-Expression	19
2.5. Statistik	22
C. Ergebnisse	24
1. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulphate auf die Zellproliferation	24
1.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	24
1.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)	25
1.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)	26
1.4. Proliferation von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich	27
2. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulfate auf die Zellvitalität	28
2.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	28

2.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)	29
2.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)	30
2.4. Vitalität von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich	31
3. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulphate auf die zelluläre ICAM-1-Expression	32
3.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	32
3.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)	34
3.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)	35
3.4. ICAM-1-Expression bei HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich	37
D. Diskussion	39
1. CHS – geeignete Wirkmechanismen zur Restenoseprophylaxe?	39
1.1. Effekt von CHS auf die TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression	41
1.2. Effekt von CHS auf die Proliferation von HUVEC und HCAEC	42
1.3. Effekt von CHS auf die Proliferation von HCAMSMC	43
2. Bedeutung der Vitalität der Zellen im Versuch für diese Ergebnisse	43
3. CHS – geeignet zur Stentbeschichtung?	44
3.1. Notwendige Konzentration in der Beschichtung	45
4. Grenzen dieser Untersuchung	46
5. Ausblick	48
E. Zusammenfassung	51
F. Literaturverzeichnis	53
Anhang	61
Danksagung	61
Lebenslauf	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AM-D	Actinomycin-D
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ASS	Acetylsalicylsäure
BMS	Bare Metal Stent
CAPRIE	Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events
CD	Cluster of Differentiation
CHS	Clopidogrel Hydrogen Sulphate
CURE	Clopidogrel in Unstable Angina to prevent Recurrent Events
DES	Drug-Eluting Stent
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBM	Endothelial cell Basal Medium
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM	Endothelial cell Growth Medium
ESC	European Society of Cardiology
FITC	Fluoresceinisotiocyanat
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Glyc	Glycin
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells
HCAMSMC	Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells
hEGF	Human Endothelial Growth Factor
hFGF-B	Human Fibroblast Growth Factor B
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1, Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G

ISR	In-Stent-Restenose
LST	Late Stent Thrombosis
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NO	Nitric Oxide
PBS ⁻	Phosphate Buffered Saline Dulbecco's ohne Calcium and Magnesium
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
R3-IGF-1	Recombinant analog of- Insulin-like Growth Factor
SI/MPL	Significant Inhibition/Maximal Plasma Level
SmBM	Smooth muscle cell Basal Medium
SMC	Smooth Muscle Cells
SmGM	Smooth muscle cell Growth Medium
Tab	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNS	Trypsin-Neutralizing-Solution
t-PA	Tissue Plasminogen Activator, Gewebe Plasminogenaktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

A. Einleitung

Die Langzeitergebnisse nach koronarer Stentimplantation werden maßgeblich durch das Auftreten der sogenannten In-Stent-Restenose (ISR) beeinflusst. Auch wenn der Einsatz von Stents im Vergleich zur Ballonangioplastie zu einer signifikanten Senkung der Restenoserate um durchschnittlich 10 % geführt hat [62], bleiben die Restenoseraten unbefriedigend hoch. Forrester et al. prophezeiten im Jahre 1991, dass die Lösung des Problems der Restenose wohl in der gleichzeitigen Schaffung eines größtmöglichen Lumens und der Inhibition der Intimahyperplasie läge [17]. 15 Jahre später wissen wir aus zahlreichen Studien, dass drug-eluting Stents (DES) die ISR-Rate im Vergleich zu sogenannten Bare-Metal-Stents (BMS) tatsächlich signifikant zu senken vermögen [13;27;29;41]. Der offensichtliche Erfolg der DES hat dazu geführt, dass immer mehr Patienten mit immer höherem klinischem und läsionsspezifischem Risiko mit DES versorgt werden [32].

Bis heute nur unzureichend verstanden bleiben jedoch die genauen Wirkmechanismen, die zur Überlegenheit der DES führen. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte immunmodulierende, antiinflammatorische Wirkkomponenten entscheidend zur Effektivität der DES beitragen [18;20]. Die Tatsache, dass die Therapie der ISR und ihrer Folgen auch in der Ära der DES eine bisher nur unzufriedenstellend gelöste Herausforderung darstellen, rückt die Prävention der ISR und diesbezügliche mögliche Ansatzpunkte in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung [38].

Ein großes Problem stellen die hohen Kosten des Einsatzes von DES dar. Abgesehen von den hohen Entwicklungs- und Produktionskosten zeigten Kaiser et al. im Jahr 2005, dass die Kosteneffektivität von DES in der Realität im klinischen Einsatz ungünstiger ist als in Studien mit ausgewählten Patienten [26]. Um die Kosten zu senken und die Effektivität der DES weiter zu steigern, ist es unabdingbar, auf der Grundlage der bekannten Restenose-Entstehungsmechanismen nach neuen Wirkansätzen und neuen Wirkstoffen für die Nutzung mittels DES zu suchen.

1. Grundlagen der Restenose-Entstehung

Große Studien definieren die Restenose als eine innerhalb von 6 Monaten nach Intervention auftretende angiographische Lumeneinengung von 50 % oder mehr [35]. Durch Ballonangiographie und/oder Stentimplantation wird im Bereich der atherosklerotischen Läsion eine Gefäßendothelverletzung verursacht, die die Initiierung von Wundheilungsprozessen im Sinne einer Entzündungsreaktion zur Folge hat [54;61]. Der physiologische Verlauf dieses Heilungsprozesses führt zur vollständigen Reendothelialisierung und damit zur Wiederherstellung der Integrität der verletzten Gefäßwand. Bei einer großen Zahl der Fälle kommt es jedoch zu einem unphysiologischen Verlauf des Heilungsprozesses und in Folge zur Restenose. Die beiden pathophysiologischen Hauptmechanismen, die das Korrelat zur Restenose-Entstehung darstellen, sind die Neointimabildung und das in einer späteren Phase stattfindende sogenannte vascular remodeling. Unter der Neointima versteht man eine überschießend regenerierende Gefäßintima; das vascular remodeling bezeichnet Umbauprozesse in der Gefäßwand, die zu vermehrter Vasokonstriktion führen. Während nach reiner Ballonangiographie der Pathomechanismus des vascular remodeling überwiegt, spielt nach Stentimplantation die Neointimabildung die größere Rolle [5;22]. Jedoch sind beide Mechanismen nicht streng voneinander zu trennen und beeinflussen sich auch gegenseitig.

Nur Sekunden bis Minuten nach Katheterintervention kommt es zum sogenannten „elastic recoil“. Hierunter versteht man die durch die Dehnung der Gefäßwand initiierte Vasokonstriktion durch Elastinfasern in der Lamina elastica. Das Ausmaß des elastic recoil wird durch die Implantation eines Stents signifikant reduziert [5].

Die Deendothelialisierung durch Katheterintervention führt über freiliegende subendotheliale Strukturen (Kollagen, Laminin, Fibronectin) zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten und zur Ablagerung von Fibrin [5]. Es kommt zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen (Serotonin, Thromboxan A₂), verschiedener Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- β (TGF- β)) und verschiedener Zytokine (tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)) [19]. Dies führt zur chemotaktisch initiierten

Einlagerung von Leukozyten in die thrombotische Schicht aus Thrombozyten und Fibrin über dem Endotheldefekt und deren Einwanderung in die Gefäßwand [33]. Die Zell-Zell-Kontakte werden dabei von vermehrt exprimierten Adhäsionsmolekülen wie z.B. interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) vermittelt [43]. Aktivierte Leukozyten setzen weitere Entzündungsmediatoren und Chemokine frei, welche die Entzündungsreaktion kaskadenartig aufrechterhalten. Die Wachstumsfaktoren weisen eine chemotaktische und proliferierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskulzellen (smooth muscle cells, SMC) auf. Es kommt zur Migration von SMC aus der Gefäßmedia in die Gefäßintima. Bei diesen Vorgängen differenzieren die SMC zu Zellen, die in der Lage sind, extrazelluläre Matrix zu bilden [22;31]. Insgesamt kommt es zu einer überschießenden Intimaregeneration – der Neointimabildung.

Beim sogenannten vascular remodeling führt eine unausgeglichene Neuorganisation der extrazellulären Matrix im Verlauf des Entzündungsprozesses zur vermehrten Vasokonstriktion. Insbesondere ein vermehrter Abbau der Lamina elastica externa sowie der Verlust zellulärer Komponenten und die zunehmende Produktion extrazellulärer Matrix [30;40] führen zur zusätzlichen Lumeneinengung.

2. Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD 54)

Als ein der Immunglobulin-Superfamilie angehörendes Adhäsionsmolekül wird ICAM-1 vom Gefäßendothel exprimiert. Es handelt sich um ein Transmembran-Glykoprotein, dessen Expression unter anderem über die Aktivierung von Nuclear factor kappa B (NF- κ B) durch Entzündungsmediatoren - so zum Beispiel TNF- α - gesteuert wird [45;56]. Voisard et al. konnten 1998 den stimulierenden Einfluss von TNF- α auf die ICAM-1-Expression nachweisen [58].

ICAM-1 bindet an Integrine auf der Zelloberfläche von Leukozyten und spielt so eine wichtige Rolle bei deren Anheftung an das Endothel und ihrer Migration in die Gefäßwand im Rahmen der Entzündungsreaktion. In dieser Funktion ist auch die Bedeutung von ICAM-1 bei der Restenose-Entstehung (siehe A.1) zu verstehen.

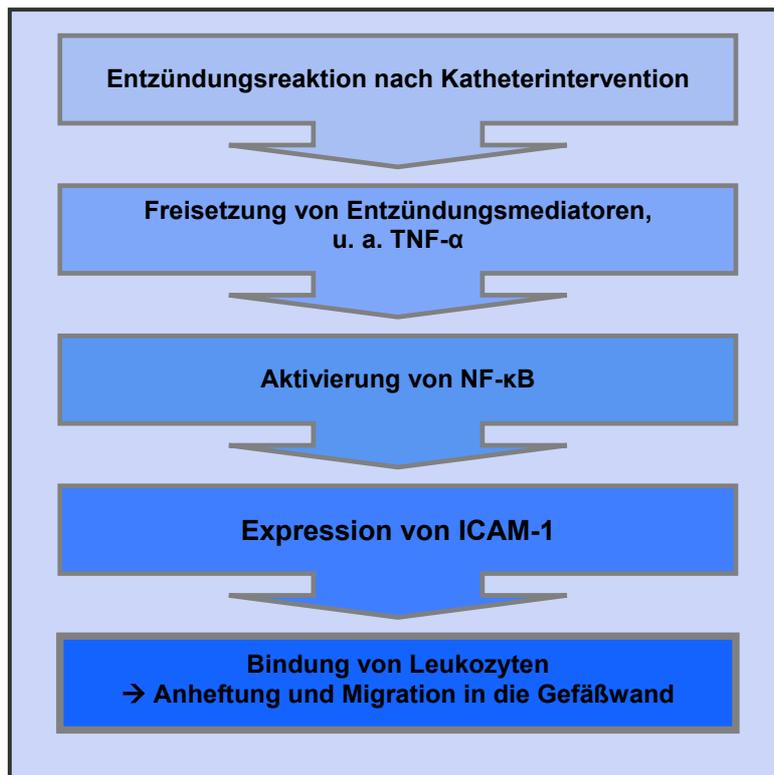


Abb. 1

Funktion von ICAM-1 im Rahmen der Entzündungsreaktion nach Katheterintervention

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

3. Clopidogrel Hydrogen Sulphate (CHS)

CHS wird als Thrombozytenaggregationshemmer zur Prophylaxe ischämischer Ereignisse bei Personen mit manifester arterieller Gefäßerkrankung eingesetzt. Ein durch hepatische Biotransformation entstehender Metabolit dieses Thienopyridin-Derivates blockiert die Bindung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) an den Plättchenrezeptor P2Y₁₂ der Thrombozyten. Er verhindert damit indirekt die Bindung von Fibrinogen an den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor und somit die Thrombozytenaggregation [10;14;39].

CHS stellt seit Jahren mit einem der größten Studienprogramme weltweit seine Wirksamkeit in der Therapie und Prophylaxe ischämischer Gefäßkrankheiten unter Beweis. Diese Wirksamkeit wurde bis vor einigen Jahren weitgehend auf den Mechanismus der Thrombozytenaggregationshemmung durch den aktiven Metaboliten zurückgeführt. Es konnten jedoch weitere Effekte nachgewiesen werden, deren Anteil an der therapeutischen und präventiven Wirkung von CHS noch nicht quantitativ eingeordnet

werden kann. Zu diesen Effekten gehören thrombolytische, vasodilatierende und antiinflammatorische Komponenten [21;28].

4. **Die SI/MPL-Ratio (significant inhibition/maximal plasma level)**

Mit dem Ziel, eine Messgröße für den Vergleich von Daten aus dem Labor mit der tatsächlich erreichbaren Situation in der Klinik zu schaffen, etablierten Voisard et al. im Jahre 2004 die sogenannte SI/MPL-Ratio [57]. Die SI/MPL-Ratio gibt das Verhältnis der in vitro zur Hemmung des untersuchten Prozesses (z.B. Proliferation bestimmter Zellen) notwendigen Substanzkonzentration zur in vivo tatsächlich erreichbaren Konzentration derselben Substanz an. Eine SI/MPL-Ratio <1 impliziert, dass der untersuchte Prozess durch die Anwendung der untersuchten Substanz zumindest theoretisch beeinflusst werden kann.

$$\text{SI/MPL-Ratio} = \frac{\text{Konzentration mit signifikanter Inhibition in vitro}}{\text{Erreichbare Konzentration in vivo}}$$

Abb. 2

Die SI/MPL-Ratio (significant inhibition/maximal plasma level)

5. **Thematik und Ziel der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CHS auf die Proliferation verschiedener Gefäßwandzellen (HUVEC, HCAMSMC, HCAEC) und auf die TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression untersucht.

Wir stellten die Hypothese auf, dass CHS die Proliferation menschlicher Gefäßwandzellen im Sinne der Restenoseprophylaxe positiv beeinflussen und die TNF- α -stimulierte Expression von ICAM-1 reduzieren könnte. Auf diesem Mechanismus beruhend könnte es seine antiinflammatorische Wirkung entfalten. Anhand der erhaltenen Daten wurden die SI/MPL-Ratios errechnet. Sie dienen als Messgröße für die Beurteilung der Frage, ob die Entwicklung eines CHS-beschichteten Stents auf dem Hintergrund der von uns untersuchten Wirkmechanismen weiter vorangetrieben werden könnte.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1. Zellkultur

1.1.1. Zellen

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden drei verschiedene Zellarten verwendet und kultiviert:

- **H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells (HUVEC)
- **H**uman **C**oronary **A**rtery **E**ndothelial **C**ells (HCAEC)
- **H**uman **C**oronary **A**rtery **M**edia **S**mooth **M**uscle **C**ells (HCAMSMC)

Bei allen Versuchsreihen wurde darauf geachtet, Zellpassagen < 8 zu verwenden.

HUVEC

Die Isolation und anschließende Kultivierung erfolgte aus Nabelschnurvenen, zur Verfügung gestellt von der Universitätsklinik für Frauenheilkunde Ulm (ärztlicher Direktor: Prof. Dr. R. Kreienberg).

HCAEC

Die HCAEC wurden kommerziell erworben bei Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien.

HCAMSMC

Auch diese Zellen wurden von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien bezogen.

1.1.2. Kulturmedien

Medium für HUVEC

Für die Kultivierung von HUVEC wurde verwendet:

- Endothelial cell Growth Medium (EGM)
Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien

Endothelial cell Basal Medium (EBM) wurden folgende Substanzen zugesetzt:

- Bovine Brain Extract (2 ml)
- Epidermal Growth Factor (0,5 ml)
- Fetal Calf Serum (25 ml)
- Hydrocortisone (0,5 ml)
- Gentamycin/Amphotericin (0,5 ml)

Alle Substanzen von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien

Medium für HCAEC

Die Kultivierung der HCAEC erfolgte in

- Endothelial cell Growth Medium-2-MV (EGM-2-MV Bulletkit)
Bio Whitacker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien

Enthaltene Substanzen:

- Fetal Calf Serum (25 ml)
- Hydrocortisone (0,2 ml)
- Human Fibroblast Growth Factor (hFGF-B) (2 ml)
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (0,5 ml)
- Recombinant analog of- Insulin-like Growth Factor (R3-IGF-1) (0,5 ml)
- Ascorbic acid (0,5 ml)
- Human Endothelial Growth Factor (hEGF) (0,5 ml)
- Gentamycin/Amphotericin (0,5 ml)

Medium für HCAMSMC

Die HCAMSMC wurden kultiviert in

- Smooth muscle cell Growth Medium (SmGM)

Smooth muscle cell Basal Medium (SmBM) wurden folgende Substanzen zugegeben:

- Insulin (0,5 ml)
- Fibroblast Growth Factor (1 ml)
- Epidermal Growth Factor (0,5 ml)
- Fetal Calf Serum (25 ml)
- Gentamycin/Amphotericin (0,5 ml)

Alle Substanzen von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company,
Verviers/Belgien

1.1.3. Kulturgefäße

Routinekultur

Die Routinekultur aller Zellen erfolgte in Kulturschalen mit einer
Wachstumsfläche von 75 cm²:

„Cellstar[®] Tissue Culture Flasks 250 ml“

Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen/Deutschland

1.1.4. Adhäsionsfaktor

Für die Adhäsion der Endothelzellen (HUVEC und HCAEC) an die
Wachstumsfläche der Kulturschale war die Beschichtung mit einem
Adhäsionsfaktor notwendig. Hierzu wurde Kollagen Typ I in Essigsäure
(0,1M) gelöst und die Lösung steril filtriert (Konzentration: 1mg/ml).

Benötigtes Material:

- Kollagen Typ I from rat tail
Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
- Essigsäure 0,1M
Merck, Darmstadt/Deutschland
- Filtereinheit „Meditron 30/0,2 CAS“
Schleicher & Schnell GmbH, Dassel/Deutschland

1.1.5. Enzymlösung und Enzymneutralisationslösung

Zum Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche wurde verwendet:

- Trypsin/EDTA-Solution 0,02 %
Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien.

Zur Neutralisation der Trypsin/EDTA-Lösung wurde verwendet:

- Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS)
Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers/Belgien.

1.1.6. Pufferlösung

Zur Kollagenbeschichtung und zum Spülen des Zellrasens wurde verwendet:

- Phosphate Buffered Saline Dulbecco's ohne Calcium and Magnesium (PBS⁻)
PAA Laboratories, Linz/Österreich

1.1.7. Testsubstanz

- Clopidogrel Hydrogen Sulphate (CHS)
Batch F 310405
Batch F 410508
sanofi~synthelabo, Newcastle/Großbritannien

Die Testsubstanz wurde uns in Pulverform zur Verfügung gestellt. Die Lösung erfolgte in Methanol 100 %, Stammlösung 250 mg/ml.

1.1.8. Geräte

- Mikroskop: „Nikon Inversionsmikroskop TMS-F“ mit ELDW-Kondensor, Phasenkontrastobjektive:
 - CF Plan Achromat 4/0,13 DL
 - CF Plan Achromat 10/0,3 DL
 - CF Plan Achromat 20/0,4 DLNikon, Düsseldorf/Deutschland
- Sterilbank: „Laminar Flow“
BDK, Sonnenbühl-Genkingen/Deutschland
- Inkubator: „HERAcell Heraeus“
Kendro Laboratory Products, Hanau/Deutschland
- Wasserbad: „julabo SW-20C“
Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach/Deutschland
- Zentrifugen: „Universal 2S“
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/Deutschland
- Pumpe: „Vakuumpumpe KNF“
VWR International GmbH, Darmstadt/Deutschland
- Gasbrenner: „Fireboy eco“
Integra Biosciences, Fernwald/Deutschland

- Pipettierhilfe: „Pipetboy plus“
Integra Biosciences, Fernwald/Deutschland

1.2. Proliferationsmessung

1.2.1. Reagenzien

- Methanol
Merck, Darmstadt/Deutschland
Zur Lösung der Testsubstanz und für die Methanolkontrollen.
- Natriumchlorid: NaCl 0,9 %
Braun, Melsungen/Deutschland
Zur Herstellung der Zellsuspension für die Proliferationsmessung mit dem Zellcounter.

1.2.2. Kulturgefäße

Für die Versuchsansätze wurden 6-Lochschalen mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm² pro Vertiefung verwendet:
„Multiwell™6well“
Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland

1.2.3. Geräte

- Cellcounter: „Casy 1“ mit „Cellcountergefäß 22x65 PPN“
Schärfe System, Reutlingen/Deutschland
- Restliche Geräte wie unter B.1.1.8

1.3. Vitalitätsbestimmung

1.3.1. Reagenzien

- „CellTiter-Glo™ Luminescent“, bestehend aus
 - „CellTiter-Glo™ Buffer 10 ml“
 - „CellTiter-Glo™ Substrat“Promega GmbH, Mannheim/Deutschland

1.3.2. Kulturgefäße

Zur Kultur der Zellen für die Vitalitätsmessung wurden weiße 96-Lochschalen verwendet:

„96F NUNCLON DELTA WHITE MICROWELL SL“

Nunc, Roskilde/Dänemark

1.3.3. Geräte

- Luminometer: „Centro LB 960“
Berthold Technologies, Bad Wildbach/Deutschland
- Schüttler: „Vortex-Genie 2“
VWR International GmbH, Darmstadt/Deutschland
- Magnetschüttler: „Monoshake Variomag“
VWR International, Darmstadt/Deutschland
- Pipette: „Multipette[®] plus“ mit „Combitips plus 5 ml“
Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg/Deutschland
- Restliche Geräte wie unter B.1.1.8

1.4. Durchflusszytometrie zur Messung der ICAM-1-Expression

1.4.1. Pufferlösung

- Phosphate Buffered Saline Dulbecco's ohne Calcium and Magnesium (PBS⁻)

PAA Laboratories, Linz/Österreich

- Fetal Calf Serum

Batch 40G6721K

Gibco BRL, Eggenstein/Deutschland

Cytoflowpuffer: 500 ml PBS⁻ mit 10 ml Fetal Calf Serum

für die Waschvorgänge und zur Herstellung der zur Messung notwendigen Zellsuspension für die Durchflusszytometrie, sowie zur Herstellung der Antikörperlösungen.

1.4.2. Zytokine

- Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), 10 μ g/ml rekombinant
Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland

Zur Stimulation der ICAM-1-Expression.

1.4.3. Kontrollsubstanzen

- Actinomycin-D (AM-D)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland

gelöst in

- Dimethylsulfoxid (DMSO)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland

Stammlösung 1 mg/ml

Zur Mitführung einer Negativkontrolle.

1.4.4. Antikörper

- Anti-Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)-Fluoresceinisotiocyanat (FITC)

Dianova, Hamburg/Deutschland

zur Markierung des exprimierten Adhäsionsmoleküls bei der Messung der ICAM-1(CD 54)-Expression .

- Anti-Immunglobulin G (IgG)- FITC
Dianova, Hamburg/Deutschland
für die Negativkontrollen.

Die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper erfolgte gelöst in der in B.1.4.1 beschriebenen Pufferlösung (Cytoflowpuffer), Mischungsverhältnis 1:20.

1.4.5. Misch-/Reagenz-/Zentrifugen- Gefäße

- „PS-Röhrchen GLKL, 14 ml 17,0/100mm, Griffstopfen“
Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen/Deutschland
- „Falcon® 5ml Polystyrene Round-Bottom-Tube 12x75 mm style“
Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
- „Falcon® Blue MAX™ 50 ml“
Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
- „Safe-Lock Tubes 1,5 ml“
Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg/Deutschland

1.4.6. Kulturgefäße

Für die Versuchsansätze wurden 6-Lochschalen mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm² pro Vertiefung verwendet:

„Multiwell™6well“

Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland

1.4.7. Geräte

- Zentrifugen
 - „Varifuge 3.0R Heraeus“
Kendro Laboratory Products, Hanau/Deutschland
 - „Biofuge pico Heraeus“
Kendro Laboratory Products, Hanau/Deutschland
- Durchflusszytometer: „FACS Calibur“, Becton Dickinson, Heidelberg/Deutschland
mit folgender zugehöriger Software:
Macintosh-Systemsoftware MAC OS 9.2.1.
und dem Programm CellQuest Pro
Die Erstellung der Histogramme mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung erfolgte mit „WinMDI Version 2.7“
- Restliche Geräte wie unter B.1.1.8

1.5. Statistiksoftware

- „SigmaStat Version 2.0“

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Endothelzellen: HUVEC, HCAEC

Für die Kultur von Endothelzellen (HUVEC und HCAEC) wurden die Kulturschalen zunächst mit Kollagen Typ I als Adhäsionsfaktor beschichtet. Hierzu wurden je 5 ml PBS⁻ und 100 µl (HUVEC) bzw. 200 µl (HCAEC) der unter B.1.1.4 beschriebenen Kollagenlösung in die Kulturschalen gegeben und die Wachstumsfläche damit benetzt. Die Kulturen wurden für mindestens 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Aussaat einer neuen Passage wurden der Zellrasen der Vorgängerpassage zunächst zweimal mit je 5 ml PBS⁻ gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin/EDTA-Solution von der Wachstumsfläche abgelöst. Nach dem Ablösevorgang erfolgte die Neutralisation der Trypsin/EDTA-Solution durch Zugabe von 5 ml TNS.

Die so entstandene Zellsuspension wurde nun zentrifugiert (B.1.1.8) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Kulturmedium suspendiert und aufgenommen. Nach Absaugen des PBS⁻ aus den zuvor beschichteten Kulturschalen wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Anzahl an Kulturschalen verteilt und mit dem entsprechenden Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt.

2.1.2. HCAMSMC

HCAMSMC konnten ohne Kollagenbeschichtung direkt auf die Wachstumsfläche ausgesät werden. Spätestens alle zwei Tage war ein Wechsel des Kulturmediums erforderlich.

Die Aussaat neuer Passagen erfolgte wie unter B.2.1.1 beschrieben ohne Kollagenbeschichtung.

2.1.3. Kulturbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Begasung)

Zur Kultur aller aufgeführten Zellen/Versuchsansätze erfolgte die Inkubation im Begasungsinubator (B.1.1.8) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Begasung erfolgte mit einem CO₂-Gehalt von 5 %,

wodurch der pH-Wert des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffersystems konstant auf einen Wert von 7,2 - 7,4 eingestellt wurde.

2.2. Proliferationsmessung

(siehe auch Tab. 1 – Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Proliferationsmessung)

Es wurde die Proliferation von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC unter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Clopidogrel Hydrogen Sulphate in je drei gleichen Versuchsansätzen gemessen.

Hierzu erfolgte die Aussaat der entsprechenden Zellart in insgesamt 27 Vertiefungen von 6-Lochschalen (je drei Vertiefungen pro Konzentration CHS, je drei Vertiefungen für eine 24-Stundenkontrolle, eine Kontrolle sowie für eine Methanolkontrolle)

2.2.1. Aussaat für die Proliferationsmessung

Die Aussaat der Zellen in die 6-Lochschalen unterschied sich von dem unter B.2.1.1 beschriebenen Verfahren wie folgt:

Die Vertiefungen der 6-Lochschalen wurden zunächst mit je 2 ml PBS⁻ und 20 μl (für die Aussaat von HUVEC) bzw. 40 μl (für die Aussaat von HCAEC) der unter B.1.1.4 beschriebenen Kollagenlösung beschichtet. Für die Aussaat von HCAMSMC erfolgte keine Beschichtung.

Um pro Vertiefung die ungefähr gleiche Zellzahl auszusäen, wurde die Anzahl der aus der Kulturflasche gewonnenen Zellen (siehe B.2.1.1) zunächst mit dem Zellcounter ermittelt, eine Zellsuspension von 300-5000 Zellen/ cm^2 hergestellt und diese anschließend gleichmäßig auf die Vertiefungen verteilt. Jede Vertiefung der 6-Lochschale enthielt 2 ml Kulturmedium.

2.2.2. Inkubation mit der Testsubstanz

Die Testsubstanz Clopidogrel Hydrogen Sulphate wurde uns von sanofi~synthelabo, Newcastle/Großbritannien in Pulverform zur Verfügung gestellt. Es erfolgte die Lösung in Methanol, was die Mitführung von Methanolkontrollen erforderlich machte.

Die Testsubstanz wurde in Eppendorf Cups in Portionen von je 100 µl mit einer Konzentration von 250 mg/ml gekühlt aufbewahrt.

Im Versuch wurden durch entsprechende Verdünnung mit Methanol und die Zugabe zum Kulturmedium jeweils unmittelbar vor Versuchsdurchführung folgende Konzentrationen verwendet:

- 25 µg/ml
- 2,5 µg/ml
- 0,25 µg/ml
- 0,025 µg/ml
- 0,0025 µg/ml
- 0,00025 µg/ml

Je Vertiefung wurden 20 µl der jeweiligen Konzentration an Clopidogrel Hydrogen Sulphate den 2 ml Kulturmedium zugegeben. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte nach 24 h und nach 72 h beim nächsten Mediumswechsel. Die Inkubation mit Clopidogrel Hydrogen Sulphate erfolgte insgesamt über 5 Tage.

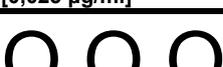
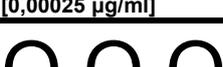
2.2.3. Zellzählung und Auswertung

Nach Absaugen des Kulturmediums erfolgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA-Solution. Die Zellsuspension einer jeden Vertiefung wurde einzeln aufgenommen, mit NaCl 0,9 % verdünnt und jeweils in ein Zellcountergefäß überführt. Die Zellzählung erfolgte mit dem Zellcounter (B.1.2.3).

Aus den so gewonnenen je drei Werten für eine Testkonzentration bzw. für die verschiedenen Kontrollen wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Vom Wert der Kontrolle wurde der Wert der 24-Stundenkontrolle abgezogen und das Ergebnis gleich 100 % Proliferation gesetzt. Von den anderen Werten wurde ebenfalls der Wert der 24-Stundenkontrolle abgezogen und die Proliferation prozentual im Verhältnis zur Kontrolle errechnet.

Die Gesamtauswertung einer Versuchsreihe besteht aus den Mittelwerten der aus den jeweiligen 3 Versuchsansätzen errechneten Proliferation in Prozent.

Tab.: 1
Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Proliferationsmessung
CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

6-LochsChalen	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 6
 Kontrolle	Aussaat	▪ Medienwechsel	▪ Medienwechsel	Zählung und Auswertung
 Methanolkontrolle	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von Methanol	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von Methanol	Zählung und Auswertung
 [25 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [25 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [25 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 [2,5 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [2,5 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [2,5 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 [0,25 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,25 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,25 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 [0,025 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,025 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,025 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 [0,0025 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,0025 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,0025 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 [0,00025 µg/ml]	Aussaat	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,00025 µg/ml]	▪ Medienwechsel ▪ Zugabe von CHS [0,00025 µg/ml]	Zählung und Auswertung
 24-Stundenkontrolle	Aussaat	Zählung	---	---
	---	---	---	---

2.3. Vitalitätsmessung

(siehe auch Abb. 3 – Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Vitalitätsmessung)

Es wurde in je einem Versuchsansatz die Vitalität von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC nach Inkubation mit folgenden Konzentrationen von Clopidogrel Hydrogen Sulphate gemessen:

25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,00025 µg/ml.

Hierzu wurden 84 Vertiefungen einer weißen 96-Lochschale (B.1.3.2) gleichmäßig besät (je zwölf Vertiefungen pro Konzentration, jeweils sechs Vertiefungen für eine Kontrolle und eine Methanolkontrolle). Zwölf Vertiefungen für einen Leerwert wurden im Versuch mit den HUVEC und den HCAEC mit Kollagen beschichtet, nicht besät und mit entsprechendem Kulturmedium befüllt. Im Versuch mit den HCAMSMC wurden die Vertiefungen für den Leerwert lediglich mit Kulturmedium befüllt.

2.3.1. Aussaat für die Vitalitätsmessung

Für die Aussaat von HUVEC und HCAEC wurden die 96-Lochschalen zunächst mit Kollagen beschichtet. Hierzu wurde beim Versuch mit HUVEC eine Suspension aus 2 ml PBS⁻ und 20 µl der in B.1.1.4 beschriebenen Kollagenlösung hergestellt und je 100 µl in eine Vertiefung gegeben. Dasselbe Verfahren wurde für den Versuch mit HCAEC mit 2 ml PBS⁻ und 40 µl Kollagenlösung angewandt.

Die Aussaat der Zellen erfolgte nach Herstellung von 9 ml Zellsuspension aus dem entsprechenden Medium und einer angestrebten Zellanzahl von 138 600 (entsprechend 3000-5000 Zellen/cm²). Anschließend wurden je 100 µl in 84 Vertiefungen der 96-Lochschale gegeben. 12 Vertiefungen wurden zur Ermittlung des Leerwertes nur mit je 100 µl Kulturmedium befüllt.

2.3.2. Inkubation mit der Testsubstanz

Zur Inkubation mit der Testsubstanz über 6 Tage wurden je 2 ml des entsprechenden Kulturmediums mit der entsprechenden Konzentration an Clopidogrel Hydrogen Sulphate hergestellt und je 100 µl in die entsprechenden zwölf Vertiefungen pipettiert. In sechs besäten Vertiefungen wurden eine Methanolkontrolle und in weiteren sechs eine Kontrolle mitgeführt.

2.3.3. Vitalitätsmessung und Auswertung

Das hier angewendete Prinzip der Vitalitätsmessung besteht darin, dass das Substrat Luciferin durch die Luciferase vitaler Zellen in Oxyluciferin und

Licht umgewandelt wird, dessen Intensität direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist.

Am sechsten Tag nach Aussaat wurde das Substrat Luciferin zur Kultur gegeben, dann für 2 Minuten kreisend gemischt und zusätzlich für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde am Luminometer (B.1.3.3) gemessen. Aus den 12 Werten für jede Konzentration, den je sechs Werten für die Kontrolle und die Methanolkontrolle und aus den zwölf Werten für den Leerwert wurde jeweils der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert des Leerwertes wurde von den anderen Mittelwerten abgezogen und der so erhaltene Wert aus der Kontrolle gleich 100 % Vitalität gesetzt. Die Vitalität der mit Clopidogrel bzw. Methanol inkubierten Zellen wurde prozentual im Verhältnis zur Kontrolle errechnet.

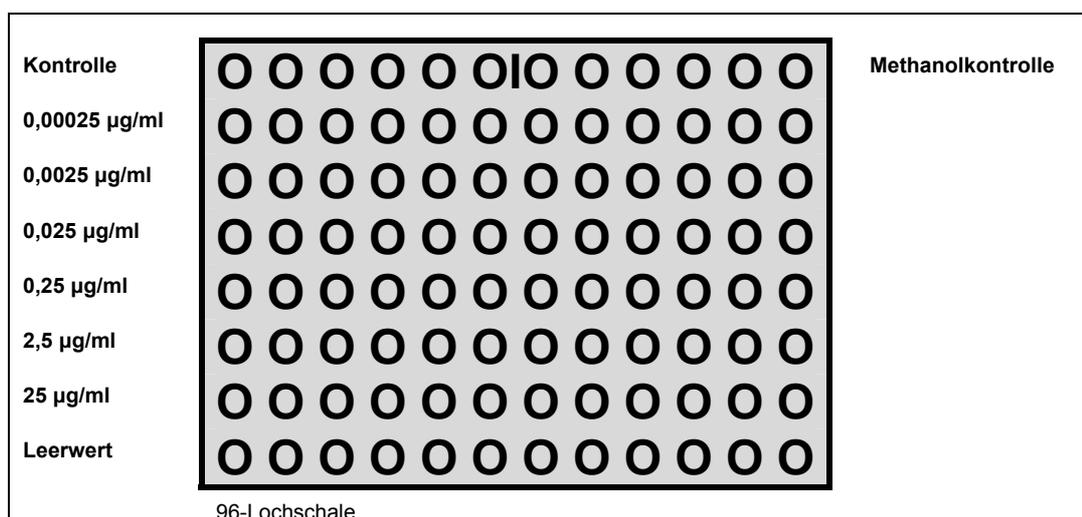


Abb. 3
Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Vitalitätsmessung

2.4. Durchflusszytometrie zur Messung der ICAM-1-Expression

(siehe auch Tab. 2 – Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Messung der ICAM-1-Expression)

Die Expression des TNF- α -induzierten Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD 54) von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC wurde in je drei gleichen Versuchsansätzen nach Antikörpermarkierung im Durchflusszytometer unter Inkubation über 12 h mit folgenden Konzentrationen von Clopidogrel Hydrogen Sulphate gemessen:

25 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,025 $\mu\text{g/ml}$; 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,00025 $\mu\text{g/ml}$.

Zunächst wurde hierzu in 6-Lochschalen (B.1.4.6) in 13 Vertiefungen die entsprechende Zellart kultiviert wie unter B.2.2.1 beschrieben. Nach 12 h wurde TNF- α [20 ng/ml] über 6 h zugegeben. Als Negativkontrolle wurde den Zellen einer Vertiefung Actinomycin-D-Lösung über 12 h zugesetzt (Probe 11). Nach zwölf Stunden Inkubationszeit wurde die Expression von ICAM-1 in Zellen der betreffenden Vertiefungen (siehe Tab. 2) mit TNF- α stimuliert. Als weitere Kontrollen wurden eine stimulierte Kontrolle (Probe 12) sowie eine nicht stimulierte Kontrolle (Probe 13) ohne Zugabe der Testsubstanz mitgeführt.

2.4.1. Antikörpermarkierung für die Messung der ICAM-1-Expression

Zunächst wurde das Medium mit den zugesetzten Substanzen abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 2 ml PBS⁻ pro Vertiefung gespült. Danach erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Solution die Ablösung der Zellen von der Unterlage und die Suspension in 9 ml Cytoflowpuffer. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (B.1.4.7). Der Überstand wurde abgekippt. Für einen weiteren Waschvorgang erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 1 ml Cytoflowpuffer. Die Suspension wurde für eine weitere Zentrifugation (B.1.4.7) in Eppendorf Cups überführt. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Suspension des Pellets in 100 μ l Anti-ICAM-1-FITC (B.1.4.4) und die Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Die Eigenfluoreszenzkontrolle wurde nicht markiert. Für die stimulierte und nicht stimulierte Kontrolle erfolgte die Markierung mit Anti-IgG-FITC. Danach wurde mit Cytoflowpuffer auf 1 ml pro Eppendorf Cup aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet mit den nun antikörpermarkierten Zellen wurde in je 500 μ l Cytoflowpuffer aufgenommen und in die Messgefäße (B.1.4.5) für die Durchflusszytometrie überführt. Schließlich wurde zur Markierung der nicht vitalen Zellen pro Messgefäß 1 μ l Propidiumiodid zugesetzt.

2.4.2. Messung und Auswertung der ICAM-1-Expression

Je Probe beurteilten wir 10 000 markierte Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität. Die mittlere Fluoreszenzintensität dieser 10 000 Zellen wurde vom Gerät (B.1.4.7) als Meanwert angegeben. Die mittlere ICAM-1-Expression nach Stimulation mit TNF- α ohne Zugabe weiterer Test-

substanzen (Probe 3) wurde gleich 100 % ICAM-1-Expression gesetzt. Die ICAM-1-Expression der anderen Proben wurde prozentual im Verhältnis zur Expression in Probe 3 errechnet.

Tab. 2:
Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Messung der ICAM-1-Expression

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1
FITC: Fluoresceinisotiocyanat
IgG: Immunglobulin G
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

Zeitachse Probenbezeichnung		12 Stunden			6 Stunden	Mind. 20 Minuten
1	Eigenfluoreszenz	---	---	---	Fluoreszenzmessung	
2	Grundexpression	---	---	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
3	Expression nach Stimulation	---	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
4	CHS [0,00025 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
5	CHS [0,0025 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
6	CHS [0,025 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
7	CHS [0,25 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
8	CHS [2,5 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
9	CHS [25 μ g/ml]	Inkubation mit CHS	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
10	Methanolkontrolle	Inkubation mit Methanol	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
11	Actinomycin-D-Negativkontrolle	Inkubation mit Actinomycin-D	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-ICAM-1-FITC	Fluoreszenzmessung	
12	Stimulierte Kontrolle	---	Stimulation mit TNF- α	Markierung mit Anti-IgG-FITC	Fluoreszenzmessung	
13	Nicht stimulierte Kontrolle	---	---	Markierung mit Anti-IgG-FITC	Fluoreszenzmessung	

2.5. Statistik

2.5.1. Statistische Bewertung der Proliferationsmessung

Die Nullhypothese H_0 besagt, dass es durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an CHS zu keiner signifikanten Veränderung der TNF- α -stimulierten Zellproliferation kommt. Es wurde eine zweiseitige Fragestellung gewählt, um gegebenenfalls nicht nur eine Hemmung sondern auch eine eventuelle Stimulation der Zellproliferation zu erfassen. Als Prüfgröße dienten die jeweiligen Zellzahlen nach Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an CHS. Bei Gültigkeit von H_0 läge eine Normalverteilung vor. Zur Überprüfung von H_0 wurde ein paired-t-test verwendet (Programm SigmaStat 2.0). Bei kleiner Fallzahl wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

2.5.2. Statistische Bewertung der Vitalitätsmessung

Die Nullhypothese H_0 besagt, dass es durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an CHS zu keiner signifikanten Veränderung der Zellvitalität kommt. Es wurde eine zweiseitige Fragestellung gewählt, um gegebenenfalls nicht nur eine Einschränkung sondern auch eine eventuelle protektive Wirkung zu erfassen. Als Prüfgröße dienten die jeweiligen ermittelten Lichtintensitäten nach Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an CHS. Bei Gültigkeit von H_0 läge eine Normalverteilung vor. Zur Überprüfung von H_0 wurde ein t-test verwendet (Programm SigmaStat 2.0). Bei kleiner Fallzahl wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

2.5.3. Statistische Bewertung der Messung der ICAM-1-Expression

Die Nullhypothese H_0 besagt, dass es durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an CHS zu keiner signifikanten Veränderung der TNF- α -stimulierten ICAM-1-Expression kommt. Es wurde eine zweiseitige Fragestellung gewählt, um gegebenenfalls nicht nur eine Hemmung sondern auch eine eventuelle Stimulation der ICAM-1-Expression zu erfassen. Als Prüfgröße dienten die jeweils ermittelten Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an

CHS. Bei Gültigkeit von H_0 läge eine Normalverteilung vor. Zur Überprüfung von H_0 wurde ein paired-t-test verwendet (Programm SigmaStat 2.0), da hierfür der Vergleich von Wertepaaren erfolgte. Bei kleiner Fallzahl wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

C. Ergebnisse

1. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulphate auf die Zellproliferation

Bei der Proliferationsmessung wurde jeweils die absolute Zellzahl in Abhängigkeit von der CHS-Konzentration gemessen. Vom Wert der Kontrolle wurde der Wert der 24-Stundenkontrolle abgezogen und das Ergebnis gleich 100 % Proliferation gesetzt. Von den anderen Werten wurde ebenfalls der Wert der 24-Stundenkontrolle abgezogen und die Proliferation prozentual im Verhältnis zur Kontrolle errechnet.

Im Folgenden werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen pro Zellreihe angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Paired-t-Test überprüft; die Irrtumswahrscheinlichkeit p gibt wieder, ob eine signifikante Veränderung der Zellproliferation auftrat.

1.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

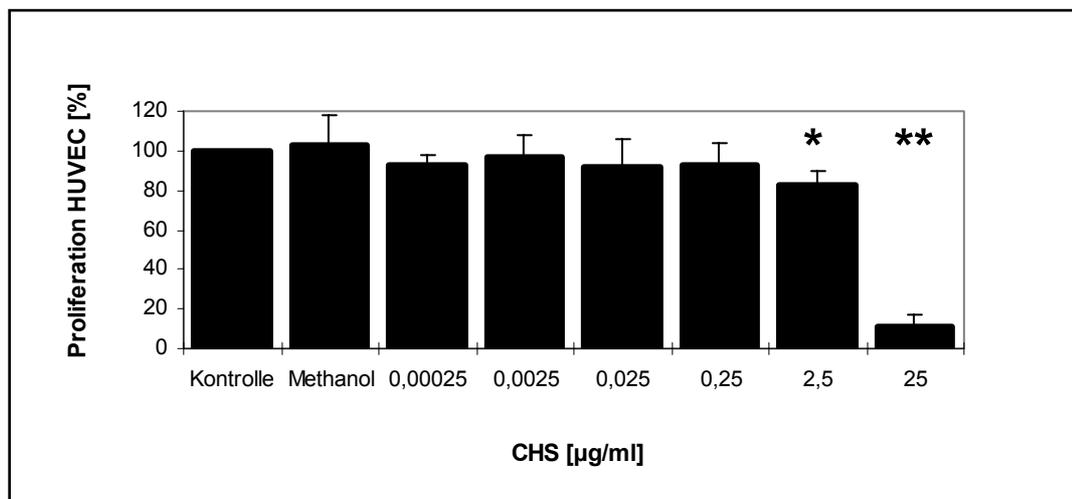


Abb. 4
Proliferation der HUVEC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Die mit Methanol behandelten HUVEC zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine Proliferation von $102,7 \pm 15,3$ %. Zellen, die mit $0,00025$ µg/ml CHS behandelt wurden proliferierten geringfügig weniger, $92,6 \pm 5,2$ %. Die Zugabe von $0,0025$ µg/ml CHS führte zu einer Proliferation von $96,7 \pm 11,4$ %. Steigerte man die Konzentration von CHS auf $0,025$ µg/ml, so

zeigte sich eine Proliferation von $91,3 \pm 14,2$ %, während die mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelten Zellen eine Proliferation von $92,4 \pm 11,7$ % aufwiesen. Für alle bis hierher aufgeführten Konzentrationen an CHS erbrachte der Paired-t-Test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Zellen, die mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHS inkubiert wurden, proliferierten mit einer Rate von $82,3 \pm 7,4$ %. Dieses Ergebnis war im Vergleich zum Kontrollwert signifikant mit $p < 0,05$. Bei den mit $25 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelten Zellen sank die Proliferation schließlich auf $10,7 \pm 6,7$ % vom Kontrollwert. Die Proliferation wurde hier signifikant gehemmt mit $p < 0,01$.

1.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)

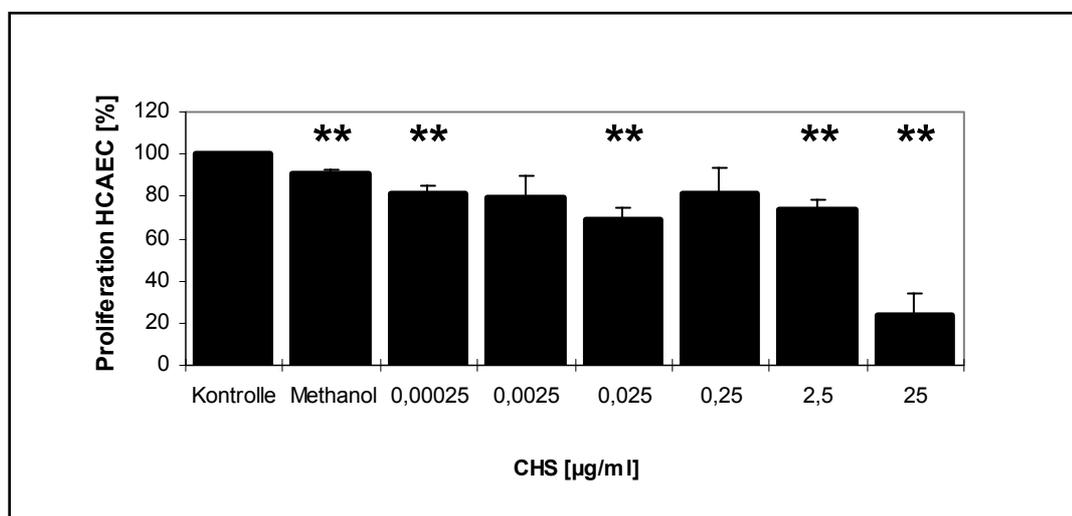


Abb. 5
Proliferation der HCAEC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen $0,00025 \mu\text{g/ml}$; $0,0025 \mu\text{g/ml}$; $0,025 \mu\text{g/ml}$; $0,25 \mu\text{g/ml}$; $2,5 \mu\text{g/ml}$; $25 \mu\text{g/ml}$. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (** = $p < 0,01$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

Die mit Methanol behandelten HCAEC zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine Proliferation von $91,1 \pm 1,5$ %, entsprechend einer Signifikanz von $p < 0,01$. Zellen, die mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelt wurden, proliferierten mit $81,7 \pm 3,6$ % geringfügig weniger. Auch hier erbrachte der Paired-t-Test ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,01$. Die Zugabe von $0,0025 \mu\text{g/ml}$ CHS führte zu einer Proliferation von $78,9 \pm 11,2$ % (n.s.). Steigerte man die Konzentration von CHS auf $0,025 \mu\text{g/ml}$, so zeigte sich eine Proliferation von $69,2 \pm 5,4$ %, was einer Signifikanz von $p < 0,01$ entsprach. Die mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelten Zellen wiesen eine Proliferation von $81,7 \pm 11,9$ %

(n.s.) auf. Zellen, die mit 2,5 µg/ml CHS inkubiert wurden, proliferierten mit einer Rate von $73,4 \pm 5,0$ %. Dieses Ergebnis war signifikant mit $p < 0,01$. Bei den mit 25 µg/ml CHS behandelten Zellen sank die Proliferation schließlich auf $24,0 \pm 10,3$ % vom Kontrollwert. Die Proliferation wurde hier signifikant gehemmt mit $p < 0,01$.

1.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)

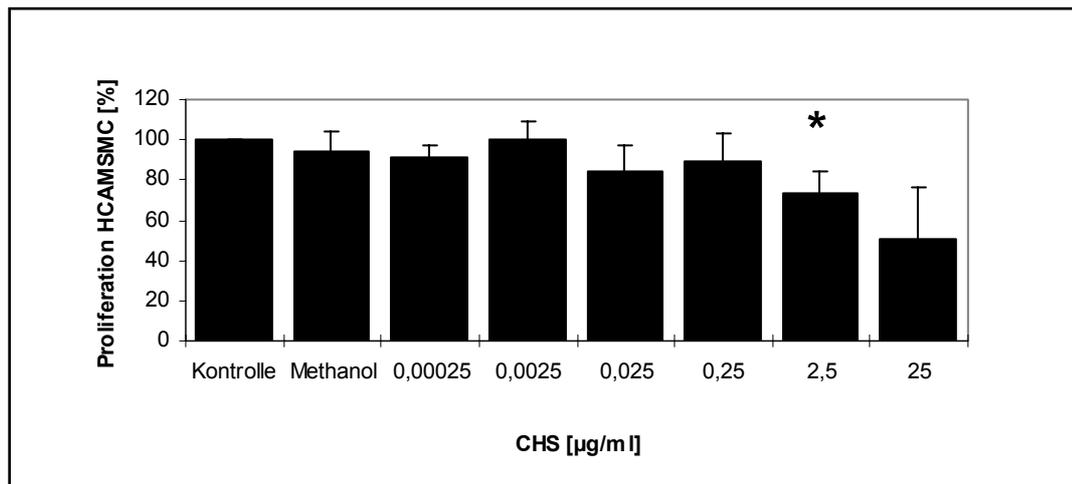


Abb. 6
Proliferation der HCAMSMC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (* = $p < 0,05$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate
HCAMSMC: Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells

Die mit Methanol behandelten HCAMSMC zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine Proliferation von $94,2 \pm 9,8$ % (n.s.). Zellen, die mit 0,00025 µg/ml CHS behandelt wurden, proliferierten mit $91,7 \pm 5,6$ % geringfügig weniger (n.s.). Die Zugabe von 0,0025 µg/ml CHS führte zu einer Proliferation von $100,2 \pm 8,8$ % (n.s.). Steigerte man die Konzentration von CHS auf 0,025 µg/ml, so zeigte sich eine Proliferation von $84,3 \pm 12,8$ % (n.s.), während die mit 0,25 µg/ml CHS behandelten Zellen eine Proliferation von $89,6 \pm 13,3$ % (n.s.) aufwiesen. Zellen, die mit 2,5 µg/ml CHS inkubiert wurden, proliferierten mit einer Rate von $73,7 \pm 10,7$ %. Der Paired-t-test ergab hier ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,05$. Bei den mit 25 µg/ml CHS behandelten Zellen sank die Proliferation schließlich auf $50,5 \pm 25,4$ % (n.s.) vom Kontrollwert.

1.4. Proliferation von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich

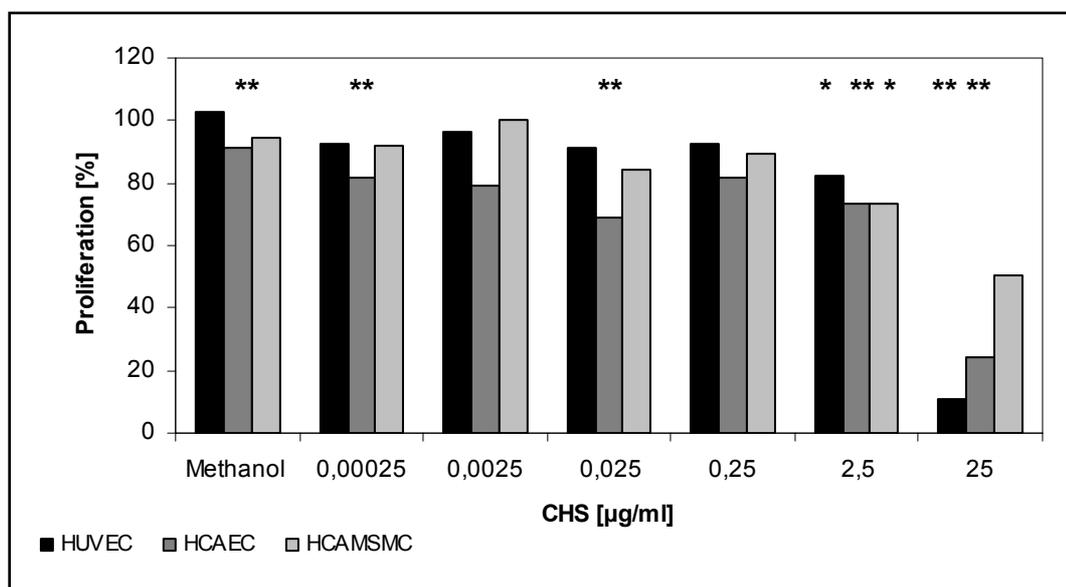


Abb. 7

Vergleich der Zellproliferation von HCAMSMC, HUVEC, HCAEC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml und je einer Methanolkontrolle pro Zellart. (* = p<0,05; ** = p<0,01)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

HCAMSMC: Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells

Alle drei Zellarten wurden durch die Applikation von CHS signifikant in ihrer Proliferation gehemmt. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei der Behandlung mit 25 µg/ml CHS, allerdings war bei den HCAMSMC mit einer Inhibition auf $50,5 \pm 25,4$ % im Gegensatz zu den beiden anderen Zellarten hier kein signifikantes Ergebnis festzustellen. Eine signifikante Hemmung der Proliferation ließ sich bei dieser Zellart nur durch die Behandlung mit 2,5 µg/ml CHS erreichen. Sie betrug $73,7 \pm 10,7$ %. Die Proliferation der HUVEC wurde durch die Behandlung mit 25 µg/ml CHS signifikant auf $10,7 \pm 6,7$ % und durch Inkubation mit 2,5 µg/ml CHS auf $82,3 \pm 7,4$ % des Ausgangswertes gesenkt. Vergleichsweise ähnlich verhielten sich die HCAEC unter diesen Konzentrationen und zeigten ebenfalls signifikante Ergebnisse mit einer Inhibition auf $24,0 \pm 10,3$ % für 25 µg/ml CHS bzw. auf $73,4 \pm 5,0$ % für 2,5 µg/ml CHS. Auffällig ist, dass ausschließlich die HCAEC auch schon bei niedrigeren Konzentrationen an CHS eine signifi-

kante Hemmung der Zellproliferation aufwiesen. Bei den anderen beiden Zellarten war diese Tendenz zwar weniger ausgeprägt, aber ebenfalls erkennbar. Allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant.

In der Methanolkontrolle wurde bei den HCAEC eine signifikante Veränderung der Proliferation festgestellt; sie sank auf $91,1 \pm 1,5 \%$.

2. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulfate auf die Zellvitalität

Für die Vitalitätsmessung wurde aus den 12 Werten für jede Konzentration, den je sechs Werten für die Kontrolle und die Methanolkontrolle und aus den zwölf Werten für den Leerwert jeweils der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert des Leerwertes wurde von den anderen Mittelwerten abgezogen und der so erhaltene Wert aus der Kontrolle gleich 100 % Vitalität gesetzt. Die Vitalität der mit Clopidogrel bzw. Methanol inkubierten Zellen wurde prozentual im Verhältnis zur Kontrolle errechnet.

Es werden die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen in Prozent angegeben. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p gibt wieder, ob eine statistisch signifikante Reduktion des vitalen Zellanteils auftrat.

2.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

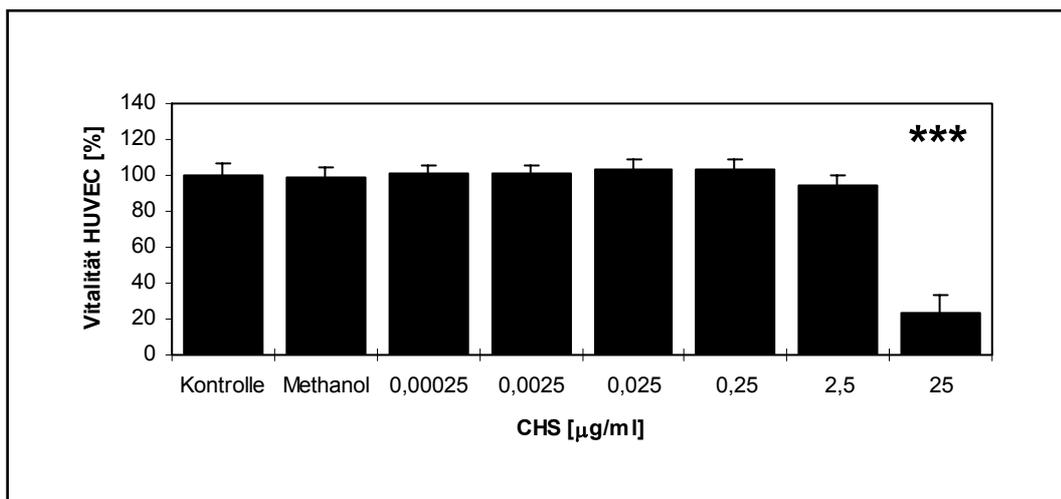


Abb. 8
Anteil vitaler HUVEC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025µg/ml; 0,25µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (***) = $p < 0,001$

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Die mit Methanol inkubierten HUVEC zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen vitalen Zellanteil von $99,0 \pm 5,2 \%$ (n.s.). Wurden die Zellen mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelt, so zeigte sich eine Vitalität von $100,6 \pm 5,4 \%$ (n.s.). Erhöhte man die Konzentration weiter auf $0,0025 \mu\text{g/ml}$ CHS, so änderte das die Vitalität der Zellen nur geringfügig auf $101,4 \pm 3,9 \%$ (n.s.). Eine weitere Erhöhung der Konzentration an CHS auf $0,025 \mu\text{g/ml}$ führte zu einem vitalen Prozentsatz an HUVEC von $103,2 \pm 5,9 \%$ (n.s.). Zellen, die mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS inkubiert wurden, wiesen einen vitalen Anteil von $103,8 \pm 5,1 \%$ (n.s.) auf; dieser änderte sich bei einer weiteren Erhöhung der CHS-Konzentration auf $2,5 \mu\text{g/ml}$ auf $94,6 \pm 5,5 \%$ (n.s.). Durch die Inkubation mit $25 \mu\text{g/ml}$ sank der Anteil an vitalen HUVEC auf $23,1 \pm 10,1\%$. Der t-Test ergab ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,001$.

2.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)

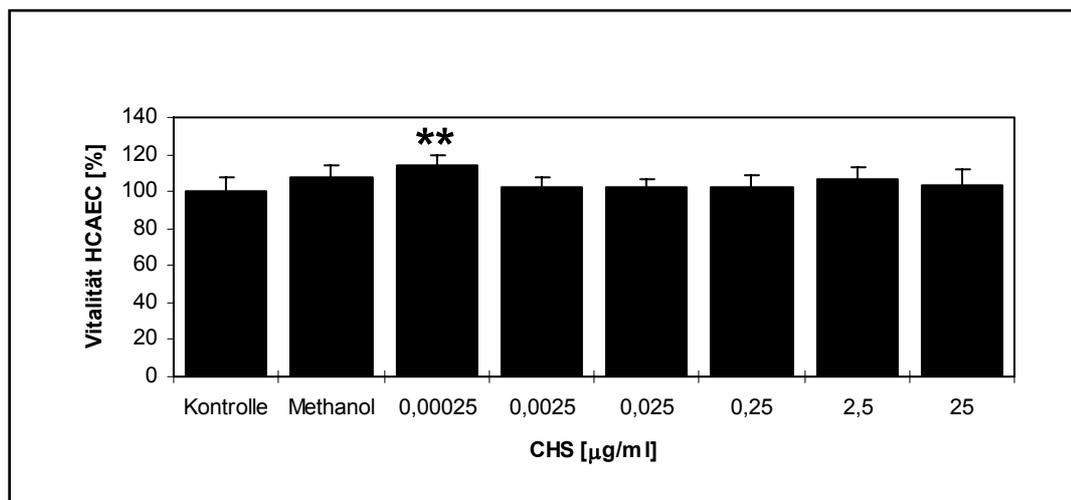


Abb. 9
Anteil vitaler HCAEC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen $0,00025 \mu\text{g/ml}$; $0,0025 \mu\text{g/ml}$; $0,025 \mu\text{g/ml}$; $0,25 \mu\text{g/ml}$; $2,5 \mu\text{g/ml}$; $25 \mu\text{g/ml}$. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (** = $p < 0,01$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate
HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

Die mit Methanol inkubierten HCAEC zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen vitalen Zellanteil von $108,2 \pm 6,3 \%$ (n.s.). Wurden die Zellen mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelt, so zeigte sich eine Vitalität von $113,8 \pm 6,0 \%$. Hier ergab der t-Test ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,01$. Erhöhte man die Konzentration weiter auf $0,0025 \mu\text{g/ml}$ CHS, so änderte das die Vitalität der Zellen auf $101,8 \pm 5,6 \%$ (n.s.). Eine weitere Erhöhung der

Konzentration an CHS auf 0,025 µg/ml führte zu einem vitalen Prozentsatz an HCAEC von $102,5 \pm 4,4 \%$ (n.s.). Zellen, die mit 0,25 µg/ml CHS inkubiert wurden, wiesen einen vitalen Anteil von $102,5 \pm 6,4 \%$ (n.s.) auf; dieser änderte sich bei einer weiteren Erhöhung der CHS-Konzentration auf 2,5 µg/ml auf $106,7 \pm 5,9 \%$ (n.s.). Durch die Inkubation mit 25 µg/ml ergab sich eine Vitalität von $103,7 \pm 8,8 \%$ (n.s.).

2.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)

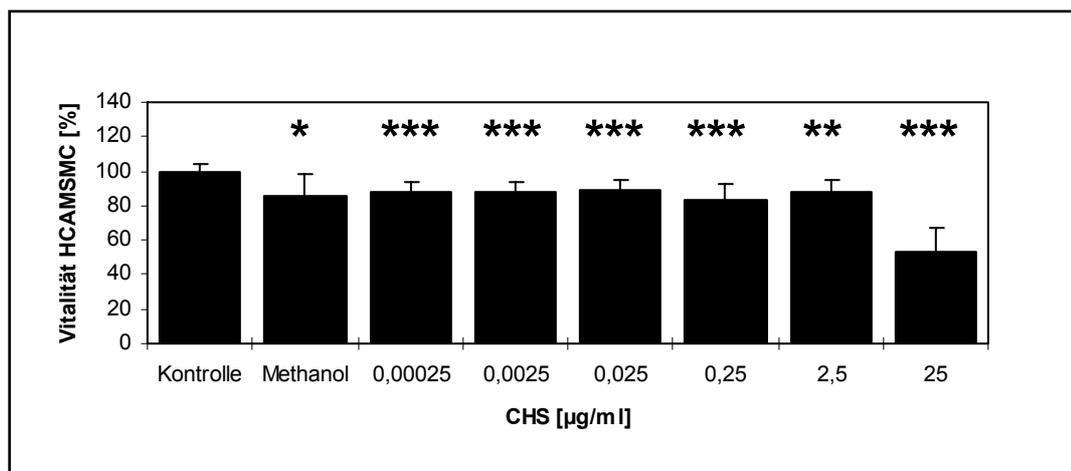


Abb. 10

Anteil vitaler HCAMSMC nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml. Einer Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol zugesetzt. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HCAMSMC: Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

Die mit Methanol inkubierten HCAMSMC zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen vitalen Zellanteil von $86,0 \pm 12,6 \%$. Der t-Test ergab hierfür eine statistische Signifikanz mit $p < 0,05$. Wurden die Zellen mit 0,00025 µg/ml CHS behandelt, so zeigte sich eine Vitalität von $88,2 \pm 6,0 \%$. Dieses Ergebnis war signifikant mit $p < 0,001$. Erhöhte man die Konzentration weiter auf 0,0025 µg/ml CHS, so änderte das die Vitalität der Zellen auf $88,4 \pm 5,8 \%$. Eine weitere Erhöhung der Konzentration an CHS auf 0,025 µg/ml führte zu einem vitalen Prozentsatz an HCAMSMC von $89,0 \pm 5,3 \%$. Auch bei diesen beiden Ergebnissen zeigte der t-Test eine statistisch signifikante Verringerung des vitalen Zellanteils mit $p < 0,001$. Zellen, die mit 0,25 µg/ml CHS inkubiert wurden, wiesen einen vitalen Anteil von $82,9 \pm 9,9 \%$ auf. Hier ergab sich eine statistische Signifikanz mit $p < 0,001$. Der Anteil vitaler HCAMSMC änderte sich bei einer weiteren Erhöhung der CHS-Konzen-

tration auf 2,5 µg/ml auf $88,5 \pm 6,5 \%$, was einem statistisch signifikanten Ergebnis mit $p < 0,01$ entspricht. Durch die Inkubation mit 25 µg/ml sank der vitale Zellanteil auf $53,5 \pm 13,5 \%$. Der t-Test ergab ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,001$.

2.4. Vitalität von HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich

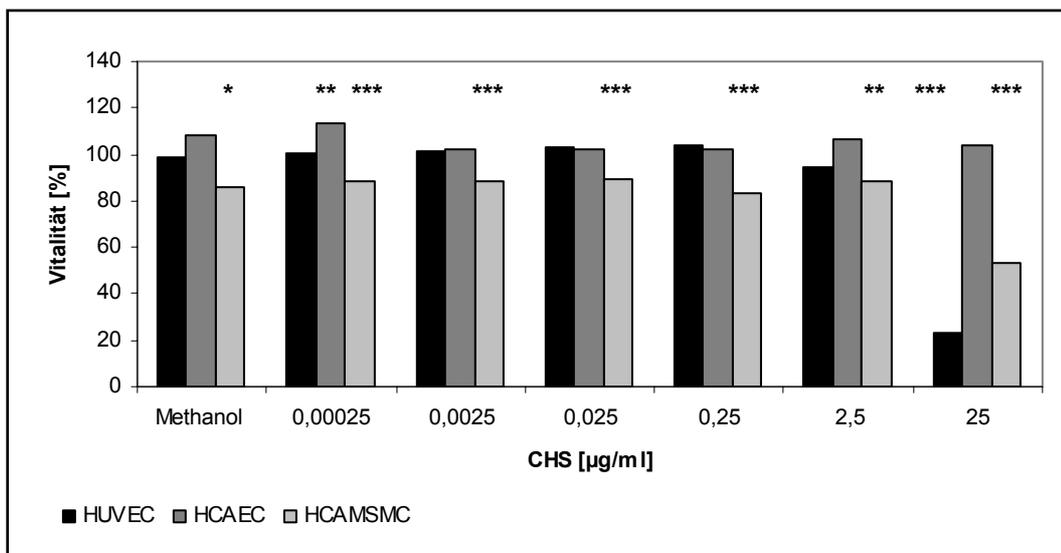


Abb. 11

Vergleich des Anteils vitaler Zellen nach fünftägiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml und je einer Methanolkontrolle pro Zellart. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

HCAMSMC: Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells

Die verschiedenen Zellarten zeigten unter der Behandlung mit CHS ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Vitalität. Während der Anteil vitaler Zellen unter Inkubation mit 25 µg/ml CHS bei den HUVEC und HCAMSMC sank (HUVEC: $23,1 \pm 10,1 \%$, HCAMSMC: $53,5 \pm 13,5 \%$), wurde die Vitalität der HCAEC auch bei hohen Konzentrationen an CHS kaum beeinflusst. Auch nach Inkubation mit 25 µg/ml CHS betrug der Anteil an vitalen Zellen noch $103,7 \pm 8,8 \%$. Allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant. Jedoch zeigte sich bei Behandlung der gleichen Zellen mit 0,00025 µg/ml CHS überraschenderweise ein signifikanter Anstieg an vitalen Zellen auf $113,8 \pm 6,0 \%$ vom Ausgangswert. Die HCAMSMC hingegen wiesen auch unter niedrigeren Konzentrationen an CHS bereits eine signifikante Senkung ihrer Vitalität auf. So zeigten die mit 0,00025

$\mu\text{g/ml}$ – 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHS behandelten HCAMSMC einen vitalen Anteil im Bereich von etwa 82 % - 89 %. Auch unter Inkubation mit Methanol sank der vitale Zellanteil signifikant auf $86,0 \pm 12,6$ %.

3. Effekte von Clopidogrel Hydrogen Sulphate auf die zelluläre ICAM-1-Expression

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von jeweils 10 000 Zellen je Probe als Meanwert angegeben. Die mittlere ICAM-1-Expression nach Stimulation mit TNF- α ohne Zugabe weiterer Testsubstanzen wurde gleich 100 % ICAM-1-Expression gesetzt. Die ICAM-1-Expression der anderen Proben wurde prozentual im Verhältnis dazu errechnet. Im Folgenden werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen je Zellart angegeben. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde ein Paired-t-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p gibt an, ob CHS die ICAM-1-Expression signifikant hemmt.

3.1. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

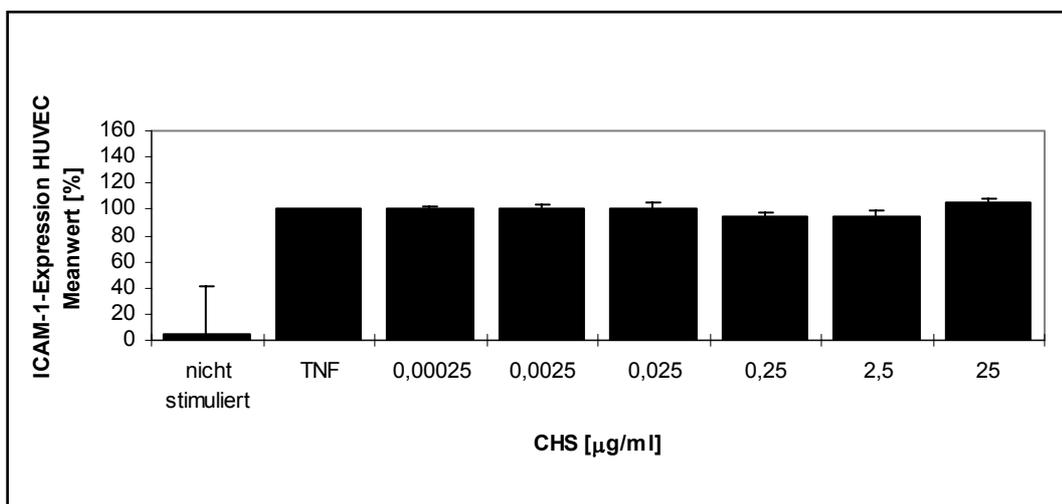


Abb. 12

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HUVEC nach 18-stündiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 $\mu\text{g/ml}$; 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,025 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$. Mit aufgeführt sind die nicht stimulierte Kontrolle sowie die stimulierte Kontrolle ohne CHS-Zugabe. Alle Werte ausgedrückt als Meanwert [%].

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Der Meanwert der nicht stimulierten HUVEC betrug $4,7 \pm 37,0$ % des Wertes, der nach Stimulation mit TNF- α erreicht wurde. Unter Behandlung mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS erreichte die ICAM-1-Expression $100,6 \pm 1,3$ %, bei Inkubation mit $0,0025 \mu\text{g/ml}$ erreichte sie $101,2 \pm 2,7$ %. Nach Behandlung mit $0,025 \mu\text{g/ml}$ CHS ließ sich eine ICAM-1-Expression von $101,0 \pm 3,9$ % nachweisen, die mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelten Zellen erreichten einen Wert von $94,3 \pm 3,8$ %. Die Inkubation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHS ergab eine ICAM-1-Expression von $95,1 \pm 4,3$ % des Ausgangswertes. Die mit $25 \mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen wiesen einen ICAM-1-Expressionswert von $104,4 \pm 3,3$ % auf. Keines dieser Ergebnisse war signifikant.

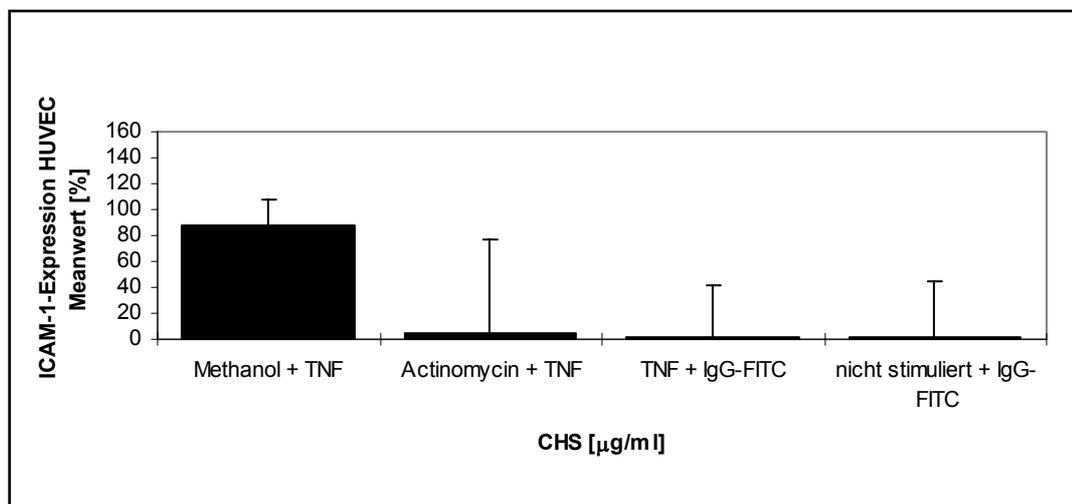


Abb. 13

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HUVEC-Kontrollen nach 18-stündiger Inkubation ausgedrückt als Meanwert [%]: Methanol-Kontrolle, Actinomycin-Kontrolle, nicht stimulierte IgG-FITC-Kontrolle, stimulierte IgG-FITC-Kontrolle.

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

FITC: Fluoresceinisotiocyanat

IgG: Immunglobulin G

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

In der Methanolkontrolle wurde eine ICAM-1-Expression von $87,0 \pm 21,2$ % erreicht, der Wert der Negativkontrolle (Actinomycin + TNF) betrug $4,2 \pm 73$ %. Die stimulierte Kontrolle (TNF + IgG-FITC) wies eine ICAM-1-Expression von $1,6 \pm 39,5$ % auf, in der nicht stimulierten Kontrolle wurde ein Wert von $1,4 \pm 42,8$ % erreicht.

3.2. HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)

Bei den nicht stimulierten HCAEC betrug der Meanwert $27,0 \pm 110,8$ % des Wertes, der nach Stimulation mit TNF- α erreicht wurde. Wurden die Zellen mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelt, ergab sich eine ICAM-1-Expression von $100,8 \pm 5,0$ %, bei Inkubation mit $0,0025 \mu\text{g/ml}$ erreichte sie $103,8 \pm 1,8$ %.

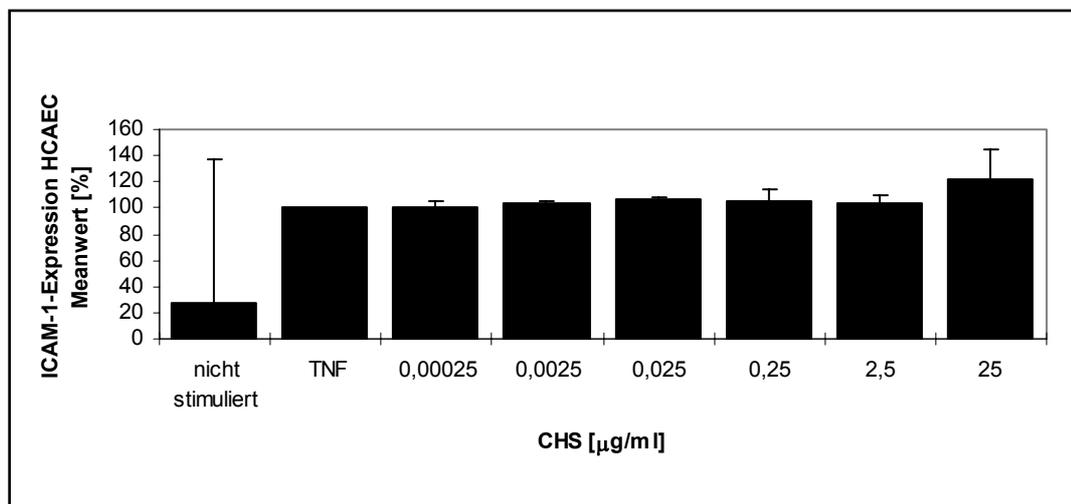


Abb. 14

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HCAEC nach 18-stündiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen $0,00025 \mu\text{g/ml}$; $0,0025 \mu\text{g/ml}$; $0,025 \mu\text{g/ml}$; $0,25 \mu\text{g/ml}$; $2,5 \mu\text{g/ml}$; $25 \mu\text{g/ml}$. Mit aufgeführt sind die nicht stimulierte Kontrolle sowie die stimulierte Kontrolle ohne CHS-Zugabe. Alle Werte ausgedrückt als Meanwert [%].

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

Die Behandlung mit $0,025 \mu\text{g/ml}$ CHS erbrachte eine ICAM-1-Expression von $106,3 \pm 1,3$ %, inkubiert mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS ließ sich ein Wert von $105,7 \pm 8,7$ % nachweisen. Die Inkubation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHS erbrachte eine ICAM-1-Expression von $103,2 \pm 7,2$ % des Ausgangswertes. Die mit $25 \mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen wiesen einen ICAM-1-Expressionswert von $122,9 \pm 22,5$ % auf. Für keinen dieser Werte ergab der Paired-t-Test ein signifikantes Ergebnis.

Die Methanolkontrolle erbrachte eine ICAM-1-Expression von $98,4 \pm 5,6$ %, der Wert der Negativkontrolle (Actinomycin + TNF) betrug $10,1 \pm 79,8$ %. Die stimulierte Kontrolle (TNF + IgG-FITC) ergab eine ICAM-1-Expression von $0,8 \pm 12,5$ %. Die nicht stimulierte Kontrolle wies einen Wert von $0,6 \pm 37,1$ % auf.

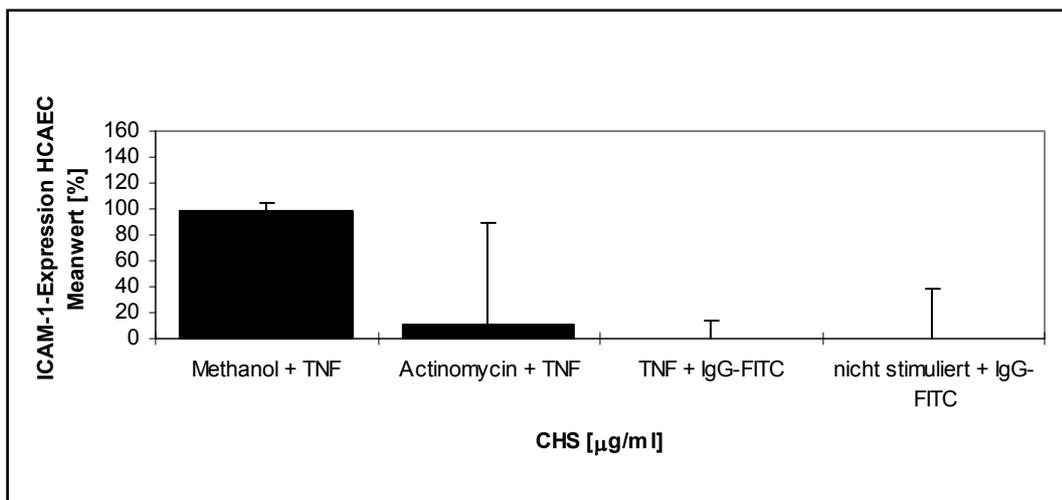


Abb. 15

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HCAEC-Kontrollen nach 18-stündiger Inkubation ausgedrückt als Meanwert [%]: Methanol-Kontrolle, Actinomycin-Kontrolle, nicht stimulierte IgG-FITC-Kontrolle, stimulierte IgG-FITC-Kontrolle.

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

FITC: Fluoresceinisotiocyanat

IgG: Immunglobulin G

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

3.3. HCAMSMC (Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells)

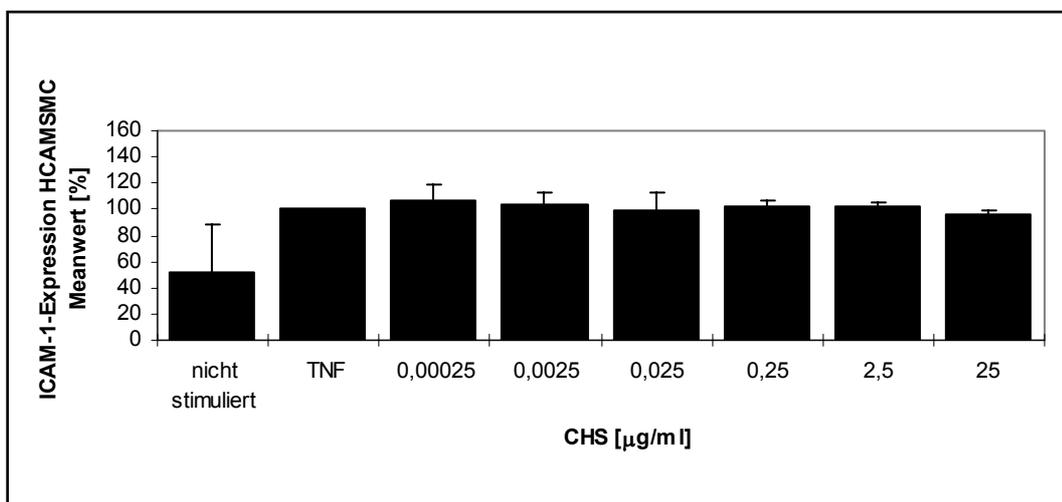


Abb. 16

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HCAMSMC nach 18-stündiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 µg/ml; 0,0025 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 25 µg/ml. Mitgeführt sind die nicht stimulierte Kontrolle sowie die stimulierte Kontrolle ohne CHS-Zugabe. Alle Werte ausgedrückt als Meanwert [%].

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HCAMSMC: Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

Der Meanwert der nicht stimulierten HCAMSMC betrug $51,1 \pm 37,6$ % des Wertes, der nach Stimulation mit TNF- α erreicht wurde. Unter Behandlung mit $0,00025 \mu\text{g/ml}$ CHS ergab sich eine ICAM-1-Expression von $107,0 \pm 12,6$ %, bei Inkubation mit $0,0025 \mu\text{g/ml}$ erreichte sie $103,0 \pm 9,1$ %. Nach Behandlung mit $0,025 \mu\text{g/ml}$ CHS ließ sich eine ICAM-1-Expression von $98,3 \pm 14,9$ % nachweisen, die mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ CHS behandelten HCAMSMC wiesen einen Wert von $101,6 \pm 4,6$ % auf. Die Inkubation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHS erbrachte eine ICAM-1-Expression von $102,2 \pm 3,1$ % des Ausgangswertes. Die mit $25 \mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen wiesen einen ICAM-1-Expressionswert von $96,0 \pm 2,4$ % auf. Keines dieser Ergebnisse war signifikant.

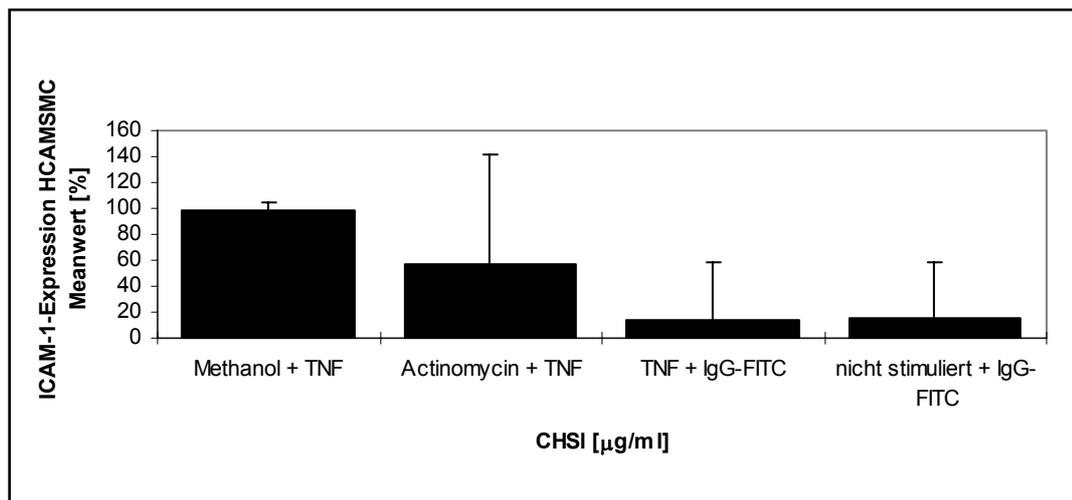


Abb. 17

TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression der HCAMSMC-Kontrollen nach 18-stündiger Inkubation ausgedrückt als Meanwert [%]: Methanol-Kontrolle, Actinomycin-Kontrolle, nicht stimulierte IgG-FITC-Kontrolle, stimulierte IgG-FITC-Kontrolle.

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

FITC: Fluoresceinisotiocyanat

IgG: Immunglobulin G

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HCAMSMC: Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

In der Methanolkontrolle wurde eine ICAM-1-Expression von $98,2 \pm 5,7$ % erreicht, der Wert der Negativkontrolle (Actinomycin + TNF) betrug $57,1 \pm 83,8$ %. Die stimulierte Kontrolle (TNF + IgG-FITC) wies eine ICAM-1-Expression von $13,2 \pm 45,2$ % auf, in der nicht stimulierten Kontrolle wurde ein Wert von $14,8 \pm 44,4$ % erreicht.

3.4. ICAM-1-Expression bei HUVEC, HCAEC und HCAMSMC im Vergleich

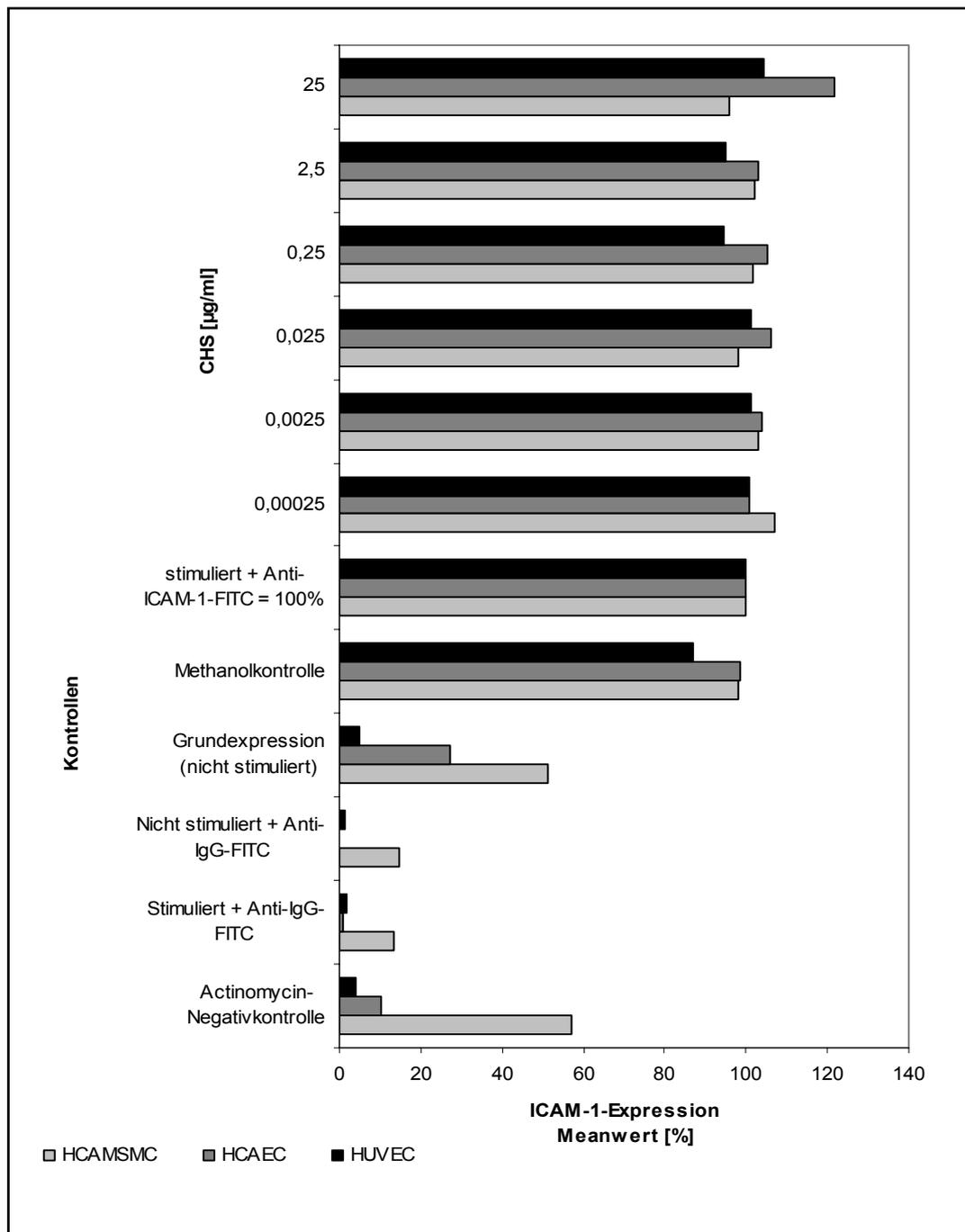


Abb. 18

Vergleich der TNF- α -stimulierten ICAM-1-Expression von HCAEC, HUVEC und HCAMSMC nach 18-stündiger Inkubation mit CHS in den Konzentrationen 0,00025 $\mu\text{g/ml}$; 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,025 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$. Mit aufgeführt: nicht stimulierte Kontrolle, stimulierte Kontrolle ohne CHS-Zugabe, Methanol-Kontrolle, Actinomycin-Kontrolle, nicht stimulierte IgG-FITC-Kontrolle, stimulierte IgG-FITC-Kontrolle. Alle Werte ausgedrückt als Meanwert [%]

CHS: Clopidogrel Hydrogen Sulphate

FITC: Fluoresceinisotiocyanat

IgG: Immunglobulin G

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells

HCAMSMC: Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

Alle Zellarten zeigten unter allen Konzentrationen eine TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression um 100 %. Auch in der Methanolkontrolle war keine wesentliche Änderung in der ICAM-1-Expression zu verzeichnen.

Auch die anderen Kontrollen verhielten sich erwartungsgemäß: Die HCAMSMC zeigten bereits in der nicht stimulierten Probe eine höhere Grundexpression (51,1 %) als die HUVEC (4,7 %) und HCAEC (27,0 %), dementsprechend fiel ihr ICAM-1-Expressionswert auch in der mit Actinomycin D behandelten Kontrolle (57,1 %) sowie in den mit dem IgG-Isotyp inkubierten Kontrollen, stimuliert (13,2 %) und nicht stimuliert (14,8 %), höher aus als bei den anderen beiden Zellarten.

D. Diskussion

1. CHS – geeignete Wirkmechanismen zur Restenoseprophylaxe?

Die Weiterentwicklung der DES ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur weiteren Senkung der Restenoserate nach koronarer Gefäßintervention. Um optimale Ergebnisse zu erzielen sollen die hierfür verwendeten Substanzen lokal gezielt auf möglichst viele pathogenetisch relevante Entstehungsmechanismen der Restenose einwirken. Für Rapamycin (Sirolimus) beispielsweise wiesen Suzuki et al. 2001 in einem Restenose-Modell am Schwein die inhibitorische Wirkung auf zahlreiche Phasen der Restenose-Entstehung nach [52]. Auch die Substanz Paclitaxel wirkt inhibierend auf die vaskuläre Zellproliferation und Migration [48]. In großen kontrollierten randomisierten Studien wurde inzwischen die Effektivität von Sirolimus- und Paclitaxel-beschichteten Stents sowohl hinsichtlich angiologischer Restenoseparameter als auch hinsichtlich klinischer Endpunkte nachgewiesen [16;27;41;42;51].

Die Substanz CHS weist primär keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten mit Rapamycin oder Paclitaxel auf. Der Erfolg von Rapamycin und Paclitaxel in der Restenoseprophylaxe wird jedoch auf deren bekannte proliferationshemmende/-modulierende Effekte zurückgeführt [35]. Im Einklang hierzu deuten zahlreiche Hinweise darauf hin, dass die bisher in der Therapie und Prophylaxe der koronaren Herzerkrankung eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer ihre positive Wirkung zusätzlich über andere Wirkmechanismen vermitteln. Hier werden vor allem immunmodulierende Effekte postuliert, die über eine entzündungshemmende Komponente ebenfalls zu einer verminderten und ausgeglicheneren Zellproliferation führen könnten. Auch für CHS wurden entzündungshemmende Effekte bereits indirekt nachgewiesen [21;15]; die genauen Wirkmechanismen sind aber bis heute unklar. Gleichzeitig wird immer deutlicher, dass das Risiko einer ISR nach Stentimplantation maßgeblich vom Ausmaß der ablaufenden Entzündungsreaktion abhängt [11]. Hier hat sich gezeigt, dass ICAM-1 nach Katheterintervention eine zentrale Rolle innerhalb der zur Pathogenese der Restenose beitragenden Entzündungsreaktion in der Gefäßwand spielt [56;58]. Shimizu et al. konnten 2004 anhand eines

Hausschwein-Modells zeigen, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 in Koronarien nach Stentimplantation deutlich stärker und länger anhaltend war, als in Koronarien nach alleiniger Ballonangiographie [44]. Deshalb scheint es vielversprechend, nach entsprechenden zur Stentbeschichtung geeigneten Wirkstoffen zu suchen, die an diesem Punkt ansetzen, um modulierend in die ablaufende Entzündungsreaktion einzugreifen.

Betrachtet man die Proliferation verschiedener Gefäßwandzellen im Rahmen des Heilungsprozesses nach Katheterintervention (mit oder ohne Stenteinlage), so muss man zwischen günstigen und ungünstigen Proliferationsreaktionen unterscheiden. Optimal ist eine rasche, aber nicht überschießende Endothelzellproliferation, die zur schnellen und möglichst vollständigen Deckung des bei der Intervention verursachten Endothelzelldefektes bzw. der Innenfläche des eingebrachten Stents führt und damit die Integrität der Gefäßwandoberfläche wieder herstellt. Die zur Restenose führende Kaskade von Mechanismen, ausgehend von der Aktivierung der Thrombozyten und der Entzündungsreaktion durch freiliegende subendotheliale Strukturen und/oder das eingebrachte Fremdmaterial, würde auf diese Weise frühzeitig eingedämmt bzw. sogar unterbrochen. Gerade nach Implantation der heute zur Verfügung stehenden DES stellt die verzögerte (Endothel-)Heilung jedoch noch ein Problem dar [25].

Gleichzeitig setzt ein optimaler Heilungsverlauf ein intaktes Proliferations- und Differenzierungsverhalten der glatten Gefäßwandmuskelzellen (SMC) voraus. Um die eingangs beschriebene Neointimabildung sowie ein ungünstiges vascular remodeling zu verhindern, müssen Stimuli vermieden werden, die zu einer übermäßigen bzw. unverhältnismäßigen Proliferation der SMC führen und eine unausgeglichene Neuorganisation extrazellulärer Matrix nach sich ziehen.

Ein günstiger Wirkstoff zur Beschichtung eines Stents könnte somit zum Beispiel an einem oder mehreren der folgenden entscheidenden zur Restenose beitragenden Pathomechanismen ansetzen:

- Schutz vor der ständigen Thrombosierungsgefahr durch eine wirkungsvolle thrombozytenaggregationshemmende Komponente.
- Proliferationsfördernde Effekte auf die Gefäßendothelzellen, ohne nachteilige Wirkung auf das physiologische Wachstums- und Differenzierungsverhalten der SMC.
- Weitere direkte oder indirekte Einflüsse auf die die Restenose fördernde Entzündungsreaktion durch immunmodulatorische Eigenschaften.

CHS hat seinen prophylaktischen Effekt nach ischämischem Ereignis bei oraler Einnahme bereits in zahlreichen großen Studien unter Beweis gestellt. So zeigte die CAPRIE-Studie im Jahr 1996, dass CHS in der Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse ASS überlegen ist [8]. Die 2001 veröffentlichte CURE-Studie belegte den signifikanten Nutzen von CHS in Kombination mit ASS in der Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne ST-Streckenhebung [52]. PCI-CURE konnte schließlich beweisen, dass der sekundär prophylaktische Nutzen von CHS auch für Patienten galt, die im Rahmen der CURE-Studie eine Katheterintervention mit oder ohne Stent erhalten hatten [36].

Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse über CHS liegt es nahe, zu prüfen, ob diese Substanz hinsichtlich Ihrer Wirkmechanismen zur Stentbeschichtung geeignet wäre. Hier ist es sinnvoll, zunächst nach möglichen Wirkansätzen an bereits bekannten Schlüsselstellen der Restenose-Entstehung zu suchen.

1.1. Effekt von CHS auf die TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression

ICAM-1 spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung der Restenose nach koronarer Katheterintervention. Es vermittelt die Zell-Zell-Kontakte zur Anheftung von Leukozyten an das Gefäßendothel und deren Migration in die Gefäßwand. Es scheint daher sinnvoll, nach Substanzen zu suchen, die einen hemmenden Effekt auf die ICAM-1-Expression ausüben.

Wir konnten in der aktuellen Untersuchung anhand der verwendeten Methodik bei keiner Zellart einen Effekt von CHS in Konzentrationen von 0,00025 µg/ml – 25 µg/ml auf die TNF- α -stimulierte ICAM-1-Expression nachweisen. In der Literatur finden sich bis dato keine anderen Studien zum Effekt von CHS auf die ICAM-1-Expression, so dass diese Resultate zu überprüfen sind.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lässt sich jedoch postulieren, dass CHS seine entzündungshemmende Wirkung über andere, noch unbekannte Mechanismen vermittelt. Ob es sich dabei um Mechanismen handelt, die lokal in Form eines DES beeinflusst werden könnten, ist weiter zu untersuchen.

1.2. Effekt von CHS auf die Proliferation von HUVEC und HCAEC

Im Rahmen des Wundheilungsprozesses nach Katheterintervention mit oder ohne Stenteinlage kommt es physiologischerweise zur Reendothelialisierung des verursachten Endotheldefektes und damit zur Wiederherstellung der Integrität der Gefäßwand. Da die Integrität des Gefäßendothels einen wirksamen Schutz vor unerwünschten Gerinnungsprozessen und ungünstigen inflammatorischen Auswirkungen bietet, wäre es wünschenswert, dass eine zur Restenoseprophylaxe eingesetzte Substanz fördernde oder zumindest keine hemmenden Effekte auf die Proliferation humaner Gefäßendothelzellen zeigte. Die heute bereits verwendeten DES führen im Vergleich mit BMS zu einer verzögerten Heilung des Gefäßendothels, was unter anderem mit einem erhöhten Risiko für eine Late Stent Thrombose (LST) verbunden ist [25].

In der hier vorliegenden Untersuchung beobachteten wir den Effekt von CHS auf die Proliferation von HCAEC und HUVEC. Bereits bei niedrigsten CHS-Konzentrationen von 0,00025 µg/ml ließ sich ein inhibitorischer Effekt auf die HCAEC nachweisen. Dies entspricht einer SI/MPL-Ratio von 0,00096, was bedeutet, dass dieser proliferationshemmende Effekt bereits bei oraler Gabe eintritt. Bei den HUVEC war ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf das Proliferationsverhalten feststellbar. Bereits geringe Konzentrationen zeigten eine Senkung der Proliferation, eine signifikante Hemmung trat jedoch erst ab einer CHS-Konzentration von 2,5 µg/ml ein.

Daraus ergibt sich eine SI/MPL-Ratio von 0,96, was ebenfalls auf das Eintreten der Proliferationshemmung bereits nach oraler Gabe schließen lässt.

1.3. Effekt von CHS auf die Proliferation von HCAMSMC

Anders als der im vorherigen Abschnitt dargestellte Sachverhalt könnte eine antiproliferative Wirkung auf die SMC zur Vermeidung der Restenose-Entstehung von Vorteil sein. Die überschießende Proliferation und Entdifferenzierung der SMC zu Zellen, die in der Lage sind, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren, spielen eine entscheidende Rolle bei der Neointimaentwicklung und damit der Restenose-Entstehung.

In der hier vorliegenden Untersuchung beobachteten wir den Effekt von CHS auf die Proliferation von HCAMSMC. Eine signifikante Hemmung der Zellproliferation wurde erst bei einer Konzentration von 25 µg/ml erreicht. Dies entspricht einer SI/MPL-Ration von 9,62. Die SI/MPL-Ratio > 1 weist darauf hin, dass dieser gewünschte antiproliferative Effekt von CHS auf HCAMSMC nicht durch orale Gabe erreicht werden kann, da die maximal erreichbare Plasmakonzentration nach oraler Applikation nicht hoch genug ist. Ob mittels eines CHS-beschichteten Stents eine ausreichend hohe lokale Konzentration erreicht werden könnte, muss in weiteren Studien sorgfältig evaluiert werden.

Die Frage, ob der unerwünschte proliferationshemmende Effekt auf die Endothelzellen den Vorteil einer möglichen Inhibition der SMC-Proliferation aufheben würde, bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Fraglich ist außerdem, ob für derart hohe CHS-Konzentrationen eine ausreichende Gewebeverträglichkeit gegeben ist.

2. Bedeutung der Vitalität der Zellen im Versuch für diese Ergebnisse

Um ein Maß für mögliche toxische Auswirkungen von CHS auf die Zellen zu erhalten, untersuchten wir die Zellvitalität nach sechstägiger Inkubation der jeweiligen Zellart mit der entsprechenden Konzentration an CHS. Die HUVEC zeigten bei einer Konzentration von 25 µg/ml eine massiv eingeschränkte Zellvitalität nach sechs Tagen, bei den HCAMSMC trat

sogar bereits ab Konzentrationen von 0,00025 µg/ml eine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität auf. Lediglich auf die Vitalität der HCAEC ließ sich bei keiner CHS-Konzentration ein nachteiliger Effekt nachweisen.

Da als Maß für die Proliferation der Zellen die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches verglichen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass an der vermeintlichen Proliferationsinhibition durch CHS auch toxische Effekte beteiligt sind, die zu einem Absterben von Zellen und so zu niedrigeren Zellzahlmessungen führen.

3. **CHS – geeignet zur Stentbeschichtung?**

Die Vorteile eines Stents, der über einen bestimmten Zeitraum eine definierte Rate einer bestimmten Substanz abgibt, sind offensichtlich:

Theoretisch kann sehr gezielt die für eine bestimmte gewünschte Wirkung optimale Konzentration an die gewünschte Lokalisation appliziert werden. Es können lokale Konzentrationen erreicht werden, die bei systemischer Verabreichung nicht möglich wären oder vielleicht schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich brächten.

Bei der Auswahl der Substanz zur Beschichtung gilt es nicht nur auf die erzielbaren Wirkungen sondern auch auf die chemischen Eigenschaften und die sich daraus ergebende lokale Pharmakokinetik zu achten. Es sind sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften notwendig, um hohe lokale Konzentrationen einerseits und ein homogenes Diffusionsverhalten andererseits zu gewährleisten. CHS ist stark hydrophob und damit kaum wasserlöslich. Es ist zu prüfen, ob z.B. durch geeignete Verarbeitung dennoch ein akzeptables Abgabeverhalten des Stents erzielt werden könnte.

In der praktischen Anwendung ergeben sich hinsichtlich der Abgaberate verschiedene Störfaktoren: So stellen individuell und je nach Lokalisation des Stents unterschiedliche Strömungsverhältnisse, die heterogene Gefäßwandzusammensetzung und daraus resultierende Gefäßwandasymmetrien [23] sowie entsprechend variable Transportprozesse in/durch die Gefäßwand große Ansprüche an die zur Stentbeschichtung verwendete Substanz sowie an die Verarbeitung des Stents an sich. Ob CHS diesen Ansprüchen gerecht werden kann, ist anhand der aktuellen Datenlage noch nicht

abschätzbar. Klinisch-praktisch gesehen ist ein implantiertes Medikamentendepot theoretisch von Vorteil: Im Idealfall muss der Patient weniger Tabletten schlucken; der Therapieunsicherheitsfaktor Compliance fiel damit gerade in der wichtigen ersten Zeit direkt nach der Intervention für das betreffende Medikament weg. Allerdings sind die niedrigeren Restenoseraten nach Implantation eines drug-eluting Stents bis heute noch unausweichlich an die empfohlenen thrombozytenaggregationshemmenden Therapieregimes gebunden [2;50;64], die wiederum mit einer oralen Medikamenteneinnahme verbunden sind. Diese Tatsache rechtfertigt einmal mehr die Erprobung einer bereits zur Thrombozytenaggregation verwendeten Substanz wie CHS für die Zwecke der Stentbeschichtung.

Es hat sich gezeigt, dass die Wundheilungsprozesse und damit die Funktion des Gefäßendothels durch die Einlage eines Stents gestört werden [25]. Bei der Verwendung beschichteter Stents spielt neben der mechanisch bedingten Beeinträchtigung des Gewebes außerdem die Toxizität und die Zellspezifität der verwendeten Substanz eine große Rolle. Günstige antiinflammatorische Effekte sind nur dann von Nutzen, wenn die Nachteile durch geweбетoxische Wirkungen nicht überwiegen. In unserer Untersuchung führte CHS spätestens ab einer Konzentration von 25 µg/ml zu einer massiven Beeinträchtigung der Zellvitalität bei den HUVEC und HCAMSMC. Es ist deshalb davon auszugehen, dass unter hohen CHS-Konzentrationen durchaus toxische Effekte auftreten. Da eine verzögerte Endothelheilung auch mit einem erhöhten Risiko für eine LST behaftet zu sein scheint [25], müssen die möglichen Ausmaße der toxischen CHS-Effekte weiter evaluiert werden.

3.1. Notwendige Konzentration in der Beschichtung

Eine wichtige Frage bei der Entwicklung eines drug-eluting Stents ist die in der Beschichtung benötigte Konzentration. Es ist nicht auszuschließen, dass die nach Implantation von DES beobachtete höhere LST-Rate gegenüber BMS [4] konzentrationsabhängig ist. Deshalb und um unerwünschte negative Wirkungen durch in den Systemkreislauf gelangende Konzentrationen zu vermeiden, sollte die Konzentration in der Stentbeschichtung nicht höher als zwingend nötig gewählt werden. Aktuell stellen Voisard et al.

deshalb eine Messgröße vor, mit der grob abgeschätzt werden könnte, ob die Beschichtungskonzentration eines DES richtig gewählt ist: Die SI/DES-Ratio [59]. Mit dieser Ratio wird die Konzentration einer Substanz, die zu einem signifikanten Effekt führt ins Verhältnis zur Konzentration in der Stentbeschichtung gesetzt. Eine SI/DES-Ratio $\lll 1$ weist damit darauf hin, dass möglicherweise auch eine kleinere Konzentration in der Stentbeschichtung wirksam wäre und dabei eventuell weniger schädliche Nebeneffekte aufwiese.

Unabhängig davon haben hämodynamische Komponenten, bestimmte Gefäßeigenschaften wie die vaskuläre Gewebezusammensetzung und -geometrie [23], die pharmakokinetischen Eigenschaften der applizierten Substanz und ihres Trägerstoffs sowie das Stentmaterial einen Einfluss auf die Abgaberate des Stents und damit auf die Plasmakonzentration. Sie sollten deshalb bei der Erprobung und Auswahl der Beschichtungskonzentration Berücksichtigung finden.

Um die erforderliche Konzentration und die möglichen Verarbeitungsformen von CHS in einem CHS-beschichteten Stent zu ermitteln, sind umfassende weitere experimentelle, tierexperimentelle und klinische Studien unentbehrlich. Angesichts der hohen Kosten derartiger Forschungsunternehmen sollten zunächst weitere Wirkmechanismen von CHS untersucht werden, die der Nutzung mittels eines drug-eluting Stent zugeführt werden könnten.

4. Grenzen dieser Untersuchung

Die vorliegende Studie untersucht direkte Effekte von CHS auf die ICAM-1-Expression und die Proliferation humaner Gefäßwandzellen. Obwohl direkte Effekte der Substanz CHS beschrieben wurden, besteht die in großen Studien untersuchte Wirkung in einer durch einen Metaboliten vermittelten Thrombozytenaggregationshemmung. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation selbst führt zu einer erhöhten Freisetzung verschiedener Plättchenfaktoren, welche ihrerseits die SMC-Proliferation sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 beeinflussen können. Betrachtet man jedoch die von uns untersuchten Effekte im Hinblick auf eine mögliche Stentbeschichtung, so sind sicherlich vorrangig

die direkten Effekte der Grundsubstanz von Bedeutung, auch wenn Resteffekte der Metaboliten durch in den Systemkreislauf gelangende Substanz sicher nicht auszuschließen und vielleicht sogar wünschenswert sind.

Die Restenose-Entstehung in vivo resultiert nicht aus einer linear hintereinander geschalteten Abfolge jeweils auseinander resultierender Prozesse, sondern aus einem komplizierten kaskadenartigen Wechselspiel zellulärer und immunologischer Komponenten. In dem von uns verwendeten in-vitro-Modell werden nur sehr selektiv ausgewählte Komponenten dieses komplexen Systems berücksichtigt. So fehlen mit der Abwesenheit von Thrombozyten und Leukozyten z. B. zwei entscheidende Komponenten der in-vivo-Situation. Es ist daher nicht ausgeschlossen sondern sogar wahrscheinlich, dass in vivo Wechselwirkungen und immunologische Reaktionen auftreten, die im vorliegenden Protokoll nicht berücksichtigt werden konnten.

Als Maß für die lokale Toxizität von CHS wurde in unserem Modell der Anteil vitaler Zellen nach sechstägiger Inkubation mit CHS bestimmt. Der Versuchsansatz ließ dabei keine Rückschlüsse darüber zu, ob sich Konzentrationen, unter denen keine signifikante Senkung der Zellvitalität auftrat, nicht möglicherweise nachteilig auf die Zellfunktion auswirken.

Da der Wirkstoff CHS in Wasser nur sehr schlecht löslich ist, waren wir gezwungen, für unsere Versuche eine Methanollösung zu verwenden. In einigen wenigen Versuchsreihen ergaben sich für die mitgeführte Methanolprobe geringfügig, aber signifikant veränderte Werte gegenüber der Kontrolle. Es ist also nicht sicher auszuschließen, dass nicht auch Methanol gewisse Effekte auf die Zellproliferation, die Proteinexpression oder auch andere, hier nicht direkt gemessene, aber bedeutende Zellfunktionen zeigt.

5. Ausblick

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass CHS prinzipiell eine Proliferationshemmung der SMC als Ansatzpunkt für eine Restenoseprophylaxe bewirken kann; jedoch nur in Konzentrationen, die durch orale Applikation nicht erreichbar sind. Aufgrund dieses Ansatzes scheint es sinnvoll die Idee der Entwicklung eines CHS-beschichteten Stents intensiv weiter zu verfolgen. Andererseits zeigte CHS in den hierfür notwendigen Konzentrationen ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Gefäßendothelzellen, was der Wiederherstellung der Gefäßwandintegrität nach Intervention eher abträglich wäre. Außerdem konnten wir sowohl bei den HUVEC als auch bei den HCAMSMC spätestens bei 25 µg/ml eine deutliche Einschränkung der Zellvitalität nach sechstägiger Inkubation feststellen, was die Frage aufwirft, ob ein CHS-beschichteter Stent nicht schwerwiegende schädliche Effekte auf das umliegende, insbesondere das dem Stent direkt anliegende, Gewebe hätte. Unter Zusammenschau aller dieser Ergebnisse erscheint der Erfolg eines CHS-beschichteten Stent deshalb zunächst eher fraglich.

Wie oben bereits näher erläutert, ist es dennoch sehr wahrscheinlich, dass CHS weitere, zum größten Teil noch unbekannte Wirkungen aufweist, die in die Entzündungsreaktion im Rahmen der Restenose-Entstehung eingreifen. Für eine optimale Nutzung von CHS mittels eines beschichteten Stents wäre es von Vorteil, diese Wirkmechanismen genauer zu kennen. Vorstellbar wären zum Beispiel eine Beeinflussung bestimmter Zytokine oder das Eingreifen in die Aktivierung von Leukozyten. Des Weiteren konnte für CHS ein sofortiger thrombolytischer Effekt nachgewiesen werden, der auf die Fähigkeit der Thienopyridin-Derivate zurückgeführt wird, die Sekretion vasoaktiver Substanzen wie z.B. NO oder Plasminogenaktivator (t-PA), zu induzieren [12].

Auch verheißen neue Technologien bessere Nutzungsmöglichkeiten von Substanzen, die bisher beispielsweise aufgrund ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften einer Nutzung mittels DES nicht zugänglich waren. So verspricht zum Beispiel die Entwicklung von Mikroporen-Stents nicht nur effektiveren Schutz vor Hypersensibilitätsreaktionen auf Polymerbeschich-

tungen, sondern bietet auch neue Möglichkeiten hinsichtlich der Beeinflussung des Abgabeverhaltens. Wessely et al. entwickelten eine Vorrichtung zur Stentbeschichtung direkt im Katheterlabor, die es erlauben soll, die Beschichtungsdosis individuell anzupassen und den Stent gegebenenfalls mit verschiedenen Substanzen zu beschichten [62]. So wäre es vorstellbar, zwei Substanzen zu kombinieren, die entgegengesetzte Wirkungen auf die Endothelzell- und SMC-Proliferation zeigen. Es gibt Hinweise darauf, dass die prolongierte Reendothelialisierung im Paclitaxel-beschichteten Stent durch die zusätzliche Applikation von Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) über die hierdurch bewirkte Stammzellmobilisation aufgehoben werden könnte. Umgekehrt zeigte sich nach der Applikation von G-CSF in Kombination mit der Implantation eines BMS eine deutlich überschießende Intimaformation [8].

Obwohl schon viele in der präklinischen Erprobung vielversprechende, zur Stentbeschichtung vorgeschlagene Substanzen in den klinischen Studien schließlich scheiterten, sollte nicht aufgehört werden, nach neuen Substanzen zu suchen, die zur Stentbeschichtung genutzt werden könnten. Aktuell sind beispielsweise Substanzen wie das Statin Cerivastatin [24] und das Integrin-bindende cyclische Arg-Glyc-Asp Peptid [6] auf dem Prüfstand zur Verwendung in einer Stentbeschichtung.

Mit zunehmender Erfahrung mit DES weitet sich auch ihr Einsatzbereich aus. In Studien mit kleinen Patientenzahlen wurde der Einsatz von DES zur Therapie konventionell atherapierteter extra- und intrakranieller Stenosen der hirnzuführenden Gefäße bereits als erfolgreich bewertet [1;7]. Die Verwendung bei Nierenarterienstenosen ist theoretisch ebenso denkbar wie der Gebrauch im Bereich der Iliakal- und Femoralgefäße [34].

Ein großer Nachteil sind die im Moment noch immens hohen Kosten für den Einsatz von DES. Sie betragen für die heute auf dem Markt erhältlichen DES etwa das zweieinhalb- bis dreifache der handelsüblichen BMS. Auch scheint die Kosteneffektivität der Restenoseprophylaxe mittels DES in der

klinischen Praxis wesentlich ungünstiger zu sein als in klinischen Studien mit ausgewähltem Setting [26].

Kritische Stimmen sehen die Überlegenheit von DES nicht ausreichend evaluiert [55] und gehen sogar soweit zu verlangen, DES solange nicht einzusetzen, bis die Kosten für ihre Verwendung effektiv gesenkt werden konnten [59].

Die vielleicht wichtigste und dringlichste Aufgabe für die nahe Zukunft scheint daher die Festlegung sinnvoller Kriterien zur Patientenselektion für den Einsatz von DES. Die European Society of Cardiology (ESC) richtet sich mit ihren Empfehlungen für die Indikationsstellung zum Einsatz beschichteter Stents nach den verhältnismäßig weit gefassten Einschlusskriterien der großen prospektiven Studien für Sirolimus- und Paclitaxel-beschichtete Stents SIRIUS, TAXUS-IV und TAXUS VI [47]. Um die Kosteneffektivität der DES zu steigern, ist jedoch eine strenge Auswahl der Patienten notwendig, die mit der größten Wahrscheinlichkeit deutlich von einem DES profitieren. Da das Ziel einer jeden Koronarintervention nicht die Verbesserung angiologischer Parameter, sondern die Verbesserung des klinischen Zustandes des Patienten sein muss, sollte die Wirksamkeit aller aktuell und zukünftig verfügbaren DES – möglicherweise einschließlich eines CHS-beschichteten Stents – letztendlich in Studien mit definierten klinischen Endpunkten gemessen werden [46].

E. Zusammenfassung

Eines der größten Probleme nach der Implantation koronarer Stents stellt die In-Stent-Restenose (ISR) dar. Durch Einsatz von drug-eluting Stents (DES) konnte die Restenose-Rate in den letzten Jahren zwar bereits signifikant gesenkt werden, von einer zufriedenstellenden Situation kann jedoch noch nicht die Rede sein. Aufgrund der heute vorliegenden Hinweise auf eine antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkungsweise der für DES genutzten Wirkstoffe, konzentriert sich die aktuelle Forschung zur Prävention der ISR auf weitere mögliche Ansatzpunkte im Bereich der Entzündungskaskade.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Substanz Clopidogrel Hydrogen Sulfate (CHS) die nach Stentimplantation ablaufenden und zur Restenose führenden Prozesse im Sinne einer Restenoseprophylaxe günstig beeinflussen könnte. Im Einzelnen wurde der Einfluss auf die Proliferation verschiedener Gefäßwandzellen und auf die Expression des Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) untersucht. Anhand der Significant Inhibition/Maximal Plasma Level-Ratio (SI/MPL-Ratio), einer Messgröße für den Vergleich von Labordaten mit der in vivo erreichbaren Situation, sollte beurteilt werden, ob die Entwicklung eines CHS-beschichteten Stents sinnvoll sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)-stimulierte ICAM-1-Expression in unserer Untersuchung bei keiner Zellart und durch keine der verwendeten CHS-Konzentrationen zu beeinflussen war. Wir fanden eine im Bezug auf die Nutzung von CHS mittels DES unerwünschte Proliferationshemmung bei den Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) und den Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) schon unter Konzentrationen, die bei oraler Verabreichung erreichbar sind. Der bei den Human Coronary Artery Media Smooth Muscle Cells (HCAMSMC) gewünschte anti-proliferative Effekt hingegen trat erst unter Konzentrationen auf, die durch orale Verabreichung nicht erreicht werden können.

Als möglicher Ansatzpunkt für eine lokale Anwendung von CHS in Form eines beschichteten Stents ergibt sich damit der antiproliferative Effekt auf HCAMSMC in Konzentrationen, die nicht durch orale Gabe erreichbar sind. Allerdings hat unsere Untersuchung auch gezeigt, dass unter diesen Konzentrationen ebenfalls mit einer Proliferationsinhibition der HUVEC und HCAEC gerechnet werden muss,

was einer Wiederherstellung der Gefäßwandintegrität nach Intervention eher abträglich wäre. Des Weiteren mussten wir in Zellvitalitätsuntersuchungen eine deutliche Einschränkung der Zellvitalität der HUVEC und HCAMSMC bei spätestens 25 µg/ml feststellen, so dass die Gewebeverträglichkeit von CHS in diesen Konzentrationen in Frage gestellt werden muss.

Die in dieser Arbeit untersuchte Hemmung der ICAM-1-Expression dürfte nach den oben erläuterten Ergebnissen keinen geeigneten Ansatz für die Restenoseprophylaxe mittels CHS darstellen. Ob die Proliferationshemmung koronarer Gefäßwandzellen einen geeigneten Angriffspunkt für eine Nutzung von CHS mittels DES bietet, erscheint ebenfalls fraglich. Dennoch sollte die Idee eines CHS-beschichteten Stents weiter verfolgt werden. Da indirekt bereits anti-inflammatorische Effekte für CHS nachgewiesen wurden, muss ein besonderes Interesse der Erforschung anderer möglicher Ansatzpunkte innerhalb der die Restenose begünstigenden Entzündungskaskade gelten.

F. Literaturverzeichnis

1. Abou-Chebl A, Bashir Q, Yadav JS: Drug-eluting stents for the treatment of intracranial atherosclerosis: initial experience and midterm angiological follow-up. *Stroke* 36:165-168 (2005)
2. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C: Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. *Diabetes* 55: 780-784 (2006)
3. Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ: A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug eluting stents. *Lancet* 364: 583-591 (2004)
4. Bavry AA, Kumbhani DJ, Helton TJ, Borek PP, Mood GR, Bhatt DL: Late thrombosis of drug-eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Med* 119: 1056-1061 (2006)
5. Bennett MR: In-stent stenosis: pathology and implications for the development of drug eluting stents. *Heart* 89: 218-224 (2003)
6. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, Seitz B, Kapurniotu A, Kwok C, Dewor M, Bosserhoff AK, Bernhagen J, Hanrath P, Hoffmann R, Weber C: A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *Am J Coll Cardiol* 47:1786-1795 (2006)
7. Boulos AS, Agner C, Deshaies EM : Preliminary evidence supporting the safety of drug-eluting stents in neurovascular disease. *Neurol Res* 27:95-102 (2005)
8. CAPRIE Steering Committee: A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348:1329-1339 (1996)
9. Cho HJ, Kim TY, Park KW, Zhang SY, Kim JH, Kim SH, Hahn JY, Kang HJ, Park YB, Kim HS: The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulation factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus Paclitaxel-eluting Stents. *J Am Coll Cardiol* 48: 366-374 (2006)

10. Coukell AJ, Markham A: Clopidogrel. *Drugs* 54: 745-750 (1997)
11. Dibra A, Mehilli J, Braun S, Hadamitzky M, Baum H, Dirschinger J, Schuhlen H, Schomig A, Kastrati A: Inflammatory response after intervention assessed by serial C-reactive protein measurements correlates with restenosis in patients treated with coronary stenting. *Am Heart J* 150: 344-350 (2005)
12. Dupin J P, Gryglewski RJ, Gravier D, Hou G, Casadebaig F, Swies J, Chlopicki S: Synthesis and thrombolytic activity of new thienopyrimidine derivatives. *J Physiol Pharmacol* 53: 625-634 (2002)
13. Eisenberg MJ, Konnyu KJ: Review of randomized clinical trials of drug-eluting Stents for the prevention of in-stent-restenosis. *Am J Cardiol* 98: 375-82 (2006)
14. Escolar G, Heras M: Clopidogrel: a selective inhibitor of platelet ADP receptors. *Drugs today* 36:187-199 (2000)
15. Evangelista V, Manarini S, Dell'Elba G, Martelli N, Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet PS: Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* 94: 568-577 (2005)
16. Fajadet J, Morice MC, Bode C, Barragan P, Serruys PW, Wijns W, Constantini CR, Guermonprez JL, Eltchaninoff H, Blanchard D, Bartorelli A, Laarman GJ, Perin M, Sousa JE, Schuler G, Molnar F, Guagliumi G, Colombo A, Ban Hayashi E, Wulfert E: Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting stents: Three-year result of the RAVEL trial. *Circulation* 111: 1040-1044 (2005)
17. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 17: 758-769 (1991)
18. Gaspardone A, Versaci F, Tomai F, Citone C, Progetti I, Geoffre G, Skossyeva O: C-reactive protein, clinical outcome and restenosis rates after implantation of different drug-eluting stents. *Am J Cardiol* 97: 1311-1316 (2006)
19. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schömig A: Platelet activation and coronary stent implantation: effect of antithrombotic therapy. *Circulation* 94: 279-237 (1996)

20. Gibson CM, Karpaliotis D, Kosmidou I, Murphy SA, Kirtane AJ, Budiu D, Ray KK, Herrmann HC, Lakkis N, Kovach R, French W, Blankenship J, Lui HH, Palabrica T, Jennings LK, Cohen DJ, Morrow DA, TIMI Study Group: Comparison of effects of bare metal versus drug-eluting stent implantation on biomarker levels following percutaneous coronary intervention for non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 96: 1473-1477 (2006)
21. Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E, Karsten M, Sydow K, Ortak M, Tschentscher P, Meinertz T, Boger R, Baldus S: Clopidogrel Improves Systemic Endothelial Nitric Oxide Bioavailability in Patients With Coronary Artery Disease. Evidence for Antioxidant and Antiinflammatory Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1648-52 (2006)
22. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Pompa JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB: Patterns and mechanisms of in-stent restenosis: A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94:1247-1254 (1996)
23. Hwang CW, Edelmann ER: Arterial ultrastructure influences transport of locally delivered drugs. *Circ Res* 90: 826-832 (2002)
24. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schomig A, Wessely R: Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res* 68: 483-492 (2005)
25. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R: Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 48:193-202 (2006)
26. Kaiser C, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Bonetti PO, Osswald S, Linka A, Bernheim A, Zutter A, Zellweger M, Grize L, Pfisterer ME, BASKET Investigators: Incremental cost-effectiveness of drug-eluting stents compared with a third-generation bare-metal stent in a real-world setting: randomised Basel Stent Kosten Effektivitäts Trial (BASKET). *Lancet* 366: 921-929 (2005)
27. Kastrati A, Mehilli J, von Beckerath N, Dibra A, Hausleiter J, Pache J, Schühlen H, Schmitt C, Dirschinger J, Schomig A, ISAR-DESIRE Study Investigators: Sirolimus-eluting stent or paclitaxel-eluting stent vs balloon

- angioplasty for prevention of recurrences in patients with coronary in-stent restenosis: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 293: 165-171 (2005)
28. Kereiakes DJ: Adjunctive Pharmacotherapy before Percutaneous Coronary Intervention in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: The Role of Modulating Inflammation. *Circulation* 108: 22-27 (2003)
 29. Kim YH, Park SW, Lee CW, Hong MK, Gwon HC, Jang Y, Lee MM, Koo BK, Oh DJ, Seung KB, Tahk SJ, Park SJ: Comparison of sirolimus-eluting stent, paclitaxel-eluting stent and bare metal stent in the treatment of long coronary lesions. *Catheter Cardiovasc Interv* 67: 181-187 (2006)
 30. Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M, Mintz G, Pompa JJ, Leon MB: Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. *Circulation* 96: 475-483 (1997)
 31. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE: Neointimal tissue response of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses. *Circulation* 98: 224-233 (1998)
 32. Lev EI, Tayyan N, Raizner AE, Solomon SL, Simmons D, Kleinman NS: Initial impact of drug-eluting stent use on the spectrum of patients undergoing percutaneous intervention. *Coron Artery Dis* 17: 379-384 (2006)
 33. Libby P, Simon DI: Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 103: 1718-20 (2001)
 34. Machan L: Clinical experience and applications of drug-eluting stents in the noncoronary vasculature, bile duct and esophagus. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 447-462 (2006)
 35. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR: Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76: 412-417 (1995)
 36. Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, Mintz GS, Lansky AJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Stone GW, Leon MB: Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation* 100:1872-1878 (1999)
 37. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA;

- Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE)
Investigators: Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 358: 527-33 (2001)
38. Mitra AK, Agrawal DK: In stent restenosis: bane of the stent era. *J of Clin Pathol* 59: 232-239 (2006)
 39. Pereillo JM, Maftough M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C: Structure and stereochemistry of the active metabolite of Clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 30: 1288-1295 (2002)
 40. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN: Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 144: 962-974 (1994)
 41. Roiron C, Sanchez P, Bouzamondo A, Lechat P, Montalescot G: Drug eluting stents: an updated meta-analysis of randomised clinical trials. *Heart* 92: 641-649 (2006)
 42. Schampaert E, Moses JW, Schofer J, Schluter M, Gershlick AH, Cohen EA, Palisaitis DA, Breithardt G, Donohoe DJ, Wang H, Pompa JJ, Kuntz RE, Leon MB, SIRIUS, E- and C-SIRIUS Investigators: Sirolimus-eluting stents at two years: a pooled analysis of SIRIUS, E-SIRIUS, and C-SIRIUS with emphasis on late revascularizations and stent thrombosis. *Am J Cardiol* 98: 36-41 (2006)
 43. Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F Da Luz PL: Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. *J Am Coll Cardiol* 29: 1276-1283 (1997)
 44. Shimizu N, Suzuki H, Wakabayashi K, Iso Y, Shibata M, Yorozyua M, Katagiri T, Takeyama Y: Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the pig coronary artery injury model: comparison of plain old balloon angioplasty and stent implantation. *J Cardiol* 43: 131-139 (2004)
 45. Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-

- alpha, interleukin-1 beta, interferon gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol* 51: 209-220 (1994)
46. Silber S: Which parameter should be chosen as primary endpoint for randomized drug-eluting stent studies? *J Interv Cardiol* 17: 375-385 (2004)
47. Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, Jørgensen E, Marco J, Nordrehaug JE, Ruzyllo W, Urban P, Stone GW, Wijns W; Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology: Guidelines for Percutaneous Coronary Interventions. *Eur Heart J* 26: 804-847 (2005)
48. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, Froehlich JP, Crow MT, Lakatta EG, Rowinsky EK: Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest* 95: 1869-1876 (1995)
49. Sousa JE, Costa MA, Farb A, Abizaid A, Sousa A, Seixas AC, da Silva LM, Feres F, Pinto I, Mattos LA, Virmani R: Vascular healing 4 years after the implantation of sirolimus-eluting stent in humans: a histopathological examination. *Circulation* 110: 5-6 (2004)
50. Stone GW, Aronow HD: Long-term care after percutaneous coronary intervention: focus on the role of antiplatelet therapy. *Mayo Clin Proc* 81: 641-652 (2006)
51. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy, Tift Mann J, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Pompa JJ, Russell ME, TAXUS-IV Investigators: One-Year Clinical Results With the Slow-Release, Polymer-Based Paclitaxel-Eluting TAXUS Stent: The TAXUS-IV Trial. *Circulation* 109: 1942-1947 (2004)
52. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey L, Llanos G, Wilensky R, Klugherz B, Papandreou G, Narayan P, Leon M, Yeung A, Tio F, Tsao P, Falotico R, Carter A: Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 104: 1188-1193 (2001)
53. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators: Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345: 494-502 (2001)

54. Topol EJ, Serruys PW: Frontiers in interventional cardiology. *Circulation* 98: 1802-1820 (1998)
55. Tung R, Kaul S, Diamond SA, Shah PK: Narrative review: drug-eluting stents for the management of restenosis: a critical appraisal of the evidence. *Ann Intern Med* 144: 913-919 (2006)
56. van de Stolpe A, van der Saag PT: Intracellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74: 13-33 (1996)
57. Voisard R, Baur R, Herter T, Hombach V: Two decades of failing systemic restenosis trials: Impact of the SI/MPL-ratio to characterize the clinical relevance of positive in vitro data. *Perfusion* 17: 186-197 (2004)
58. Voisard R, Osswald M, Baur R, Jakob U, Susa M, Mattfeld T, Hemmer W, Hannekum A, Koenig W, Hombach V: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in human coronary endothelial and smooth muscle cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *Coron Artery Dis* 9: 737-745 (1998)
59. Voisard R, Zellmann S, Müller F, Fahlisch F, von Müller L, Baur R, Braun J, Gschwend J, Kountides M, Hombach V: Sirolimus hemmt Kernprozesse des Restenosierungsprozesses in verschiedenen humanen invitro/ex vivo Modellen: Einordnung der Ergebnisse mit der SI/MPL-Ratio, Vorstellung der SI/DES-Ratio. In: Heinte H, Schulte H, von Eckardstein A (Hrsg) *Arteriosklerose: Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets*. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2006. Die Deutsche Bibliothek. S. 67-70 (2007)
60. Ward MR: Cost-benefit of drug-eluting stents – time for a reality check. *Heart Lung Circ* 14: 74-77 (2005)
61. Welt FG, Rogers C: Inflammation and restenosis in the stent area. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1769-1776 (2002)
62. Wessely R, Hausleiter J, Michaelis C, Jaschke B, Vogeser M, Milz S, Behnisch B, Schratzenstaller T, Renke-Gluszko M, Stöver M, Wintermantel E, Kastrati A, Schömig A: Inhibition of Neointima Formation by a Novel Drug-eluting Stent System That Allows for Dose-Adjustable, Multiple and On-Site Coating. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 748-753 (2005)
63. Williams DO, Holubkov R, YEH W, Bourassa MG, Al-Bassam M, Block PC, Coady P, Cohen H, Cowley M, Dorros G, Faxon D, Holmes DR, Jacobs A,

-
- Kelsey SF, King SB 3rd, Myler R, Slater J, Stanek V, Vlachos HA, Detre KM: Percutaneous coronary intervention in the current era compared with 1985-1986: the National Heart, Lung, and Blood Institute Registries. *Circulation* 102: 2945-2951 (2000)
64. Zimarino M, Renda G, De Caterina R: Optimal duration of antiplatelet therapy in recipients of coronary drug-eluting stents. *Drugs* 65: 725-732 (2005)

Anhang

Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.

Marcus Tullius Cicero (106-43)

In diesem Sinne gilt mein herzlicher Dank...

... Herrn Prof. Dr. Vinzenz Hombach für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

... meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Rainer Voisard für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und seine stets gute Laune.

... Frau Regine Baur für ihren Humor, ihre große Hilfe, ihre Geduld, ihren Elan und ihren Ansporn während der Arbeit im Labor.

... allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und Mitarbeitern des Labors für die stets freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre.

... Herrn Dr. Lutz von Müller, Institut für Virologie (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Mertens), für die freundliche Bereitstellung des Durchflusszytometers und seine Unterstützung bei der Bedienung und Ergebnisauswertung.

... Frau Dr. Anita Buck, Abteilung Innere Medizin I (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Adler), für die freundliche Bereitstellung des Luminometers und ihre Hilfe bei der Bedienung und Ergebnisauswertung.

... meinen Eltern und meiner gesamten Familie sowie allen Freunden für die Begleitung dieser Arbeit und meines gesamten Studiums, verbunden mit vielen unvergesslichen Momenten.

... A. für seine Geduld und Hilfe, seine Kritik und seinen Ansporn, sein Da-Sein.

Lebenslauf



Barbara Felbecker

Zur Person

Barbara Felbecker, geb. Eisler
geboren am 04.04.1980 in Karlsruhe,
wohnhaft in Ulm/Baden-Württemberg

Ausbildung

Abitur 1999, St. Hildegard Gymnasium, Ulm

Eintritt in die Deutsche Bundeswehr als
Sanitätsoffizieranwärter 01/2000

Studium der Medizin ab 10/2000,
Universität Ulm

Ärztliche Vorprüfung 2002

Erster Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung 2003

Famulaturen:

Innere Medizin, Städt. Klinikum Karlsruhe

Orthopädie, Praxis Klaus Prinzing, Ulm

Radiologie, BWK Ulm

Neurologie/Psychiatrie, BWK Hamm

Anästhesie & Intensivmedizin, BWK Leipzig

Zweiter Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung 2005

Praktisches Jahr:

Innere Medizin, University of Edinburgh, UK

Innere Medizin, University of Tasmania, AU

Chirurgie, Universität Zürich, CH

Neurologie, Universität Ulm, D

Dritter Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung 2006

Beruflicher Werdegang

Assistenzärztin Bundeswehrkrankenhaus Ulm,
Abteilung Neurologie ab 11/2006