

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Der Effekt von Ganciclovir auf die Proliferation und Expression
von ICAM-1 in humanen koronaren Gefäßwandzellen**

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

vorgelegt von
Ulrike Martina Münder
aus Waiblingen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Essig

Tag der Promotion: 14.02.2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abkürzungen von Maßeinheiten	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen der Restenoseentstehung.....	1
1.2. Humanes Zytomegalievirus, Ganciclovir und die Restenosierung	3
1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	5
2. Material und Methoden	7
2.1. Material.....	7
2.1.1. Zellkultur	7
2.1.2. Durchflusszytometrie	9
2.1.3. Proliferationsmessungen.....	11
2.1.4. Zellvitalitätstest	12
2.1.5. Statistik	12
2.2. Methoden.....	13
2.2.1. Routinekultivierung.....	13
2.2.2. Durchflusszytometrie	14
2.2.3. Proliferationsmessungen.....	16
2.2.4. Vitalitätstest.....	19
2.2.5. Statistische Analyse.....	20
3. Ergebnisse	23
3.1. Effekte von Ganciclovir auf die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression.....	23
3.1.1. HUVEC	23
3.1.2. HCAEC.....	27
3.1.3. HCMSMC.....	31
3.1.4. Vergleich der TNF- α induzierten ICAM-1-Expression der HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Inkubation mit Ganciclovir	35
3.2. Effekte von Ganciclovir auf die Proliferation	37
3.2.1. HUVEC	38
3.2.2. HCAEC.....	39
3.2.3. HCMSMC.....	40

3.2.4. Proliferation der HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Ganciclovirinkubation im Vergleich	41
3.3. Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Ganciclovir.....	42
3.3.1 HUVEC	42
3.3.2. HCAEC.....	43
3.3.3. HCMSMC.....	44
3.3.4. Vitalität der HUVEC, HCAEC und HCMSMC im Vergleich	45
4. Diskussion.....	47
4.1. Testsubstanz Ganciclovir.....	47
4.2. Effekt von Ganciclovir auf die ICAM-1-Expression	48
4.3. Effekt von Ganciclovir auf die Proliferation	51
4.4. Effekt von Ganciclovir auf die Vitalität	53
4.5. Die Bedeutung von Ganciclovir für die Prophylaxe von Restenosierungen	54
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturangabe	59
7. Danksagung.....	69
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

AM-D	Actinomycin-D
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMS	bare metal stent
BW B759U	Ganciclovir
c-Rel	Untereinheit von NF- κ B mit Transkriptionsaktivität
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHPG	Dihydroxy-2-propoxymethyl-Guanin = Ganciclovir
EBM	Endothel cell Basal Medium
EGM	Endothel cell Growth Medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
fcs	fetal calf serum
h	Stunde
G	Ganciclovir
HCAEC	human coronary artery endothelial cells
HCMSMC	human coronary media smooth muscle cells
H ₀	Nullhypothese
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HCPSMC	human coronary plaque smooth muscle cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IE	immediate early
IgG	Immunglobulin G
IgG-1	Immunglobulin G1
I κ B	inhibitor of κ B
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IKK α	I κ B-Kinase-Komplex α
IKK β	I κ B-Kinase-Komplex β
IKK γ	I κ B-Kinase-Komplex γ = NEMO
IL-1	Interleukin-1

K	Kontrolle
LDL	low density Lipoprotein
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
MAC-1	macrophage receptor 1
MIEP	major immediate early promotor
MPL	maximal plasma level
NEMO	NF- κ B essential modulator = IKK γ
NF- κ B	nuclear factor κ B
NF- κ B 1 p50	Untereinheit von NF- κ B
NF- κ B 2 p52	Untereinheit von NF- κ B
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS ⁻	Phosphate Buffered Saline Dulbecco's without Calcium and Magnesium, Pufferlösung
PDGF	platelet-derived growth factor
PES	paclitaxel eluting stent
PCI	percutaneous coronary intervention
PP	Biphosphat
pUL 97	virale Proteinkinase des humanen Zytomegalievirus
RelA p65	Untereinheit von NF- κ B mit Transkriptionsaktivität
RelB	Untereinheit von NF- κ B mit Transkriptionsaktivität
RLU	Relative light units
ROS	reactive oxygen species
sd _{n-1}	Standardabweichung
SES	sirolimus eluting stent
SI	significant inhibition
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1
SmBM	Smooth muscle cell Basal Medium
SmGM	Smooth muscle cell Growth Medium
TGF- β	transforming growth factor-beta
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TNS	Trypsin-Neutralizing-Solution
X _m	Mittelwert

Abkürzungen von Maßeinheiten

M	molar
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter

1. Einleitung

Fast 30 Jahre sind seit der ersten klinischen Anwendung der von Andreas Grüntzig im Jahr 1977 eingeführten perkutanen transluminalen Koronar-Angioplastie (PTCA) bereits vergangen. Obwohl sich die perkutane Koronarintervention (PCI) in diesem Zeitraum als Behandlungsmethode der koronaren Herzkrankheit durchsetzen konnte (Virami et al. 2003), stellt die Entstehung von Restenosen bis heute ein bedeutendes Problem der PCI dar, welches bei etwa 30 % - 50 % aller Patienten auftritt (Ozaki et al. 2007, Smith et al. 2001).

Die Restenoserate konnte durch Implantation von Stents, verglichen mit der initial ausschließlich durchgeführten Ballondilatation, deutlich reduziert werden (Fischman et al. 1994). Die Einführung medikamentenbeschichteter Stents (DES) erwies sich als attraktive Alternative zu den seit 1994 eingesetzten unbeschichteten Stents (BMS), da sie zu einem Rückgang der Reinterventionsrate führte (Lighthart et al. 2007). Zur Vermeidung von Restenosierungen wurden in den letzten Jahren zunehmend mit Sirolimus (SES) oder Pacilitaxel (PES) beschichtete Stents eingesetzt (Tanimoto et al. 2007). Trotz erhöhter Therapiekosten (Lighthart et al. 2007, Takahashi et al. 2007) ließ sich in follow up-Studien bisher allerdings keine signifikante Senkung der Mortalitätsrate bei Verwendung von DES finden (Nordmann et al. 2006).

Die Entwicklung einer systemischen Therapie sowie die Weiterentwicklung medikamentenbeschichteter Stents zur Prophylaxe postinterventioneller Restenosierungen sind deshalb weiterhin von großem Interesse und Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

1.1. Grundlagen der Restenoseentstehung

Als Restenosierung wird eine meist angiographisch gemessene Lumeneinengung von 50 % oder mehr, die innerhalb von sechs Monaten nach Durchführung einer perkutanen Koronarintervention entsteht, bezeichnet (Voisard 2002). Aktuell versteht man Restenosierungen als Folge von Entzündungsreaktionen einer mechanisch verletzten arteriellen Gefäßwand, die im Wesentlichen aus einer Neointimabildung mit anschließendem negativem Gefäß-Remodeling resultieren.

Dabei kommt es nach einer Schädigung des Gefäßendothels zur Thrombozytenaggregation, der Einwanderung von Leukozyten und der auto- und parakrinen Freisetzung verschiedener Entzündungs- und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-I, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), platelet-derived growth factor (PDGF), basischem Fibroblasten - Wachstumsfaktor (bFGF) und transforming growth factor- β (TGF- β) mit konsekutiver - teilweise fehlge-

steuerter - Proliferation und Modulation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie der Bildung extrazellulärer Matrix (Costa et al. 2005, Hombach et al. 1995). Damit eine effektive Gewebeeinfiltration der verletzten Gefäßwand durch im Blut zirkulierende Leukozyten möglich wird, bedarf es unter anderem der Stimulation und Expression des zur Superfamilie der Immunglobulin-artigen Proteine gehörenden interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1). Dieses Glykoprotein wird beispielsweise auf den Zelloberflächen von glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert und dient als Rezeptor für die Leukozytenoberflächenproteine macrophage receptor-1 (MAC-1) und lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). Daneben ergibt sich durch das Fibrinogenbindungsvermögen von ICAM-1 und MAC-1 eine weitere Vernetzungsmöglichkeit von Leukozyten und Endothelzellen (Plow et al. 1997, Voisard 2002). ICAM-1 wird beim Menschen von glatten Muskelzellen in der Media der fetalen Aorta exprimiert (Printseva et al. 1992), fehlt jedoch in der Gefäßwand gesunder Erwachsener und erscheint wieder auf Zellen in artherosklerotischen Läsionen (Poston et al. 1992).

Zouridakis et al. (2004) belegten anhand einer klinischen Studie, dass eine erhöhte Konzentration von freiem ICAM-1 im Serum (sICAM-1) mit einem gesteigerten Risiko für eine rasche Progression artherosklerotischer Veränderungen einhergeht. Dass ICAM-1 eine wesentliche pathogenetische Bedeutung im Rahmen der frühen Restenoseentwicklung zukommt, konnte darüber hinaus beispielsweise von Yasukawa et al. (1997) tierexperimentell nachgewiesen werden. Nach Angioplastie-induzierten Läsionen in den Carotiden von Ratten wurden erhöhte ICAM-1-Expressionsraten gemessen. Durch die anschließende 6-tägige Gabe monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1 ließ sich jedoch eine Verminderung der resultierenden Intimahyperplasie erreichen.

Eine dosisabhängige Stimulierbarkeit der ICAM-1-Expression durch TNF- α , welcher beispielsweise von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet wird (Monraats et al. 2005), demonstrierten Miller et al. (2005) tierexperimentell anhand arterieller Gefäße von Hasen sowie Voisard et al. (1998) in in vitro Experimenten mit humanen koronaren Endothelzellen (HCAEC), humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC), humanen koronaren glatten Muskelzellen (HCMSMC) und artherosklerotischem Plaque-Material (HCPSMC).

Die Regulation der ICAM-1-Stimulation erfolgt durch den Transkriptionsfaktor nuclear factor- κ B (NF- κ B) (Voisard 2002), der vorwiegend als Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten RelA (p65) und NF- κ B p50, vorliegt (Jarvis et al. 2006).

Die infolge der obigen Entzündungsprozesse entstandene Neointima erfährt im Laufe der Zeit einen Umbau, der mit einer Vermehrung extrazellulärer Matrix und einer Abnahme der Zelldichte einhergeht. Nach ein bis vier Monaten wird das Maximum der humanen Neointimaverdickung erreicht. Bei unvollständiger Restenosierung kommt es anschließend durch teilweisen Abbau der extrazellulären Matrix zu einer Reduktion der Intimahyperplasie. Auf- und abbauende Prozesse im Bereich der Matrix stehen im Gleichgewicht, wobei in den ersten Monaten nach Gefäßverletzung die aufbauenden - in den Folgemonaten die abbauenden Prozesse dominieren. Die Gesamtheit dieser Umbauprozesse wird als Remodeling bezeichnet.

Das zu einer Einengung des Gefäßquerschnitts führende so genannte „negative Remodeling“ ist bisher allerdings im Detail nicht vollständig verstanden (Plow et al. 1997, Voisard 2002). Aktuelle Theorien sehen eine Hauptursache in der Produktion von Kollagen durch Adventitia-Myofibroblasten mit anschließender Gewebekontraktion (Labinaz et al. 1999).

1.2. Humanes Zytomegalievirus, Ganciclovir und die Restenosierung

Der wiederholte DNA-Nachweis des humanen Zytomegalievirus (HCMV) in humanem arteriosklerotischem Gewebe sowie in restenosierendem Plauegewebe führte zur Diskussion über eine mögliche Schlüsselrolle der HCMV-Infektion für Restenosierungen und gab in den letzten Jahren Anlass zu intensiver Forschungsarbeit (Melnick et al. 1994, Speir et al. 1994).

Das HCMV gehört der Gruppe der Herpesviren an. Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung kann nicht exakt angegeben werden, da eine Infektion bei immunkompetenten Personen häufig asymptomatisch verläuft. Aktuelle Schätzungen zufolge liegt sie zwischen 50 % und über 90 %. Bei etwa einem Drittel der Patienten, die nach PCI Restenosierungen entwickelten, ließ sich in den Gefäßwandläsionen HCMV-DNA nachweisen (Zhou et al. 1996).

Erste Hinweise zur Beteiligung von Herpesviren an der Artheroskleroseentstehung wurden bereits 1978 von Fabricant in Experimenten an Hühnern gefunden, die nach Infektion mit dem Marek's disease virus trotz cholesterinreicher Diät arteriosklerotische Läsionen entwickelten (Fabricant et al. 1978).

Heute wird die HCMV-Infektion als ein ursächlicher Faktor in der multifaktoriellen Entwicklung von Artherosklerose, Restenosierung nach PCI sowie Transplantat-assoziiertes Artherosklerose des Spenderorgans betrachtet (Bruggeman 2000), da in vitro sowie tierexperimentell wiederholt (H)CMV-vermittelte verstärkte Expressionen von Entzündungsme-

diatoren, Wachstumsfaktoren sowie Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise ICAM-1 (Dengler et al. 2000, Knight et al. 2000) nachgewiesen werden konnten. So demonstrierten beispielsweise Reinhardt et al. (2005 a) eine Up-Regulation von PDGF- β in humanen koronar-arteriellen glatten Muskelzellen infolge einer Infektion mit verschiedenen HCMV-Stämmen, was zu einer verstärkten Migration und Proliferation dieser Zellen in artherosklerotischen Gefäßläsionen führt (Zhou et al. 1999).

Zusätzlich zu diesen direkt stimulierenden Effekten einer HCMV-Infektion könnten jedoch auch indirekt aktivierende Effekte auf das Immunsystem von Bedeutung für die Artheroskleroseentstehung sein (Stassen et al. 2006).

Obwohl in vitro Studien und tierexperimentelle Daten überwiegend einen Beitrag von (H)CMV-Infektionen zur Restenoseentstehung belegen (Bruggeman 2000, Guetta et al. 1997, Rahbar und Söderberg-Nauclér 2005, Speir et al. 1994) und eine vorangegangene HCMV-Infektion das Risiko für Restenosierungen nach PCI substantiell zu erhöhen scheint (Blum et al. 1998, Epstein et al. 1996, Zhou et al. 1996), wird diese Hypothese nach wie vor kontrovers diskutiert (Jarvis et al. 2006, Neumann et al. 2001).

Infolge einer wahrscheinlichen Schlüsselrolle von HCMV für die Restenoseentstehung und aufgrund der hohen Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit diesem Virus, kommt der Frage nach einer systemischen bzw. lokalen antiviralen medikamentösen Prophylaxe/Therapie eine besondere Bedeutung zu.

Gegenwärtig bilden Foscarnet und systemisch appliziertes 9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxy-methyl)-Guanin (DHPG), besser bekannt als Ganciclovir (G), ein zyklisches Analogon des endogenen Purin-Nukleosids Guanosin, die Basis der antiviralen Therapie und Prophylaxe lebens- und/oder augenlichtbedrohender HCMV-Infektionen.

Lemstrom et al. (1994) wiesen über die antivirale Wirkung von Ganciclovir auf das HCMV-Virus und der daraus resultierenden Elimination eines möglichen, Artherosklerose verursachenden Risikofaktors hinaus, auch direkt antiproliferative Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen nach. Darüber hinaus konnte in einer von Valentine et al. (1999) an herztransplantierten Patienten durchgeführten Doppelblindstudie, im Rahmen der post hoc Analyse, eine Verbindung zwischen prophylaktischer Ganciclovirgabe und verringerter Inzidenz von Koronarsklerose nach Herztransplantation nachgewiesen werden. Aufgrund der wahrscheinlich artherogenen Wirkung von HCMV und der durch Ganciclovir induzierten Hemmung der Virusreplikation war dieser Befund initial auch nicht überraschend. Eine multivariate Datenanalyse zeigte jedoch, dass weder eine bestehende HCMV-Infektion der

Patienten noch ihr Serostatus als unabhängige Vorhersageparameter für eine Koronarsklerose nach Herztransplantation geeignet waren. Demgegenüber erwiesen sich das Alter des Organspenders sowie eine fehlende Ganciclovir-Prophylaxe als starke Prädiktoren. Die fehlende Korrelation zwischen HCMV-Infektion und Koronararteriosklerose nach Herztransplantation in dieser Studie deutet entsprechend darauf hin, dass Ganciclovir die Koronararteriosklerose bei herztransplantierten Patienten durch weitere Mechanismen zu verhindern scheint, als durch eine singuläre antivirale Wirkung.

Da die zur Transplantat-Artherosklerose führenden Mechanismen mit den zur Restenosierung beitragenden weitgehend übereinstimmen, stellt sich die Frage, ob einem potentiellen direkt antiproliferativen Effekt von Ganciclovir auch im Rahmen der Restenoseentstehung eine signifikante Bedeutung zukommt und damit ein möglicher Ansatz zur Restenosierungsprophylaxe eröffnet wird.

1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit untersucht deshalb den direkten Effekt des Virostatikums Ganciclovir auf die ICAM-1-Expression und Proliferation humaner koronarer Gefäßwandzellen. Hierfür wurden glatte Muskelzellen aus humanen Koronarien (HCMSMC) und Endothelzellen aus humanen Koronarien (HCAEC) verwendet. Daneben kamen, aus Gründen der Vergleichbarkeit der zu erhebenden Daten, Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) zum Einsatz (Klein et al. 1994).

Zur Messung der ICAM-1-Expression wurden die drei untersuchten Zellarten 18 Stunden mit verschiedenen Ganciclovirkonzentrationen inkubiert und während der letzten 6 Stunden mit Tumor necrosis factor alpha (20 ng/ml) stimuliert. Beim anschließenden Nachweis der ICAM-1-Expression wurden alle Zellen mit einem fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometer analysiert.

Der Effekt von Ganciclovir auf die Zellproliferation der HUVEC, HCAEC und HCMSMC wurde nach fünftägiger Inkubation mit obigen Ganciclovirkonzentrationen mittels eines Zellcounters erfasst.

Ergänzend zu den Ganciclovirwirkungen auf die ICAM-1-Expression und Proliferation der Zellen wurde in dieser Arbeit auch die Wirkung des Virostatikums auf die Zellvitalität der einzelnen Zellreihen untersucht.

Die Ergebnisse wurden mit der SI/MPL-Ratio eingeordnet (Voisard et al. 2004), welche die Relation zwischen einem signifikanten Effekt (significant inhibition SI) in vitro und

dem maximalen (nicht toxischen) Plasmaspiegel (maximal plasma level MPL) in vivo beschreibt, der für Ganciclovir 9 µg/ml beträgt (Jung et al. 1998).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zellen

Im Rahmen der Versuchsdurchführungen wurden 3 verschiedene Zellarten verwendet, bis zu Passagen < 8. Bei den verwendeten Zellarten handelte es sich um humane Endothelzellen aus umbilikalen (Nabelschnur-)Venen (HUVEC), humane Endothelzellen aus koronaren Arterien (HCAEC) sowie humane glatte Muskelzellen aus der Media koronarer Arterien (HCMSMC).

2.1.1.1.2. Humane venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur

Die in den Versuchen eingesetzten HUVEC wurden aus umbilikalen Venen isoliert und kultiviert, die uns freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik der Universität Ulm (Prof. R. Kreienberg) zur Verfügung gestellt worden sind.

2.1.1.1.3. Humane koronare Endothelzellen (HCAEC)

Die zu den Versuchsdurchführungen eingesetzten HCAEC wurden von Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien) erworben.

2.1.1.1.4. Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media (HCMSMC)

Ebenfalls von der Firma Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien) wurden die im Rahmen der Versuchsdurchführung eingesetzten HCMSMC bezogen.

2.1.1.2. Kulturmedien

2.1.1.2.1. Kulturmedium für Endothelzellen

Als Kulturmedium wurde für die HUVEC und HCAEC Endothel cell growth medium (EGM) (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) verwendet.

Dem Endothelial Basal Medium wurden folgende Substanzen zugegeben:

- 12 µg/ml Bovine brain extract
- 10 ng Epidermal growth factor
- 5 % Fetal calf serum
- 1 µg/ml Hydrocortison

- 50 µg/ml Gentamicin
- 50 ng/ml Amphotericin

Die aufgeführten Substanzen wurden von Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien bezogen.

2.1.1.2.2. Kulturmedium für glatte Muskelzellen

Für die Kultivierung der HCMSMC fand Smooth muscle cell growth medium (SmGM) Verwendung. Ebenfalls von der Firma Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien wurde Smooth muscle cell Basal Medium bezogen, welchem folgende Substanzen zugegeben wurden:

- 5 µg/ml Insulin
- 2 ng/ml Fibroblast growth factor
- 0,5 ng/ml Epidermal growth factor
- 5 % Fetal calf serum
- 50 ng/ml Amphotericin

Auch in diesem Fall wurden alle Substanzen von Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien erworben.

2.1.1.3. Temperatur, Begasung, pH-Wert

Die Zellkulturen wurden im Begasungsinkubator (HERAcell, Heraeus, Kendro, Hanau) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Durch den CO₂-Partialdruck wurde das CO₂/HCO₃⁻-Puffersystem auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 eingestellt und konstant gehalten.

2.1.1.4. Pufferlösung

Zur Beschichtung der Kulturschalen mit Kollagen sowie zum Spülen des Zellrasens vor dem Abtrypsinieren, wurde die Pufferlösung Phosphate Buffered Saline Dulbecco's without Calcium and Magnesium (PBS⁻) (PAA Laboratories, Linz, Österreich) eingesetzt.

2.1.1.5. Enzymlösung

Die verwendete Enzymlösung Trypsin/EDTA-Solution (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) diente zum Ablösen der Zellen von ihrer Unterlage.

2.1.1.6. Trypsin-Neutralisationslösung

Zur Neutralisierung der Trypsin/EDTA-Solution wurde Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS) (Bio Whittacker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien) verwendet.

2.1.1.7. Adhäsionsfaktoren

Zur Kollagenbeschichtung der Kulturgefäße wurde Kollagen Typ I from rat tail (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt. Es wurde 1 mg davon in 1 ml 0,1 M Essigsäure (Merck, Darmstadt) gelöst und mit 0,2 µm-Filter (VWR, Darmstadt) steril filtriert.

2.1.1.8. Zentrifugenröhrchen

Es wurden PS-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) verwendet.

2.1.1.9. Kulturgefäße

Für die Routinekultur kamen Kulturschalen mit 75 cm² Wachstumsfläche vom Typ Cellstar (Greiner, Frickenhausen) zum Einsatz.

2.1.1.10. Geräte

- Sterilbank: Laminar-Flow (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- Inkubator: HERAcell (Heraeus, Kendro, Hanau)
- Wasserbad: SW-20C (Julabo, Seelbach)
- Gasbrenner: Fireboy eco (Integra Biosciences, Fernwald)
- Pipetierhilfe: Pipetboy plus (Integra Biosciences, Fernwald)
- Pumpen: Vakuumpumpen KNF (VWR, Darmstadt)
- Mikroskop: Nikon TMS-Inversmikroskop mit ELWD-Kondensor und Phasenkontrastobjektiven CF Plan Achromat 20/0,4 DL
- Zentrifuge: Universal 2S (Hettich, Tuttlingen)

2.1.2. Durchflusszytometrie

2.1.2.1. Testsubstanz

Als Testsubstanz wurde Ganciclovir (Cymeven®) (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) verdünnt mit destilliertem Aqua steril verwendet. Die Stammlösung wies hierbei eine Konzentration von 500 mg/ml auf.

2.1.2.2. Pufferlösung

Die bei der Durchflusszytometrie eingesetzte Pufferlösung bestand aus 500 ml PBS⁻ (Phosphate Buffered Saline Dulbecco's without Calcium and Magnesium; PAA Laboratories, Linz, Österreich) und 10 ml fcs (fetal calf serum, Gibo Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

2.1.2.3. Zytokine

Für die Stimulation der Zellen der interzellulären Adhäsionsmolekül-Expression wurde Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die Stammlösung wies dabei eine Konzentration von 10 μ g/ml auf. Die Endkonzentration betrug 20 ng/ml.

2.1.2.4. Antikörper

Als monoklonaler Antikörper ICAM-1 (CD 54) wurde Anti-ICAM-1-Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)-konjugiert (Immunotech/Dianova, Hamburg) mit der Verdünnung von 1:20 in Puffer verwendet.

2.1.2.5. Kontrollsubstanzen

Es wurde Actinomycin-D (AM-D) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), gelöst in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), verwendet. Die Konzentration der Stammlösung betrug 1 mg/ml.

2.1.2.6. Isotypenkontrolle

Hierfür wurde ein monoklonaler Mäuseantikörper, welcher unterschiedliche Isotypen aufweist und gegen *Aspergillus niger* gerichtet ist, eingesetzt. Das Mausimmunoglobulin G-1 (Maus-IgG-1)-FITC-konjugiert wurde in einer Verdünnung von 1:20 in Puffer verwendet.

2.1.2.7. Propidiumiodid

Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen bei der Durchflusszytometrie diente Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

2.1.2.8. Kulturgefäße

Bei Versuchsdurchführung fanden 6-Lochschalen mit 9,6 cm² Wachstumsfläche pro Vertiefung vom Typ Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) Verwendung.

2.1.2.9. Reaktionsgefäße

Zur Verdünnung der Medikamente und zum Inkubieren der Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden Eppendorfcups, Safe Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg) als Reaktionsgefäße verwendet.

2.1.2.10. Messgefäße

Hier kamen 5 ml Röhren vom Typ Falcon-2054 (Becton Dickinson, Heidelberg) zum Einsatz.

2.1.2.11. Geräte

- Eppendorf-Zentrifuge: Biofuge pico (Heraeus, Kendro, Hanau),
- Kühlzentrifuge: Varifuge 3.0 R (Heraeus, Kendro, Hanau),
- Durchflusszytometer: BD FACS Calibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) mit Macintosh-Systemsoftware Mac OS 9.2.1 und dem Programm Cell Quest Pro. Die Histogramme wurden mit dem Programm WinMDI Version 2.7 erstellt.

2.1.3. Proliferationsmessungen

2.1.3.1. Testsubstanz

Als Testsubstanz wurde Ganciclovir (Cymeven®) (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) verdünnt mit destilliertem Aqua steril verwendet. Die Stammlösung wies hierbei eine Konzentration von 500 mg/ml auf.

2.1.3.2. Weitere Substanzen

- 0,9 % steriles NaCl (B. Braun, Melsungen AG)
- Aqua für Infusionszwecke (GSK, München)

2.1.3.3. Kulturgefäße

Bei Versuchsdurchführung wurden 6-Lochschalen mit 9,6 cm² Wachstumsfläche pro Vertiefung vom Typ Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) eingesetzt.

2.1.3.4. Messgefäße

Es wurden Zellcountermessgefäße von 22 x 65 PPN (Schärfe, Reutlingen) verwendet.

2.1.3.5. Reaktionsgefäße

Zur Verdünnung des Ganciclovirs (Cymeven®) wurden Eppendorfcups, Safe Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt.

2.1.3.6. Geräte

Folgende Geräte wurden zur Versuchsdurchführung verwendet:

- Zellcounter: Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellcounters CASY TTC (Schärfe, Reutlingen) vor jeder Zellaussaat und zur Bestimmung der Proliferation bestimmt.
- Dispenser (VWR, Darmstadt)

2.1.4. Zellvitalitätstest

2.1.4.1. Kulturgefäße

Es wurden weiße 96-Lochschalen (steril) (Nalge Nunc International, VWR International, Darmstadt) verwendet.

2.1.4.2. Lumineszenzreagenz

Hierfür wurde Cell Titer-Glo™ (Promega GmbH, Mannheim) verwendet.

2.1.4.3. Geräte

Im Rahmen des Zellvitalitätstests fanden folgende Geräte Verwendung:

- Luminator: Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- Magnetschüttler: Variomag (H+P Labortechnik, VWR Darmstadt)

2.1.5. Statistik

Es wurde das Statistikprogramm SigmaStat Version 2.0 (paired-t-test) eingesetzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Routinekultivierung

2.2.1.1. Glatte Muskelzellen

Die im Rahmen der Versuchsdurchführung eingesetzten HCMSMC wurden unter Zugabe von 10 ml Kulturmedium in Kulturschalen, die eine Wachstumsfläche von 75 cm² aufwiesen, kultiviert. Nach Konfluenz der Zellen wurden die Kulturen zweimal mit jeweils 5 ml PBS⁻ gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Solution (2.1.1.5.) von der Unterlage gelöst und vereinzelt. Zur Neutralisation der Zellsuspension wurden danach 5 ml Trypsin-Neutralizing-Solution (2.1.1.6.) zugegeben. Die neutralisierte Zellsuspension wurde anschließend fünf Minuten lang bei 1200 U/min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abgesaugt werden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5 x 10³/cm² ausgesät. Das Kulturmedium wurde im Rahmen der Versuchsdurchführung alle zwei bis drei Tage erneuert.

2.2.1.2. Endothelzellen

2.2.1.3. Kollagenbeschichtung der Kulturschalen

Kulturschalen mit 75 cm² und 6-Lochschalen wurden für die im Versuch verwendeten HUVEC und HCAEC bereits vor der Zellaussaat mit Rattenkollagen Typ I (2.1.1.7.) beschichtet. Zur Versuchsdurchführung wurden bei Verwendung von HUVEC in einer Kulturschale 100 µl Kollagenlösung mit 5 ml PBS⁻ verdünnt. Bei Verwendung von HCAEC wurde die doppelte Menge Kollagen, d.h. 200 µl mit 5 ml PBS⁻ verdünnt. Beim Einsatz von 6-Lochschalen wurden für die HUVEC 20 µl Kollagen mit 1 ml PBS⁻ verdünnt, für die HCAEC entsprechend 40 µl Kollagen mit 1 ml PBS⁻ verdünnt. Nach Kollagenbeschichtung wurden die Schalen über 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4. Kultivierung

Nach Kollagenbeschichtung und darauf folgender Inkubation wurde das mit PBS⁻ (2.1.1.4.) verdünnte Kollagen abgesaugt. Anschließend erfolgte die Routinekultivierung gemäß der Behandlung der glatten Muskelzellen.

2.2.2. Durchflusszytometrie

Dieser Versuch wurde für jede der verwendeten Zellarten dreimal durchgeführt. Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden die Zellen in 6-Lochschalen ausgesät. Bei Verwendung von Endothelzellen wurden die 6-Lochschalen, wie bereits unter 2.2.1. beschrieben, vor der Zellaussaat mit Kollagen beschichtet.

Um jeweils die Eigenfluoreszenz der Zellen (ohne Antikörper, Tabelle1 (1)) sowie die ICAM-1-Expression ohne vorherige Stimulation (Tabelle1 (2)) bestimmen zu können, wurden in jeder Versuchsreihe zunächst Zellen mitgeführt. Zur Bestimmung der ICAM-1-Expression nach der TNF- α -Stimulation (2.1.2.3.) wurden Zellen 6 h nur mit TNF- α und danach mit Anti-ICAM-FITC (2.1.2.4.) inkubiert (Tabelle1 (3)). Ganciclovir (2.1.2.1) wurde den Zellen in 6 verschiedenen Konzentrationen, jeweils über 18 h, wie folgt zugegeben: 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (4)), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (5)), 5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (6)), 50 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (7)), 500 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (8)) und 5000 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle1 (9)). Zur Messung einer Negativkontrolle wurden die Zellen anstelle von Ganciclovir mit 1 $\mu\text{g/ml}$ AM-D behandelt (Tabelle1 (10)). Außerdem wurden Zellen mit - und ohne TNF- α -Stimulation (Tabelle1 (11 und 12)) mitgeführt, die später mit IgG1-FITC für anschließende Kontrollmessungen inkubiert wurden. Die Versuchsansätze 11 und 12 (Tab 1 (11 und 12)) dienen dem Ausschuss einer unspezifischen Bindung von Antikörpern der Klasse IgG an die zu untersuchenden Zellen. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Zellen, abgesehen von den Zellen zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz (Tabelle1 (1 und 2)) sowie weiteren, zu Kontrollmessungen dienenden Zellen (Tabelle1 (12)), mit 20 ng/ml TNF- α stimuliert. Die nun mit TNF- α stimulierten sowie die nicht-stimulierten Zellen wurden weitere 6 Stunden inkubiert, bevor im letzten Schritt die Antikörper zugegeben wurden. Die bereits für weitere Kontrollmessungen mitgeführten Zellen mit - und ohne TNF- α -Stimulation (Tabelle1 (11 und 12)) wurden anschließend mit IgG1-FITC anstelle von Antikörpern gegen ICAM-1 versetzt, um eine unspezifische, von ICAM-1 unabhängige Bindung an die Zelloberfläche auszuschließen. Eine Übersicht über den Versuchsablauf ist umseitig in Tabelle 1 dargestellt.

Tab.1: Versuchsprotokoll der Durchflusszytometrie

Versuchsansätze	Ganciclovir	TNF- α	Antikörper
1 Eigenfluoreszenz	---	---	---
2 nicht stimuliert	---	---	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
3	---	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
4	18 h Inkubation mit 0,05 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
5	18 h Inkubation mit 0,5 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
6	18 h Inkubation mit 5 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
7	18 h Inkubation mit 50 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
8	18 h Inkubation mit 500 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
9	18 h Inkubation mit 5000 μ g/ml	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
10 Kontrolle	18 h Zugabe von 1 μ g/ml AM-D	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von Anti-ICAM-1-FITC
11 Kontrolle	---	6 h Inkubation mit 20 ng/ml	Zugabe von IgG-1-FITC
12 Kontrolle	---	---	Zugabe von IgG-1-FITC

AM-D: Actinomycin-D; Anti ICAM-1-FITC: monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1-FITC konjugiert; FITC: Fluoreszinsisothiocyanat; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; IgG-1-FITC: monoklonaler Antikörper unterschiedlicher Isotypen gegen Aspergillus niger-Glucoseoxidase gerichtet, FITC konjugiert; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

2.2.2.1. ICAM-1-Färbung für die Durchflusszytometrie

Die bereits in den 6-Lochschalen vorbehandelten Zellen wurden nun zweimal mit 2 ml PBS⁻ gespült, anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Solution vereinzelt und mit Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt. Danach wurde 5 min. bei 1200 U/min. und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das verbliebene Pellet in 1 ml Puffer (2.1.2.2.) aufgenommen, in Eppendorf-Cups überführt und 2 min. bei 4000 U/min erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets der Zellen, die bereits mit Ganciclovir, AM-D bzw. ohne jegliche Stimulation zur Messung der Eigenfluoreszenz inkubiert wurden, 20 min. mit 100 µl FITC- konjugierten Anti-ICAM-1-Antikörpern (2.1.2.4.) versetzt. Für Kontrollmessungen mit - und ohne TNF- α -Stimulation (2.1.2.3.), wurden die Pellets anstelle von FITC- konjugierten Anti-ICAM-1-Antikörpern mit 100 µl/ml FITC- konjugierten IgG1-Antikörpern (2.1.2.6.) ebenfalls über 20 min. behandelt. Außerdem wurde das Pellet der Zellen, die zur Messung der Eigenfluoreszenz mitgeführt wurden, 20 min. mit 100 µl Puffer versetzt. Nach Ablauf der 20 min. wurden alle Proben mit Puffer auf 1 ml aufgefüllt und nochmals 2 min. bei 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wieder abgesaugt, das jeweilige Pellet in 500 µl Puffer gelöst und danach in Messgefäße (Falcon-2054) (2.1.2.10.) überführt. Um den Anteil toter Zellen in der Suspension bestimmen zu können, wurde zu jeder Lösung 1 µl Propidiumiodid gegeben.

2.2.2.2. Versuchsauswertung der ICAM-1-Fluoreszenzintensität

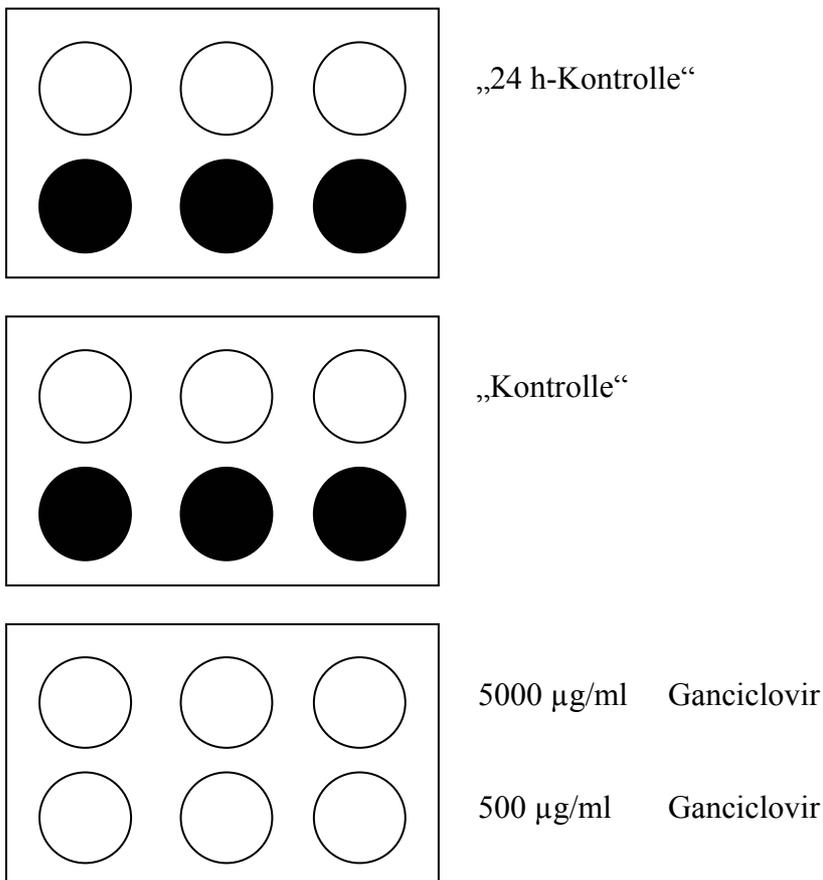
Zur Analyse der ICAM-1-Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellen diente der FACS-Calibur-Durchflusszytometer (2.1.2.11.). Hiermit wurden jeweils 10000 Zellen gemessen und mit dem Programm Cell Quest Pro ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse in Histogrammen sowie die Bestimmung der Mittelwerte wurden mit dem Programm WinMDI 2.7 durchgeführt. Anhand der Histogramme lässt sich die Verteilung der Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität ablesen. Hierfür wurde über der Abszisse die Fluoreszenzintensität logarithmisch und über der Ordinate die Anzahl der Zellen linear aufgetragen.

2.2.3. Proliferationsmessungen

Dieser Versuch wurde für jede der drei verwendeten Zellarten jeweils dreimal durchgeführt.

2.2.3.1. Zellaussaat

Zur Versuchsvorbereitung wurden die Zellen - wie bereits bei der Routinekultivierung beschrieben - kultiviert, abtrypsiniert, zentrifugiert und die Gesamtzellzahl im Zellcounter bestimmt. Bei Verwendung von Endothelzellen wurden die Kulturschalen, wie bereits unter 2.2.1.3. erwähnt, zuvor mit Kollagen beschichtet. Anschließend wurden die Zellen in drei bzw. 6 Vertiefungen der 6-Lochkulturschale (10 cm²/Vertiefung) ausgesät, so dass in jeder Vertiefung 35000 - 50000 Zellen pro 2 ml Kulturmedium weiter kultiviert werden konnten. Insgesamt wurden für eine Versuchsdurchführung fünf 6-Lochkulturschalen benötigt. Für die Kultivierung von Kontrollzellen, die nach 24 h bzw. 6 Tagen ausgezählt wurden und im weiteren Verlauf als „24 h-Kontrolle“ bzw. „Kontrolle“ bezeichnet werden, fanden je drei Vertiefungen der entsprechenden 6-Lochkulturschale Verwendung. In den drei weiteren Schalen, bei welchen alle 6 Vertiefungen genutzt wurden, wurden die verschiedenen Medikamentenkonzentrationen jeweils drei Vertiefungen zugegeben, so dass pro verwendeter Konzentration und Zellart in jedem Versuchsdurchgang drei Proliferationsmessungen erfolgten. Für „24 h-Kontrolle“ bzw. „Kontrolle“ ergaben sich entsprechend ebenfalls drei Proliferationsmessungen. Einen Überblick vermittelt Abbildung 1.



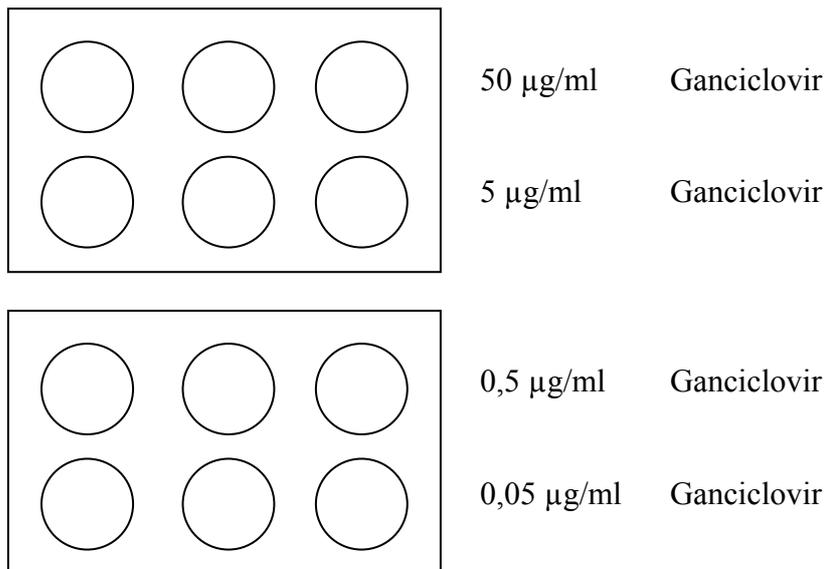


Abb. 1: Versuchsprotokoll der Proliferation

2.2.3.2. Medikamentenzugabe

Zur Versuchsdurchführung wurde Ganciclovir (Cymeven®) in Eppendorfcups im Rahmen einer Verdünnungsreihe in einem Verhältnis von 1:10 mit steril filtriertem, pyrogenfreiem Wasser verdünnt. Die resultierenden Endkonzentrationen betragen 5000 µg/ml, 500 µg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml und 0,05 µg/ml. Die erste Medikamentenzugabe zu den im Versuch verwendeten Zellen (HCMSMC, HUVEC und HCAEC) erfolgte bereits 24 h nach der Zellaussaat, gleich nach dem ersten Mediumwechsel. Bei der so genannten „24 h-Kontrolle“, sowie bei der „Kontrolle“ wurde lediglich das Kulturmedium erneuert. Drei Tage nach der Zellaussaat folgte eine weitere Medikamentenzugabe. Auch hier wurde zuvor das Kulturmedium erneuert. Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden alle Zellen - abgesehen von der „24 h-Kontrolle“ - insgesamt 6 Tage kultiviert.

2.2.3.3. Auswertung der Proliferationstests und statistisches Vorgehen

Bereits 24 h nach Zellaussaat konnte die Anzahl der adhärierenden Zellen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die drei Vertiefungen der „24 h-Kontrolle“ mit jeweils 2 ml PBS⁻ zweimal gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Solution von der Unterlage gelöst und vereinzelt. Danach wurden 4 ml NaCl mittels Dispenser hinzugefügt. Mit einer 5 ml Pipette wurden die Zellen in ein geeignetes Messgefäß (Counterröhrchen) (2.1.3.4.) pipettiert. Danach wurden in jedes Counterröhrchen jeweils 5 ml NaCl (2.1.3.2.) zugegeben und mit Hilfe einer 5 ml Pipette durchmischt. Die Zellen konnten nun am Zellcounter ausgezählt werden. Am sechsten Tag nach Zellaussaat wurden die mit

Ganciclovir inkubierten Zellen sowie die „Kontrolle“ analog der „24 h-Kontrolle“ bearbeitet und anschließend die Zellzahl am Zellcounter bestimmt. War die zu messende Zellzahl im Rahmen der Zellauszählung zu hoch und konnte deshalb nicht gemessen werden, wurde aus dem Messgefäß 1 ml entnommen und in ein neues, leeres Messgefäß pipettiert und 9 ml NaCl zugegeben. Auf diese Weise wurde eine Verdünnung von 1:100 hergestellt und die Zellauszählung am Zellcounter konnte durchgeführt werden. Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte anhand der vom Zellcounter ermittelten Zellzahl. Insgesamt wurde dieser Versuch dreimal für jede verwendete Zellart durchgeführt.

2.2.4. Vitalitätstest

2.2.4.1. Zellaussaat

Zur Versuchsvorbereitung wurden die Zellen, wie bereits bei der Routinekultivierung beschrieben, kultiviert, abtrypsiniert, zentrifugiert und die Gesamtzellzahl im Zellcounter bestimmt. Die Zellaussaat erfolgte in weiße 96-Lochschalen mit 0,33 cm² Fläche pro Loch (2.1.4.1.). Bei Verwendung von Endothelzellen wurden die 96-Lochschalen zuvor mit Kollagen beschichtet: bei Verwendung von HCAEC mit 400 µl Kollagen/10 ml PBS⁻ und bei Verwendung von HUVEC mit 200 µl Kollagen/10 ml PBS⁻. Die Zellen wurden in alle 12 Vertiefungen der 7 von 8 Reihen ausgesät, so dass für jede Versuchsbedingung 12 Messwerte resultierten. Insgesamt wurden 138600 Zellen in den 84 Vertiefungen kultiviert, davon je 5000 Zellen/cm² mit jeweils 100 µl Medium. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden in die 12 Vertiefungen der 8. Reihe keine Zellen ausgesät. Für später durchzuführende Kontrollmessungen wurden in den 12 Vertiefungen der ersten Reihe Zellen mitgeführt, die im Folgenden als „Kontrolle“ bezeichnet werden. Den Zellen in allen Vertiefungen der Reihen zwei bis sieben wurden folgende Konzentrationen an Ganciclovir (Cymeven®) zugegeben: 5000 µg/ml (2), 500 µg/ml (3), 50 µg/ml (4), 5 µg/ml (5), 0,5 µg/ml (6) und 0,05 µg/ml (7). Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden alle Zellen insgesamt 6 Tage kultiviert. Nach 24-stündiger Zellinkubation wurden den Zellen der Reihen zwei bis sieben obige Ganciclovirkonzentrationen zugegeben. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 2 dargestellt.

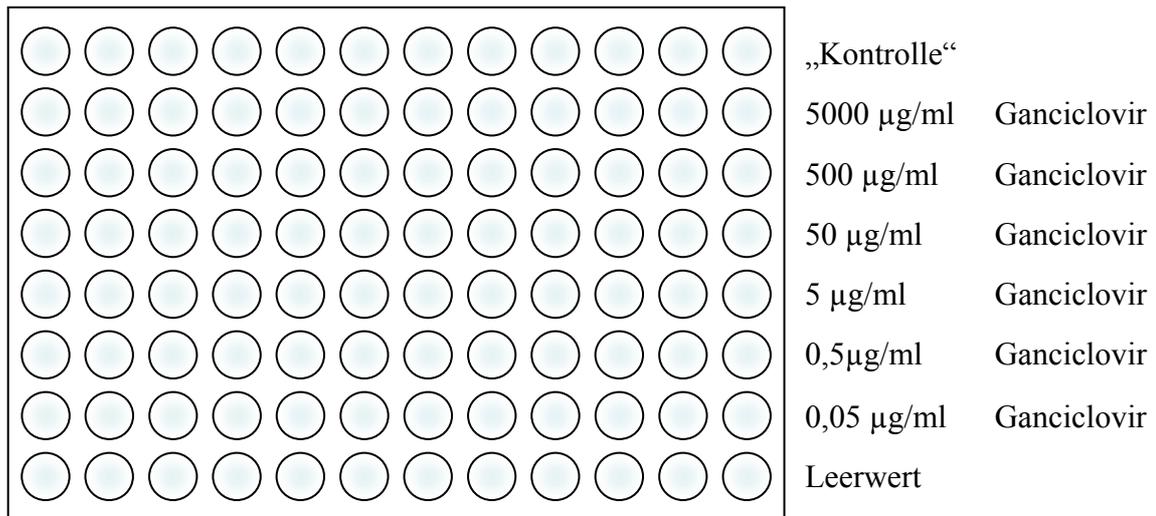


Abb. 2: Versuchsprotokoll des Vitalitätstestes

2.2.4.2. Messung der Zellvitalität

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden die Zellen nach der Zellaussaat 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem für den jeweiligen Versuch geeigneten Medium 100 µl Cell Titer-Glo™ (3.1.4.2.) pro 100 µl Medium zugegeben und 2 min. kreisend gemischt (3.1.4.3.). In der darauf folgenden 10-minütigen Inkubation wurde das Luciferin in Anwesenheit von Magnesium, ATP und Sauerstoff durch den Katalysator Luciferase in Oxyluciferase oxygeniert. Als Nebenprodukt entstanden AMP + PP (Adenosinmonophosphat + Biphosphat), Kohlendioxid und Licht. Das durch diesen Prozess entstandene Licht, angegeben in Relative Light Units (RLU), wurde mit dem Programm Micro Win 2000 des Luminometers für 0,25 - 1 sec/well gemessen.

2.2.5. Statistische Analyse

2.2.5.1. Durchflusszytometrie

Für die verwendeten drei Zellarten wurde dieser Versuch jeweils dreimal durchgeführt. Anschließend wurden aus den erhaltenen Versuchsergebnissen jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. Der Mittelwert der maximal mit TNF- α stimulierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt und die Mittelwerte der mit Ganciclovir vorbehandelten Zellen in Prozent von diesem Wert angegeben.

Die aufgestellte Nullhypothese H_0 besagt, dass sich keine signifikante Veränderung der TNF- α stimulierten ICAM-1-Expression durch Inkubation mit unterschiedlichen Ganciclovirkonzentrationen ergibt. Als Prüfgrößen wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der mit der jeweiligen Konzentration an Ganciclovir inkubierten Zellen gewählt. Eine

zweiseitige Fragestellung wurde gewählt, um nicht nur eine mögliche Hemmung sondern auch eine eventuelle Stimulation der ICAM-1-Expression durch Ganciclovir zu erfassen. Bei Gültigkeit von H_0 läge allerdings eine Normalverteilung der Fluoreszenzintensitäten vor, weil die Zugabe von Ganciclovir einen maximal zufälligen Effekt und keinen gerichteten Einfluss auf die ICAM-1-Expression hätte. Zur Überprüfung von H_0 wurde, da es sich um einen Vergleich von Wertepaaren handelt (Fluoreszenzintensitätsmittelwert der maximal mit TNF- α stimulierten Zellen respektive Fluoreszenzintensitätsmittelwert der mit der jeweiligen Konzentration an Ganciclovir inkubierten Zellen), ein paired-t-test des Programms SigmaStat 2.0 verwendet. Aufgrund kleiner Fallzahlen wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt.

2.2.5.2. Proliferation

Zur Berechnung von Proliferation bzw. Proliferationsinhibition wurde aus den jeweils drei pro Versuchsdurchgang gemessenen Werten der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die prozentuale Standardabweichung berechnet. Von dem Mittelwert der gemessenen Zellzahlen der „Kontrolle“ (Zellzahl 6 Tage nach der Aussaat) wurde der Mittelwert der Zellzahl der „24 h-Kontrolle“ (Zellzahl 24 h nach der Aussaat) subtrahiert und gleich 100 % (= K_{100}) gesetzt. Ausgehend von dem errechneten Wert K_{100} wurden die für die einzelnen, mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ganciclovir errechneten Mittelwerte, nachdem auch hier der Mittelwert der „24 h-Kontrolle“ subtrahiert wurde, prozentual ermittelt (x %). Dieser Versuch wurde für die verwendeten HCMSMC, HUVEC sowie für die HCAEC jeweils dreimal durchgeführt. Von diesen für jede Zellart jeweils drei durchgeführten Versuchen und den daraus errechneten drei Mittelwerten wurden erneut die Mittelwerte für jede Zellart errechnet.

Mit Hilfe des paired-t-tests erfolgte anschließend eine Überprüfung der Mittelwertdifferenzen auf Signifikanz. Der paired-t-tests wurde erneut verwendet, da es sich um einen Vergleich von Wertepaaren handelt. Eine zweiseitige Fragestellung wurde gewählt, um nicht nur eine Hemmung sondern ggf. auch eine Stimulation der Proliferation durch Ganciclovir zu erfassen. Als Prüfgrößen wurden die gemessenen Proliferationswerte, der mit der jeweiligen Konzentration an Ganciclovir inkubierten Zellen, gewählt. Ob Ganciclovir die Proliferation signifikant hemmt und die Nullhypothese damit zurückgewiesen werden muss oder ob die Behandlung mit Ganciclovir ohne signifikanten Einfluss auf die Proliferation der einzelnen Zellarten bleibt und die Nullhypothese somit als gültig betrachtet werden darf, wird jeweils mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wiedergegeben.

2.2.5.3. Vitalität

Aus den 12 Vitalitätswerten der Kontrollmessung, den pro verwendeter Ganciclovirkonzentration anfallenden 12 Vitalitätswerten sowie den 12 Leerwertmessungen wurden jeweils die entsprechenden Mittelwerte berechnet. Der aus diesem Rechenschritt resultierende Mittelwert der Leerwertmessungen wurde von dem errechneten Mittelwert der Kontrollmessungen sowie von den jeweiligen Mittelwerten der mit Ganciclovir behandelten Zellen abgezogen. Der auf diese Weise errechnete Vitalitätsmittelwert der Kontrollmessung wurde gleich 100% gesetzt. Die errechneten Mittelwerte der einzelnen, mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ganciclovir behandelten Zellen, wurden von diesem errechneten Vitalitätsmittelwert der Kontrollmessung aus prozentual ermittelt (x %) und konnten anschließend mit diesem verglichen werden.

Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Mittelwertdifferenzen auf Signifikanz. Die aufgestellte Nullhypothese H_0 besagt, dass sich keine signifikante Veränderung der Vitalität durch Inkubation mit unterschiedlichen Ganciclovirkonzentrationen ergibt. Eine zweiseitige Fragestellung wurde gewählt, um nicht nur eine Hemmung sondern auch eine eventuelle Zunahme der Vitalität durch Ganciclovir zu erfassen. Als Prüfgrößen wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten, der mit der jeweiligen Konzentration an Ganciclovir inkubierten Zellen, gewählt. Bei Gültigkeit von H_0 läge eine Normalverteilung vor. Zur Überprüfung von H_0 wurde, da es sich um einen Vergleich Wertepaaren handelt, ein paired-t-test des Programms SigmaStat 2.0 verwendet. Aufgrund kleiner Fallzahlen wurde das Signifikanzniveau auch in diesem Versuch auf 5 % festgelegt.

2.2.5.4. Einordnung der Ergebnisse mittels SI/MPL-Ratio

Die Ergebnisse werden mit der SI/MPL-Ratio eingeordnet, welche die Relation zwischen einem signifikanten Effekt (significant inhibition SI) in vitro und dem maximalen Plasmaspiegel (maximal plasma level MPL) in vivo beschreibt (Voisard et al. 2004). Der MPL beträgt für Ganciclovir 9 µg/ml (Crumpacker 1996, Jung et al. 1998).

3. Ergebnisse

3.1. Effekte von Ganciclovir auf die TNF- α induzierte ICAM-1-Expression

Im folgenden Text sind die Mittelwerte (X_m) und Standardabweichungen (sd_{n-1}) aus jeweils drei Versuchen in Prozent angegeben. Dabei wurde der Mittelwert der maximal mit TNF- α induzierten ICAM-1-Expression gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der mit verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir behandelten Zellen in Prozent von diesem Wert aus berechnet.

3.1.1. HUVEC

(Vgl. Abb. 3, 4, 5 und Tab. 2)

Der Mittelwert der ICAM-1-Expression bei unstimulierten HUVEC betrug $4,3 \pm 83,3$ %. Nach 6-stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α konnte somit eine Zunahme gegenüber den nicht stimulierten Zellen beobachtet werden. Der Mittelwert wurde in diesem Fall gleich 100 % gesetzt. Wurden die HUVEC 12 h vor TNF- α -Stimulation mit 0,05 μ g/ml Ganciclovir inkubiert, sank der Wert auf $89,9 \% \pm 0,8$ %. Im Vergleich zu den mit TNF- α stimulierten Zellen konnte man eine Verminderung der ICAM-1-Expression feststellen. Im paired-t-test ergab sich ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,01$. Bei Inkubation mit 0,5 μ g/ml Ganciclovir konnte wieder eine Hemmung der ICAM-1-Expression festgestellt werden. Der Mittelwert lag bei $93,7 \% \pm 2,0$ %. Die ICAM-1-Expression wurde mit $p < 0,05$ signifikant gehemmt. Eine weitere Zunahme der Hemmung zeigte sich bei 5 μ g/ml Ganciclovir. Der Mittelwert betrug hier $94,1 \% \pm 1,3$ %. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,01$ signifikant. Bei 50 μ g/ml Ganciclovir lag der Mittelwert bei $98,8 \% \pm 7,7$ %. Im paired-t-test ergab sich ein nicht signifikantes Ergebnis. Bei der Versuchsdurchführung mit einer Konzentration von 500 μ g/ml Ganciclovir konnte ein Mittelwert der ICAM-1-Expression erreicht werden, der zwar über dem Mittelwert der TNF- α -Stimulation lag, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf 5000 μ g/ml, fiel der Mittelwert auf $74,5 \pm 3,5$ % ab. Dieses Ergebnis war mit $p < 0,01$ signifikant.

Eine Übersicht über die Mittelwerte und die errechnete Signifikanz vermittelt das Diagramm in Abbildung 3. Darüber hinaus sind die bei der Durchflusszytometrie gemessenen Fluoreszenzintensitäten umseitig in Histogrammen in Abbildung 4 dargestellt.

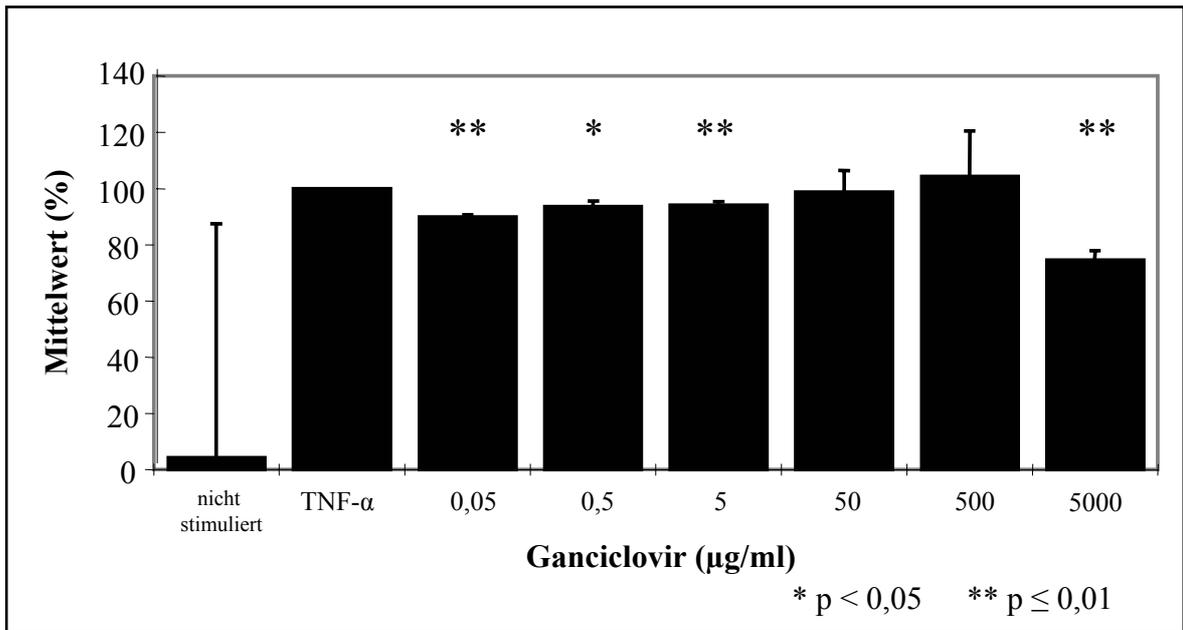


Abb. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der ICAM-1-Expression in Prozent bei HUVEC nach Inkubation mit TNF- α bzw. einzelnen Ganciclovirkonzentrationen. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

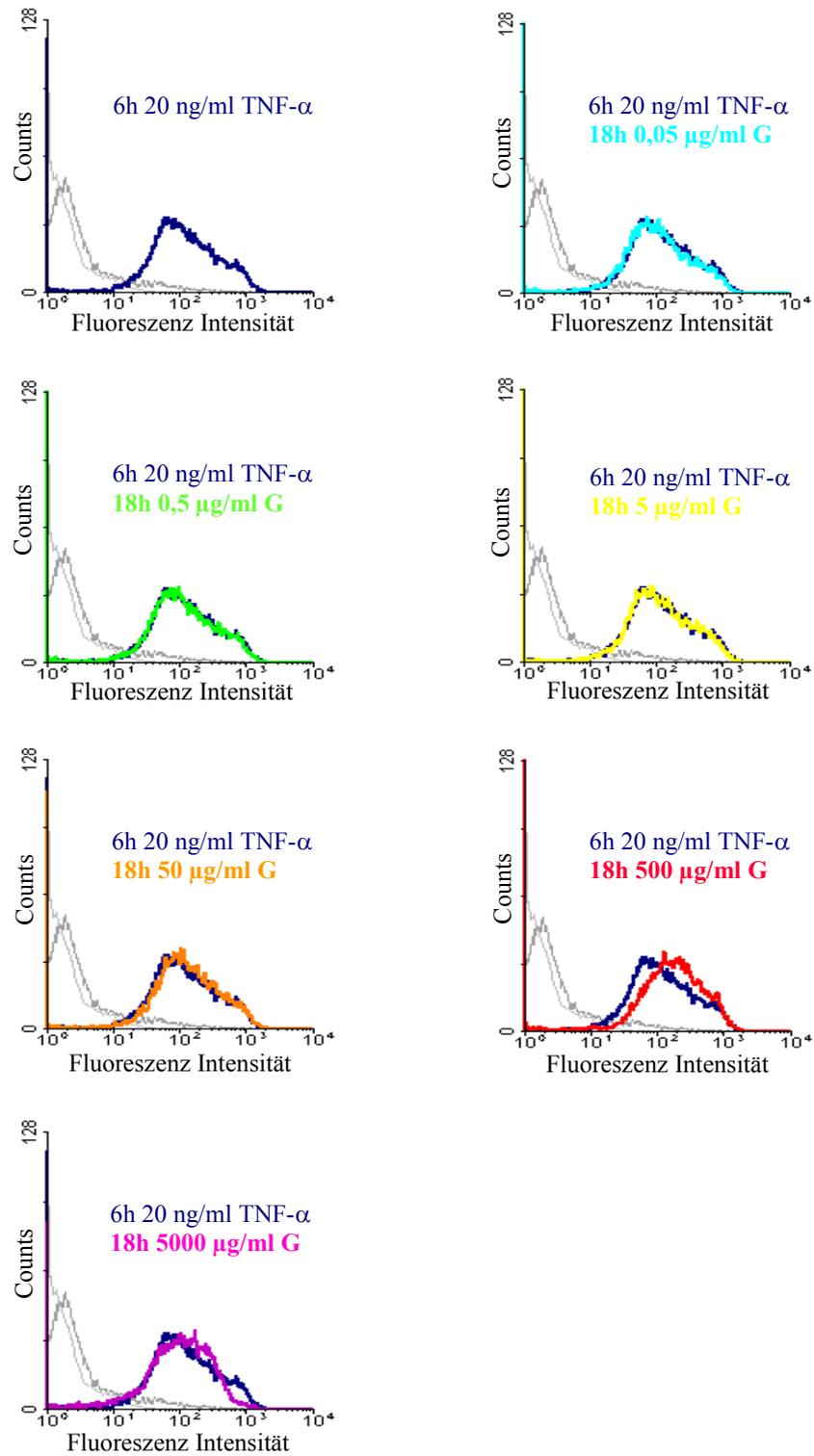


Abb. 4: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **farbig:** mit Ganciclovirinkubation

G. Ganciclovir; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

Für Kontrollmessungen (Abbildung 5) kamen mit Actinomycin-D behandelte Zellen sowie Zellen, die mit FITC konjugierten IgG1-Isotypen - anstelle von Anti-ICAM-1-FITC - inkubiert wurden, zum Einsatz. Eine Übersicht über die dabei erhaltenen Mittelwerte zeigt Tabelle 2. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Histogrammen in Abbildung 5 dargestellt.

Wurden die HUVEC 12 h vor der Stimulation mit TNF- α mit 1 μ g/ml AM-D inkubiert, betrug der Mittelwert der ICAM-1-Expression 5,1 % \pm 93,1 % und war somit nur geringgradig höher, als bei den nicht stimulierten Zellen. Bei Verwendung von IgG-Isotyp-FITC anstelle von Anti-ICAM-FITC lag der Mittelwert der ICAM-1-Expression nach vorheriger TNF- α -Stimulation bei 1,2 % \pm 48,5 %, ohne vorherige Stimulation bei 1,1 % \pm 40,3 %.

Tab. 2: Mittelwerte sowie Standardabweichungen in Prozent der ICAM-1-Expression bei HUVEC nach Inkubation mit TNF- α bzw. Ganciclovir. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen angegeben.

	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α 18 h Inkubation mit 1 μ g/ml AM-D	5,1	93,1
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α Inkubation mit IgG-Isotyp	1,2	48,5
Inkubation mit IgG-Isotyp	1,1	40,3

AM-D: Actinomycin-D; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; IgG-Isotyp: Immunglobulin G Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

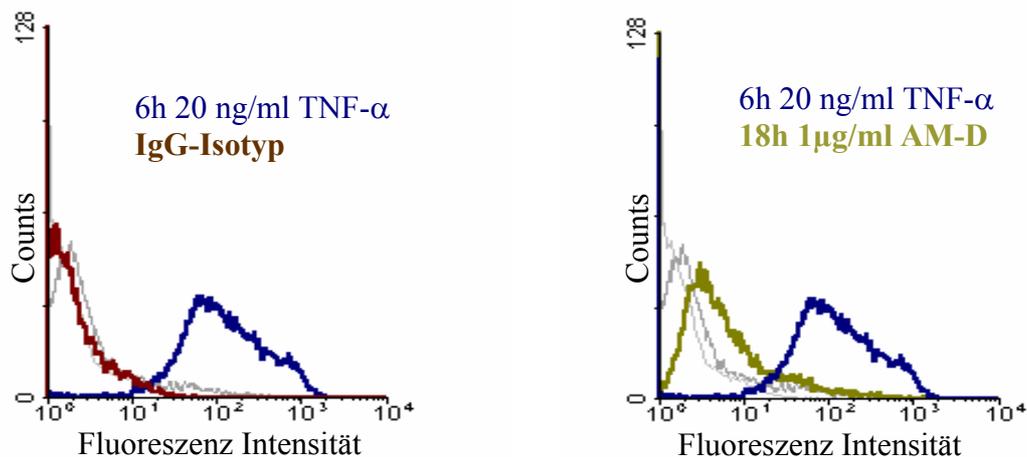


Abb. 5: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **rot:** IgG-Isotyp; **ocker:** AM-D

AM-D: Actinomycin-D; IgG-Isotyp: Immunglobulin G Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

3.1.2. HCAEC

(Vgl. Abb. 6, 7, 8 und Tab. 3)

Der Mittelwert der ICAM-1-Expression bei nicht stimulierten HCAEC betrug $16,5 \% \pm 39,0 \%$. Nach 6-stündiger Stimulation mit $20 \text{ ng/ml TNF-}\alpha$ konnte somit eine Zunahme gegenüber den nicht stimulierten Zellen beobachtet werden. Der Mittelwert wurde in diesem Fall gleich 100% gesetzt. Wurden die HCAEC 12 h vor TNF- α -Stimulation mit $0,05 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir inkubiert, sank der Mittelwert auf $97,3 \pm 4,3 \%$. Der paired-t-test ergab ein nicht signifikantes Ergebnis. Bei Inkubation mit $0,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir stieg die ICAM-1-Expression auf einen Mittelwert von $98,3 \% \pm 3,6 \%$. Auch hier ergab sich im paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis. Bei der Konzentration von $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir stieg die durchschnittliche ICAM-1-Expression auf $104,4 \% \pm 1,9 \%$ erneut an und lieferte kein signifikantes Ergebnis. Bei der nächst höheren Konzentration ($50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir) sank der Mittelwert wieder, lag allerdings mit einem Wert von $101,6 \% \pm 2,2 \%$ noch über dem Mittelwert der TNF- α -Stimulation. Auch dieses Ergebnis war nicht signifikant. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$, fiel der Mittelwert auf $101,3 \% \pm 3,3 \%$. Es ergab sich auch in dieser Konzentration kein signifikantes Ergebnis. Bei der Versuchsdurchführung mit einer Konzentration von $5000 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir fiel der Mittelwert der ICAM-1-Expression auf $74,6 \% \pm 6,9 \%$. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,01$ signifikant.

Eine Übersicht über die Mittelwerte und die jeweilige Signifikanz der Testergebnisse vermittelt das Diagramm in Abbildung 6. Darüber hinaus sind die bei der Durchflusszytometrie gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen in Abbildung 7 dargestellt.

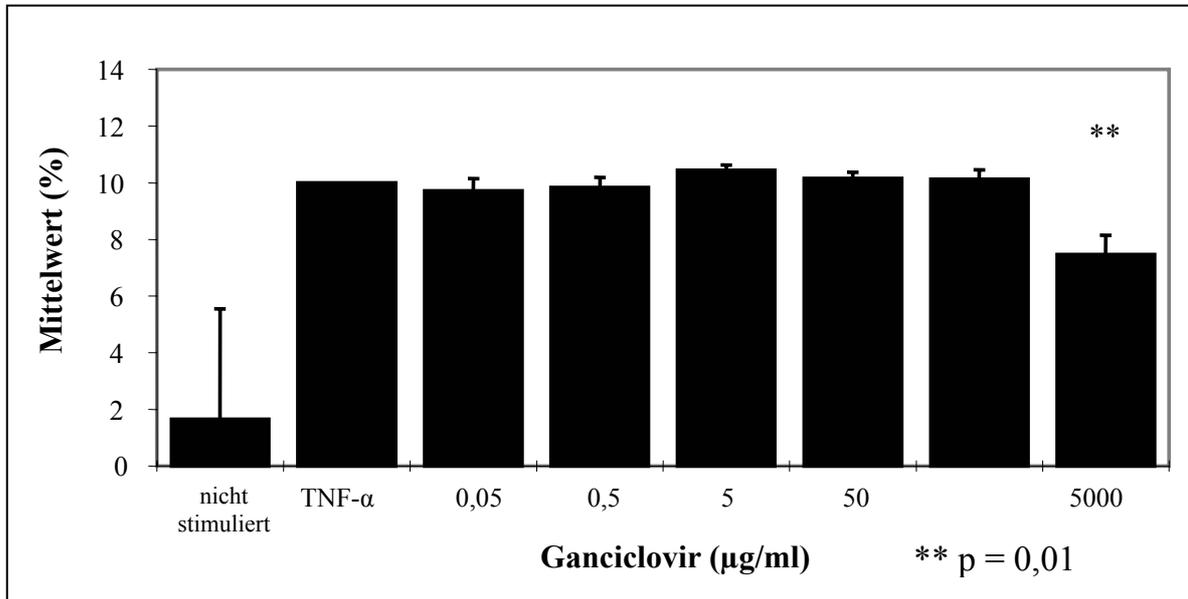


Abb.6: Mittelwerte und Standardabweichungen der ICAM-1-Expression in Prozent bei HCAEC nach Inkubation mit TNF- α bzw. den einzelnen Ganciclovirkonzentrationen. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; HCAEC: human coronary artery endothelial cells; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

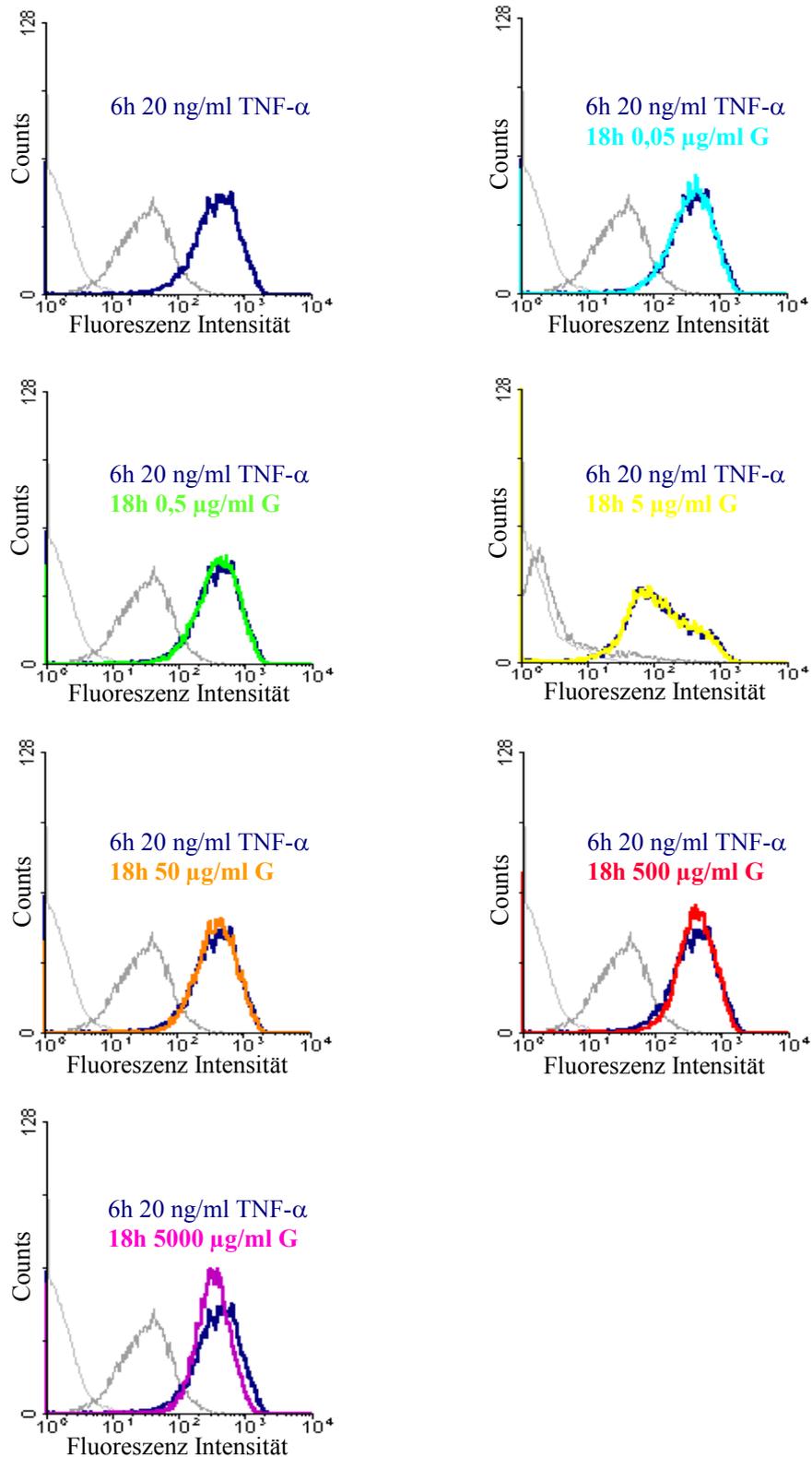


Abb. 7: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **farbig:** mit Ganciclovirinkubation.

G: Ganciclovir; *TNF- α :* tumor necrosis factor alpha

Für Kontrollmessungen (Abbildung 8) kamen mit Actinomycin-D behandelte Zellen sowie Zellen, die mit FITC konjugierten IgG1-Isotypen - anstelle von Anti-ICAM-1-FITC - inkubiert wurden, zum Einsatz. Eine Übersicht über die dabei erhaltenen Mittelwerte zeigt Tabelle 3. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Histogrammen in Abbildung 8 dargestellt.

Wurden die HCAEC 12 h vor der Stimulation mit TNF- α mit 1 μ g/ml AM-D inkubiert, betrug der Mittelwert der ICAM-1-Expression 14,0 % \pm 89,0 % und war somit niedriger als bei den nicht stimulierten Zellen. Bei Verwendung von IgG-Isotyp-FITC anstelle von Anti-ICAM-FITC lag der Mittelwert der ICAM-1-Expression nach vorheriger TNF- α -Stimulation bei 0,8 % \pm 18,5 %; ohne vorherige Stimulation bei 0,7 % \pm 21,0 %.

Tab. 3: Mittelwerte sowie Standardabweichung in Prozent der ICAM-1-Expression bei HCAEC nach Inkubation mit TNF- α bzw. Ganciclovir. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen angegeben.

	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α 18 h Inkubation mit 1 μ g/ml AM-D	14,0	89,0
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α Inkubation IgG-Isotyp	0,8	18,5
Inkubation IgG-Isotyp	0,7	21,0

AM-D: Actinomycin-D; IgG-Isotyp: HCAEC: human coronary artery endothelial cells; IgG-Isotyp: Immunglobulin G-Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

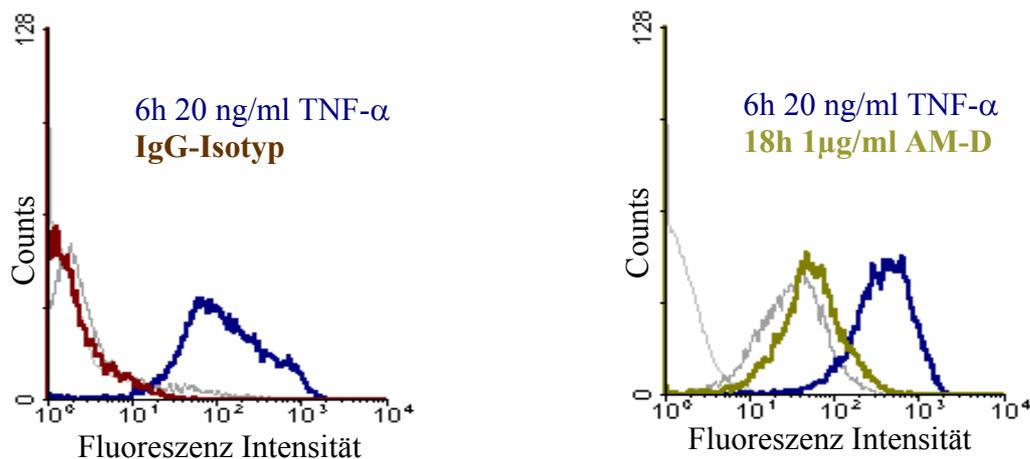


Abb. 8: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **rot:** IgG-Isotyp; **ocker:** AM-D

AM-D: Actinomycin-D; IgG-Isotyp: Immunglobulin G-Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

3.1.3. HCMSMC

(Vgl. Abb. 9, 10, 11 und Tab. 4)

Der Mittelwert der ICAM-1-Expression bei nicht stimulierten HCMSMC betrug $57,6 \% \pm 14,7 \%$. Nach 6-stündiger Stimulation mit $20 \text{ ng/ml TNF-}\alpha$ konnte somit eine Zunahme gegenüber den nicht stimulierten Zellen beobachtet werden. Der Mittelwert wurde auch hier gleich 100% gesetzt. Wurden die HCMSMC 12 h vor TNF- α -Stimulation mit $0,05 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir inkubiert, sank der Mittelwert der ICAM-1-Expression auf $91,5 \% \pm 6,0 \%$. Im paired-t-test ergab sich keine Signifikanz. Bei Inkubation mit $0,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir stieg die ICAM-1-Expression auf einen Mittelwert von $93,1 \% \pm 1,4 \%$. Erneut ergab sich im paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis. Bei einer Konzentration von $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir sank die durchschnittliche ICAM-1-Expression auf $85,8 \% \pm 17,9 \%$ ab und lieferte auch hier kein signifikantes Ergebnis. Bei der nächst höheren verwendeten Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir sank der Mittelwert der ICAM-1-Expression auf einen Wert von $87,5 \% \pm 16,6 \%$ wieder etwas ab und zeigte sich im paired-t-test als signifikant mit $p < 0,05$. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$ fiel der Mittelwert der ICAM-1-Expression auf $85,8 \% \pm 12,8 \%$. Es konnte aber für diese Konzentration kein signifikantes Ergebnis errechnet werden. Bei der Versuchsdurchführung mit einer Konzentration von $5000 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir fiel der Mittelwert der ICAM-1-Expression auf $85,0 \% \pm 5,9 \%$. Dieses Ergebnis war signifikant mit $p < 0,05$.

Eine Übersicht über die Mittelwerte und die jeweilig errechnete Signifikanz vermittelt das Diagramm in Abbildung 9. Darüber hinaus sind die bei der Durchflusszytometrie gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen in Abbildung 10 dargestellt.

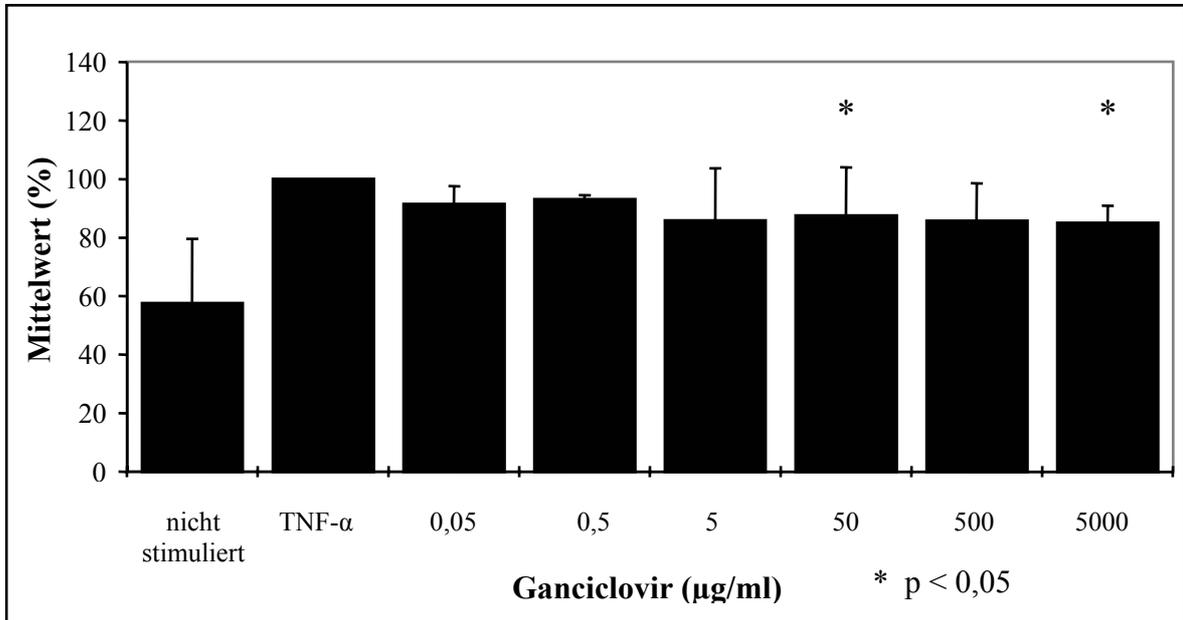


Abb. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der ICAM-1-Expression in Prozent bei HCMSMC nach Inkubation mit TNF- α bzw. den einzelnen Ganciclovirkonzentrationen. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

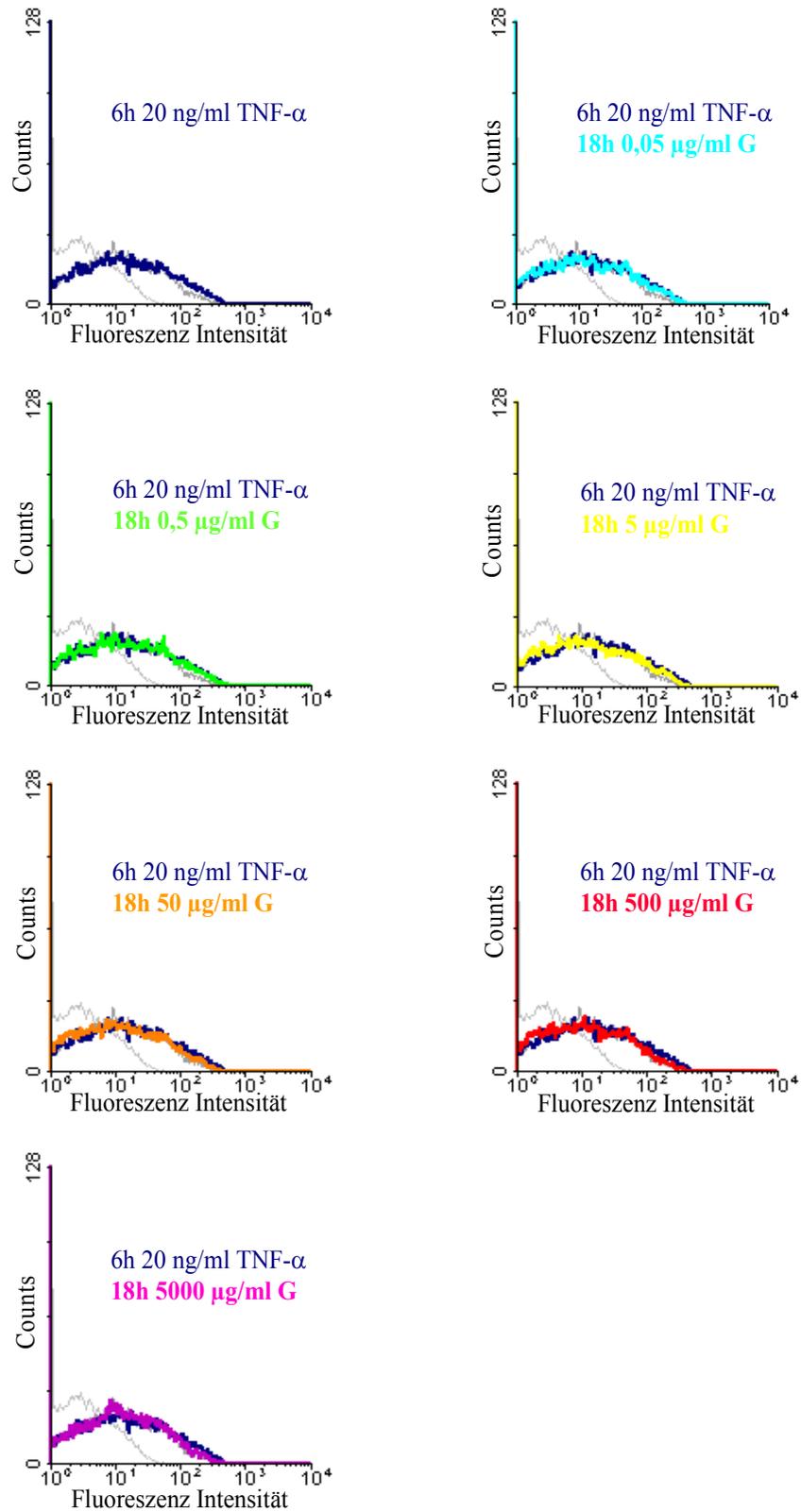


Abb. 10: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **farbig:** mit Ganciclovirinkubation.

G: Ganciclovir; *TNF- α :* tumor necrosis factor alpha

Für Kontrollmessungen (Abbildung 11) kamen mit Actinomycin-D behandelte Zellen sowie Zellen, die mit FITC konjugierten IgG1-Isotypen - anstelle von Anti-ICAM-1-FITC - inkubiert wurden, zum Einsatz. Eine Übersicht über die dabei erhaltenen Mittelwerte gibt Tabelle 4. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Histogrammen in Abbildung 11 dargestellt.

Wurden die HCMSMC 12 h vor der Stimulation mit TNF- α mit 1 μ g/ml AM-D inkubiert, betrug der Mittelwert der ICAM-1-Expression 55,0 % \pm 77,8 %. Er war niedriger als bei den nicht stimulierten Zellen. Bei Verwendung von IgG-Isotyp-FITC anstelle von Anti-ICAM-FITC lag der Mittelwert der ICAM-1-Expression nach vorheriger TNF- α -Stimulation bei 10,8 % \pm 15,1 %; ohne vorherige Stimulation bei 10,2 % \pm 0,1 %.

Tab. 4: Mittelwerte sowie Standardabweichung in Prozent der ICAM-1-Expression bei HCMSMC nach Inkubation mit TNF- α bzw. Ganciclovir. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen angegeben.

	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α 18 h Inkubation mit 1 μ g/ml AM-D	55,0	77,8
6 h Inkubation mit 20 ng/ml TNF- α Inkubation IgG-Isotyp	10,8	1,6
Inkubation IgG-Isotyp	10,2	0,1

AM-D: Actinomycin-D; HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; Immunglobulin G-Isotyp: IgG-Isotyp; Immunglobulin G Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

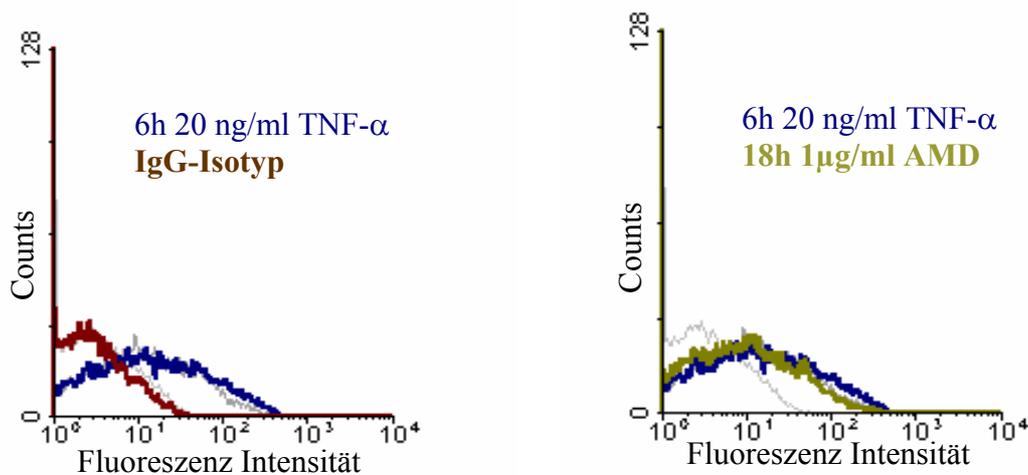


Abb. 11: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **rot:** IgG-Isotyp; **ocker:** AM-D

AM-D: Actinomycin-D; IgG-Isotyp: Immunglobulin G-Isotyp; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

3.1.4. Vergleich der TNF- α induzierten ICAM-1-Expression der HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Inkubation mit Ganciclovir

(Vgl. Abb. 12, 13)

Bei der Versuchsdurchführung mit HUVEC wurde unter Verwendung der Ganciclovirkonzentrationen von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 0,0055), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 0,055), 5 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 0,55) sowie 5000 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 555) eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$ bei 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und $p \leq 0,01$ bei 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 5000 $\mu\text{g/ml}$) der ICAM-1-Expression erreicht. Demgegenüber wurde unter Verwendung von HCAEC lediglich bei einer Ganciclovirkonzentration von 5000 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 555) eine signifikante Hemmung der ICAM-1-Expression erzielt ($p = 0,01$). Obwohl sich eine tendenzielle Hemmung der ICAM-1-Expression auch bei Konzentrationen von 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$ abzeichnete, erreichten die entsprechenden Messwerte das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht. Bei der Untersuchung der HCMSMC konnte eine signifikante Hemmung der ICAM-1-Expression ($p < 0,05$) lediglich bei Ganciclovirkonzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 5,5) bzw. 5000 $\mu\text{g/ml}$ (SI/MPL = 555) protokolliert werden. Eine tendenzielle Hemmung der ICAM-1-Expression konnte jedoch auch bei allen anderen eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden.

Eine graphische Übersicht der Mittelwerte der ICAM-1-Expression erfolgt in Abbildung 12. Darüber hinaus ist ein Vergleich der durchflusszytometrisch erfassten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellarten in Abbildung 13 dargestellt.

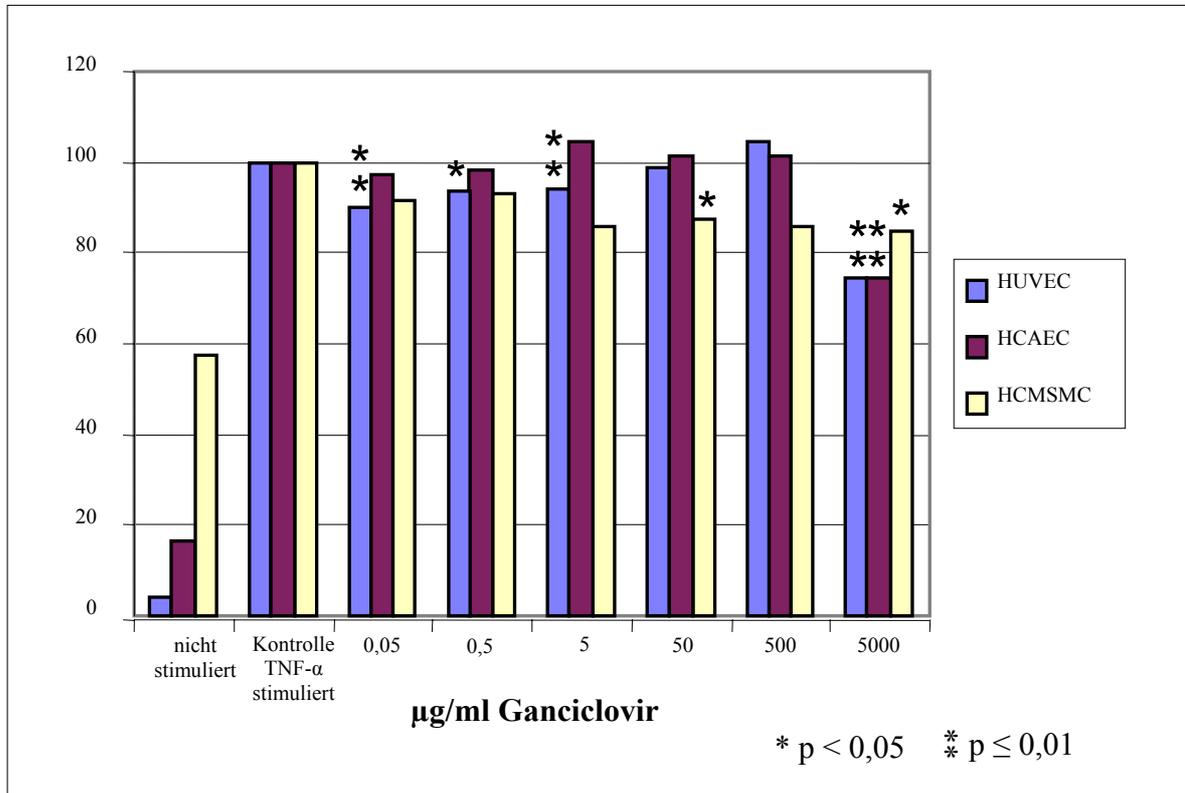


Abb. 12: Mittelwerte der ICAM-1-Expression aus drei Versuchen in Prozent bei HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Inkubation mit TNF- α (6 h) bzw. Ganciclovir (18 h) im Vergleich.

Blau: HUVEC, rot: HCAEC, gelb: HCMSMC

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

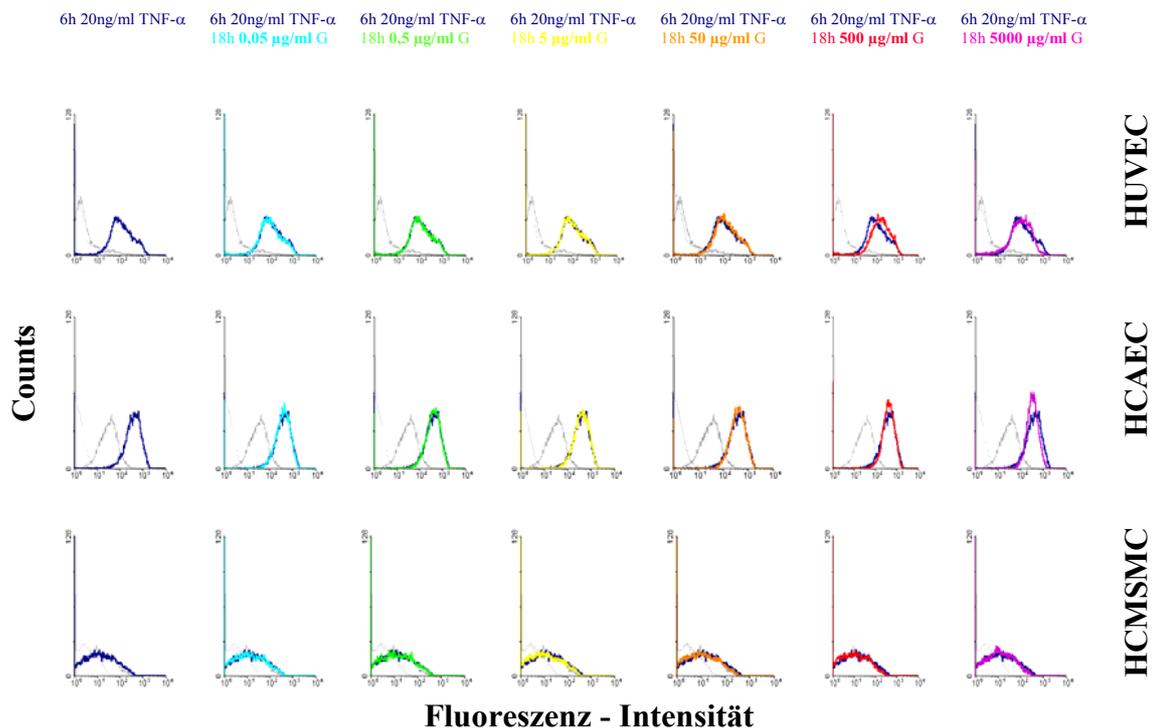


Abb.13: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie im Vergleich.

Grau: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); **dunkelblau dick:** TNF- α -Stimulation; **farbig:** mit Ganciclovirinkubation.

G: Ganciclovir; HCAEC: human coronary artery endothelial cells; HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

3.2. Effekte von Ganciclovir auf die Proliferation

Im folgenden Text sind die Mittelwerte (X_m) und Standardabweichungen (sd_{n-1}) aus jeweils drei durchgeführten Versuchen in Prozent angegeben. Vom Mittelwert der gemessenen Zellzahlen der „Kontrolle“ (Zellzahl 6 Tage nach der Aussaat) wurde der Mittelwert der Zellzahl der „24 h-Kontrolle“ (Zellzahl 24 h nach der Aussaat) subtrahiert und gleich 100 % (= K_{100}) gesetzt. Von diesem errechneten Wert K_{100} aus, wurden die einzelnen, mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ganciclovir errechneten Mittelwerte, nachdem auch hier der Mittelwert der „24 h-Kontrolle“ subtrahiert wurde, prozentual ermittelt (x %). Dabei wurde der Mittelwert der „Kontrolle“ gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der mit verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir behandelten Zellen in Prozent von diesem Wert aus berechnet.

3.2.1. HUVEC

(Vgl. Abb. 14)

Der Mittelwert bei Zugabe von 0,05 µg/ml Ganciclovir lag mit 144,8 % ± 25,6 % deutlich über dem der „Kontrolle“. Ebenfalls höhere Mittelwerte ergaben sich bei Zugabe der Konzentrationen von 0,5 µg/ml Ganciclovir mit 111,3 % ± 14,7 % sowie bei Zugabe der Konzentrationen von 5 µg/ml Ganciclovir mit 102,0 % ± 17,2 %. Im Vergleich zur „Kontrolle“ zeichnete sich somit bei Zugabe von 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml Ganciclovir eine tendenzielle Zunahme der Proliferation ab, welche das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ jedoch verfehlte. Eine deutliche Proliferationshemmung konnte nach Inkubation mit 50 µg/ml Ganciclovir festgestellt werden. Der Mittelwert lag bei 25,5 % ± 23,6 %. Die Proliferation wurde mit $p < 0,05$ signifikant gehemmt. Eine weitere Zunahme der Hemmung zeigte sich bei Verwendung von 500 µg/ml Ganciclovir. Der Mittelwert betrug hier 10,7 % ± 18,6 %. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,01$ signifikant. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf 5000 µg/ml fiel der Mittelwert auf 0 % ± 0 % ab. Dieses Ergebnis war mit $p < 0,001$ signifikant.

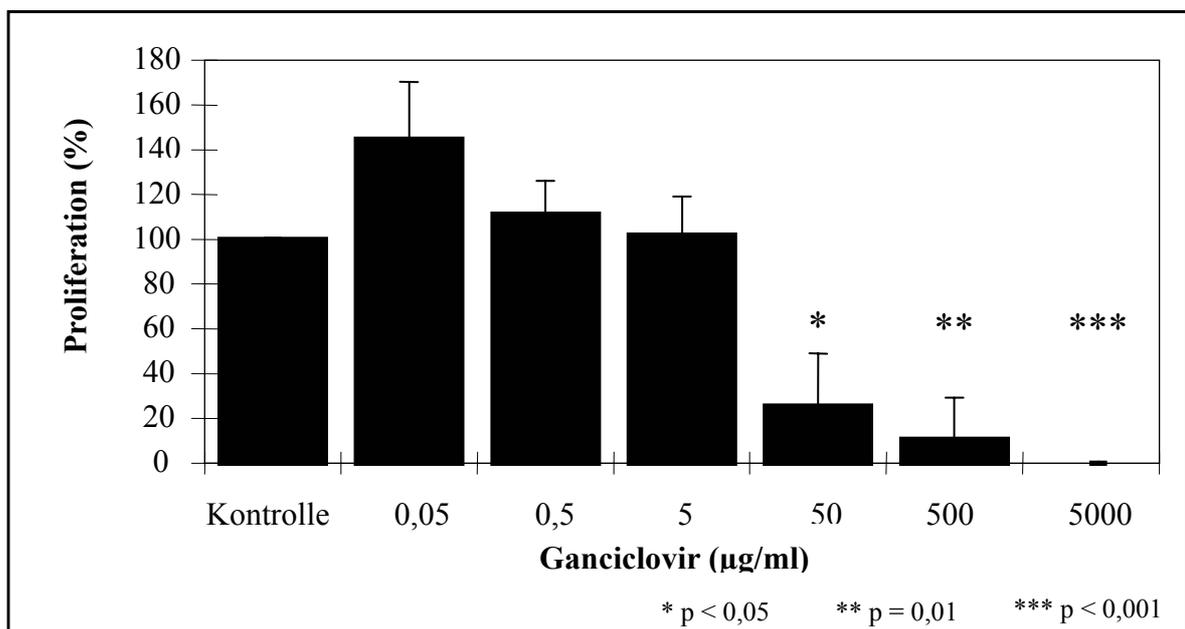


Abb. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation in Prozent aus jeweils drei Versuchen bei HUVEC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.2.2. HCAEC

(Vgl. Abb. 15)

Wurden die HCAEC mit 0,05 µg/ml Ganciclovir inkubiert, konnte gegenüber der „Kontrolle“ eine Proliferationszunahme mit einem Mittelwert von 122,0 % ± 9,2 % protokolliert werden. Im paired-t-test ergab sich jedoch ein nicht signifikantes Ergebnis. Bei Zugabe von 0,5 µg/ml Ganciclovir zeigte sich mit einem Mittelwert von 116,5 % ± 17,5 % im Vergleich zur „Kontrolle“ ebenfalls eine Zunahme der Proliferation, die jedoch geringer als die der nächst kleineren Konzentration (0,05 µg/ml Ganciclovir) ausfiel. Auch diese Zunahme der Proliferation war statistisch nicht signifikant. Bei der nächst höheren Konzentration (5 µg/ml Ganciclovir) sank der Mittelwert etwas ab und lag mit dem Wert von 91,7 % ± 25,1 % unter dem Mittelwert der „Kontrolle“. Erneut zeigte sich ein nicht signifikantes Ergebnis. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf 50 µg/ml fiel der Mittelwert auf 50,4 % ± 16,0 %. Im paired-t-test ergab sich für diese Konzentration ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,05$. Bei der Versuchsdurchführung mit einer Ganciclovir-konzentration von 500 µg/ml fiel der Mittelwert der Proliferation weiter auf 4,1 % ± 4,6 %. Auch dieses Ergebnis war im paired-t-test mit $p < 0,001$ statistisch signifikant. Wurden die HCAEC mit 5000 µg/ml Ganciclovir inkubiert, fiel die Proliferation auf einen Mittelwert von 0 % ± 0 % ab. Es ergab sich im paired-t-test ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$).

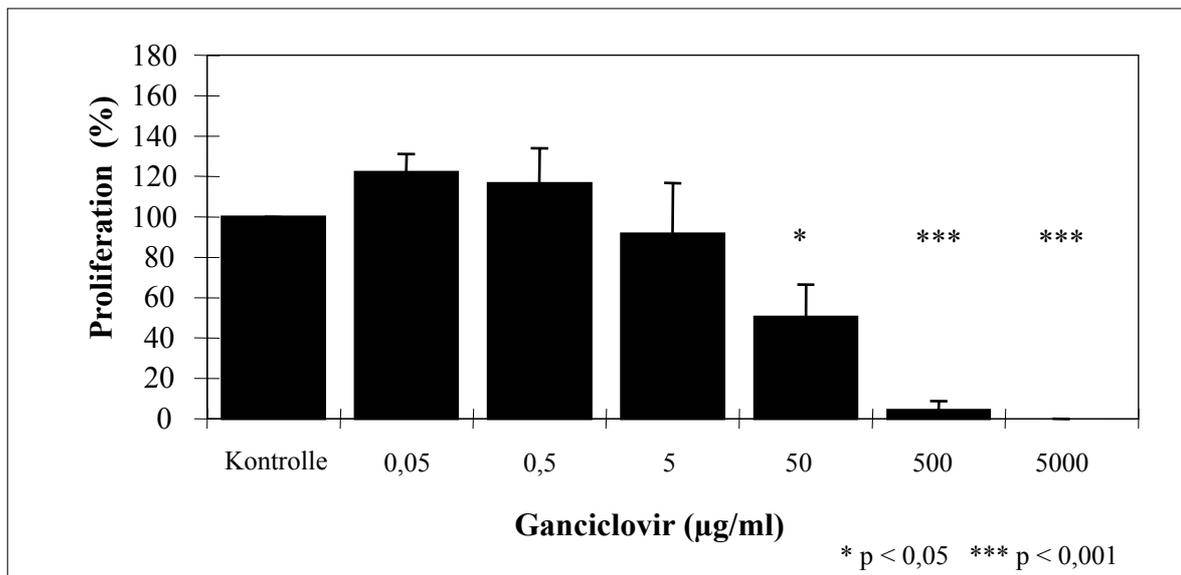


Abb. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation in Prozent aus jeweils drei Versuchen bei HCAEC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.2.3. HCMSMC

(Vgl. Abb. 16)

Im Gegensatz zur „Kontrolle“ lässt sich auch bei Verwendung dieser Zellart eine tendenzielle Zunahme der Proliferation bei Zugabe der Ganciclovirkonzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml beobachten. Der Mittelwert der Proliferation lag bei der erstgenannten Konzentration bei 116,6 % ± 25,0 %, bei der zweitgenannten Konzentration bei 117,9 % ± 26,0 % und bei der zuletzt genannten Konzentration bei 111,4 % ± 24,0 %. Im paired-t-test ergab sich jedoch für keine dieser Ganciclovirkonzentrationen ein signifikantes Ergebnis. Eine Abnahme der Proliferation zeigte sich unter Inkubation mit 50 µg/ml Ganciclovir mit einem Mittelwert von 83,3 % ± 28,4 %. Das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde jedoch auch hier nicht erreicht. Steigerte man die Konzentration an Ganciclovir auf 500 µg/ml fiel der Mittelwert der Proliferation auf 58,2 % ± 8,3 %. Mit Hilfe des paired-t-tests konnte für diese Konzentration ein signifikantes Ergebnis mit $p = 0,01$ ermittelt werden. Bei der Versuchsdurchführung mit einer Konzentration von 5000 µg/ml Ganciclovir sank die Proliferation auf einen Mittelwert von 0 % ± 0 % ab. Auch diesen Ergebnis war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

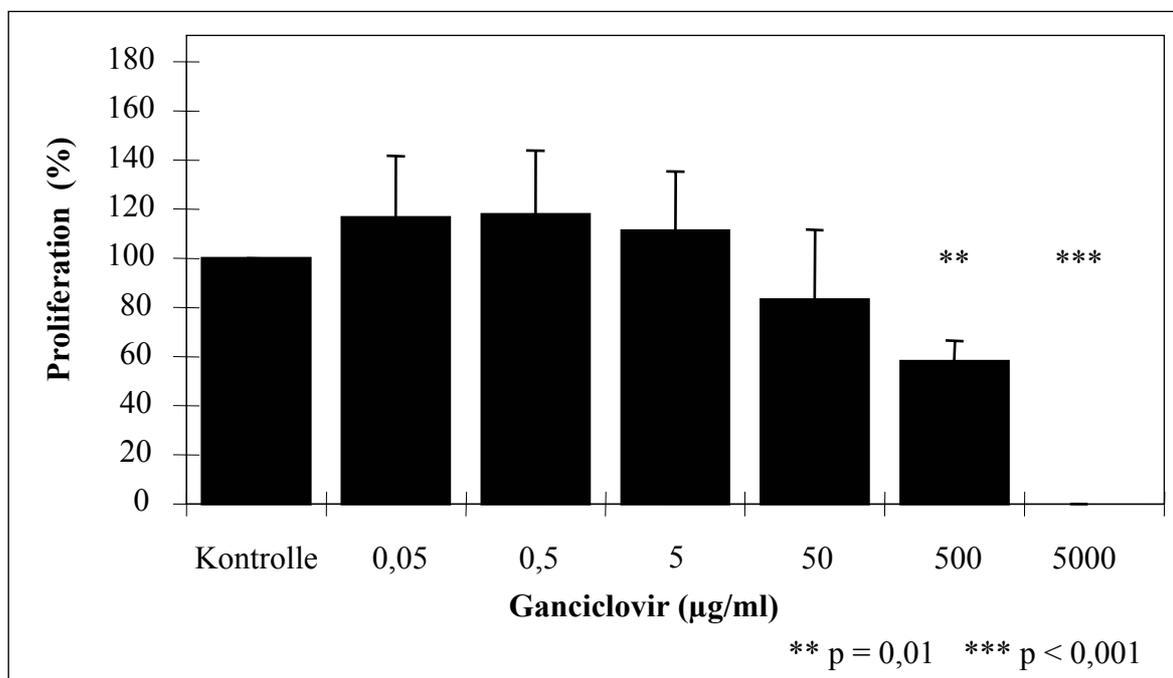


Abb. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation in Prozent aus jeweils drei Versuchen bei HCAEC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.2.4. Proliferation der HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Ganciclovirinkubation im Vergleich

(Vgl. Abb. 17)

Bei allen drei verwendeten Zellarten ist eine tendenzielle Proliferationszunahme unter Verwendung der Ganciclovirkonzentrationen von 0,05 µg/ml sowie 0,5 µg/ml zu beobachten. Das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wird jedoch in keinem Fall erreicht. Bei Inkubation mit 5 µg/ml Ganciclovir zeichnet sich für HUVEC sowie HCMSMC ebenfalls eine tendenzielle Proliferationszunahme ab. Allerdings ergab sich im paired-t-test bei beiden Zellarten auch für diese Konzentration kein statistisch signifikantes Resultat. Im Gegensatz dazu kann bei Einsatz von HCAEC, unter Verwendung derselben Ganciclovirkonzentration, eine – wenn auch statistisch unsignifikante - Proliferationsabnahme beobachtet werden. Steigerte man die Ganciclovirkonzentration auf 50 µg/ml, sanken die Proliferationsmittelwerte bei allen drei Zellarten unter den der „Kontrolle“. Signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ konnten bei den HUVEC (SI/MPL = 5,55) und bei den HCAEC (SI/MPL = 5,55) protokolliert werden. Die Versuchsdurchführung mit 500 µg/ml Ganciclovir führte bei jeder verwendeten Zellart zu einer weiteren Abnahme der Proliferation. Bei Verwendung von HUVEC (SI/MPL = 55,5) sowie bei Verwendung von HCMSMC (SI/MPL = 55,5) ließen sich mittels paired-t-test signifikante Ergebnisse mit $p = 0,01$ bzw. $p < 0,01$ errechnen. Selbiges gilt für HCAEC (SI/MPL = 55,5; $p < 0,001$). Bei Verwendung von 5000 µg/ml Ganciclovir wiesen die drei im Versuch eingesetzten Zellarten keinerlei Proliferation auf. Entsprechend resultierten erneut statistisch signifikante Ergebnisse (SI/MPL = 555; $p < 0,001$).

Eine graphische Übersicht der Mittelwerte der ICAM-1-Expression erfolgt umseitig in Abbildung 17.

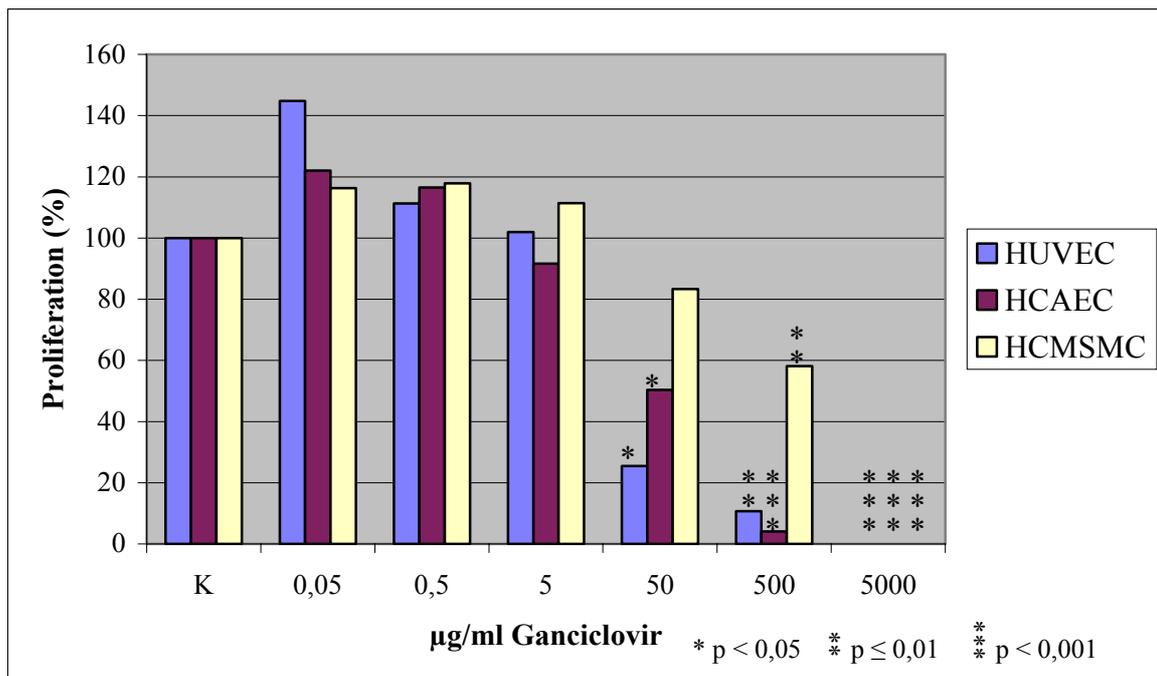


Abb. 17: Mittelwerte aus drei Versuchen in Prozent der Proliferation bei HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir im Vergleich.

Blau: HUVEC, rot: HCAEC, gelb: HCMSMC.

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; K: Kontrolle

3.3. Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Ganciclovir

Mit Hilfe des CellTiter-Glo™ wurden die so genannten Relative light units (RLU) gemessen. Anhand dieser Messwerte konnte anschließend die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Im folgenden Text sind die Mittelwerte (X_m) und Standardabweichungen (sd_{n-1}) aus den jeweils 12 Messwerten in Prozent angegeben.

3.3.1 HUVEC

(Vgl. Abb. 18)

Im Vergleich zur Kontrollmessung wiesen die mit Ganciclovir behandelten Zellen jeweils niedrigere Vitalitätsmittelwerte auf. Bei Inkubation mit 0,05 µg/ml Ganciclovir lag der Mittelwert bei 93,2 % ± 12,6 %. Im paired-t-test ergab sich jedoch kein signifikantes Ergebnis. Bei der nächst höheren Ganciclovirkonzentration von 0,5 µg/ml lag der Vitalitätsmittelwert mit 96,5 % ± 4,7 % erneut unter dem der Kontrollmessung, jedoch über dem, der bei Zugabe von 0,05 µg/ml Ganciclovir gemessen wurde. Das geforderte Signifikanz-

niveau von 5 % wurde auch in diesem Fall nicht erreicht. Bei Steigerung der Ganciclovir-konzentration auf 5 µg/ml resultierte ein Vitalitätsmittelwert von 93,1 % ± 3,93 %. Dieses Ergebnis war mit $p = 0,001$ statistisch signifikant. Zu einer weiteren Abnahme der Vitalität kam es durch Zugabe von 50 µg/ml Ganciclovir. Der Mittelwert lag hier bei 75,7 % ± 5,1 % und erwies sich ebenfalls als signifikant ($p < 0,001$). Unter Verwendung von 500 µg/ml Ganciclovir wurde ein Vitalitätsmittelwert von 46,8 % ± 10,5 % erreicht. Im paired-t-test ließ sich bei $p < 0,001$ erneut ein signifikantes Ergebnis konstatieren. Der kleinste Vitalitätsmittelwert wurde mit 4,6 % ± 28,4 % unter Zugabe von 5000 µg/ml Ganciclovir errechnet. Dieses Ergebnis war mit $p < 0,001$ entsprechend erneut statistisch signifikant.

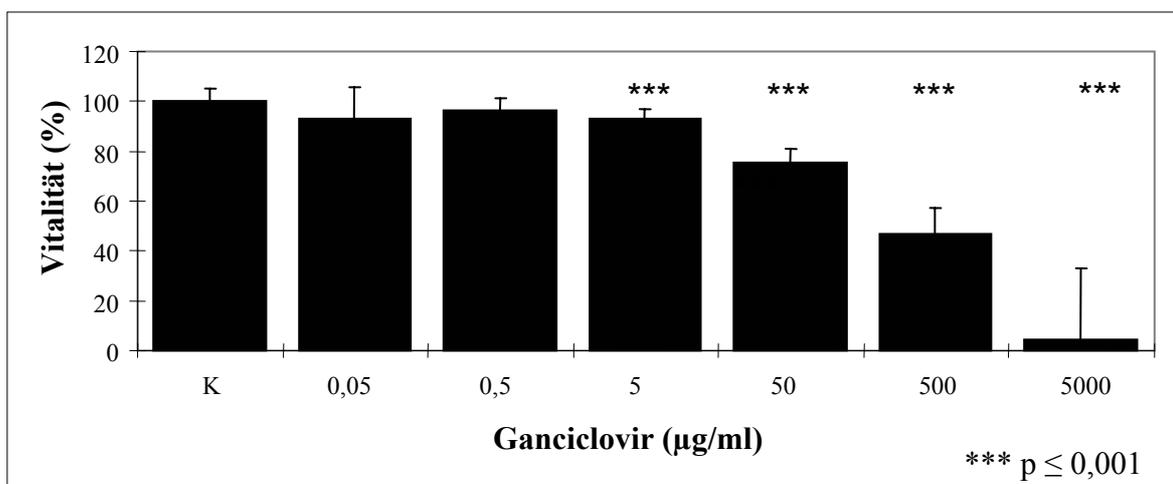


Abb. 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Vitalität in Prozent bei HUVEC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.3.2. HCAEC

(Vgl. Abb. 19)

Der Vitalitätsmittelwert stieg bei Inkubation mit 0,05 µg/ml Ganciclovir auf einen Wert von 127,6 % ± 11,9 % an. Unter Verwendung des paired-t-tests errechnete sich für diesen Wert ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). Ein weiterer Anstieg des Vitalitätsmittelwertes auf 137,4 % ± 11,9 % wurde durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ganciclovir erreicht. Dieses Ergebnis war signifikant mit $p < 0,01$. Bei Inkubation mit 5 µg/ml Ganciclovir sank der Vitalitätsmittelwert auf 121,7 % ± 14,3 % etwas ab, lag damit aber über dem der Kontrollmessung. Das Ergebnis war signifikant mit $p < 0,05$. Unter Verwendung von 50 µg/ml Ganciclovir stieg der Vitalitätsmittelwert geringfügig auf einen Wert von 122,7 % ± 12,4

%. Auch dieser Wert war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Ein im Vergleich zur Kontrollmessung geringerer Vitalitätsmittelwert wurde bei Inkubation mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir erreicht. Der Mittelwert lag in diesem Fall bei $54,0 \% \pm 14,49 \%$. Auch dieses Ergebnis war mit $p = 0,001$ signifikant. Steigerte man die Ganciclovirkonzentration auf 5000 $\mu\text{g/ml}$, sank der Vitalitätsmittelwert auf im paired-t-test erneut statistisch signifikante $9,8 \% \pm 18,7 \%$ ($p < 0,001$).

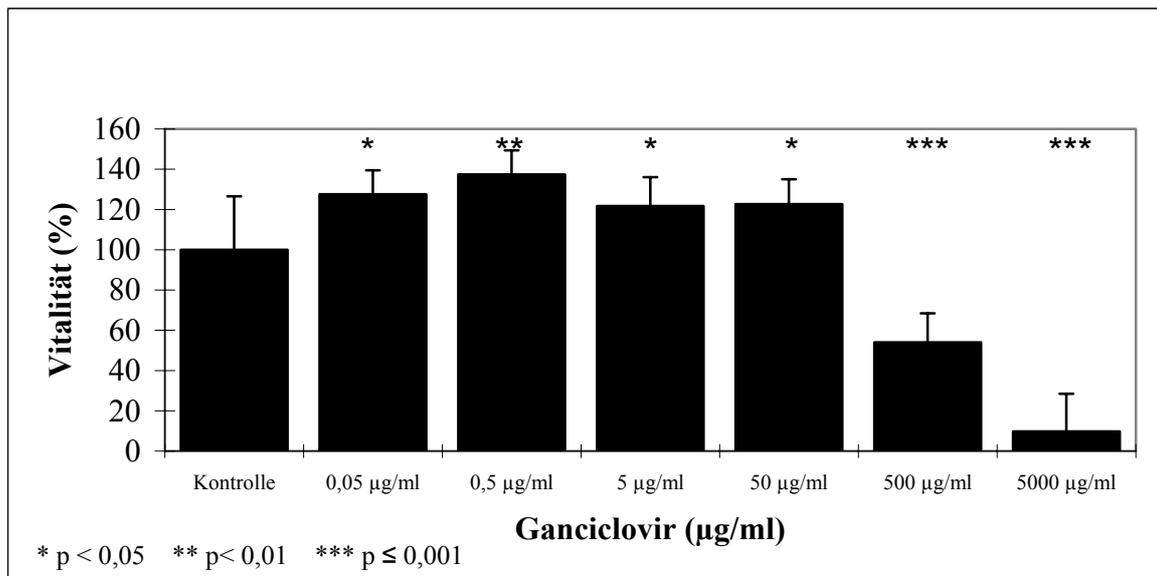


Abb. 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Vitalität in Prozent bei HCAEC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.3.3. HCMSMC

(Vgl. Abb. 20)

Wurden die Zellen mit 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir inkubiert, stieg der Vitalitätsmittelwert auf $105,6 \% \pm 28,3 \%$ an. Bei Verwendung von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir ergab sich ein nur geringfügig kleinerer Vitalitätsmittelwert von $114,2 \% \pm 9,1 \%$. Diese beiden Ergebnisse erreichten das geforderte Signifikanzniveau von 5 % jedoch nicht. Steigerte man die Ganciclovirkonzentration auf 5 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir, fiel der Vitalitätsmittelwert mit $93,4 \% \pm 9,09 \%$ unter den der Kontrollmessung. Im paired-t-test ergab sich auch für diese Konzentration kein signifikantes Ergebnis. Der Vitalitätsmittelwert stieg bei Inkubation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir auf $104,6 \% \pm 13,8 \%$. Auch dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz. Unter Verwendung von 500 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir fiel der Vitalitätsmittelwert auf $84,2 \% \pm 12,3 \%$. Das geforderte Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde auch in diesem Fall

nicht erreicht. Bei Zugabe der höchsten Ganciclovirkonzentration (5000 $\mu\text{g/ml}$) fiel der Vitalitätsmittelwert auf $11,5 \% \pm 21,6 \%$. Dieses Resultat war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

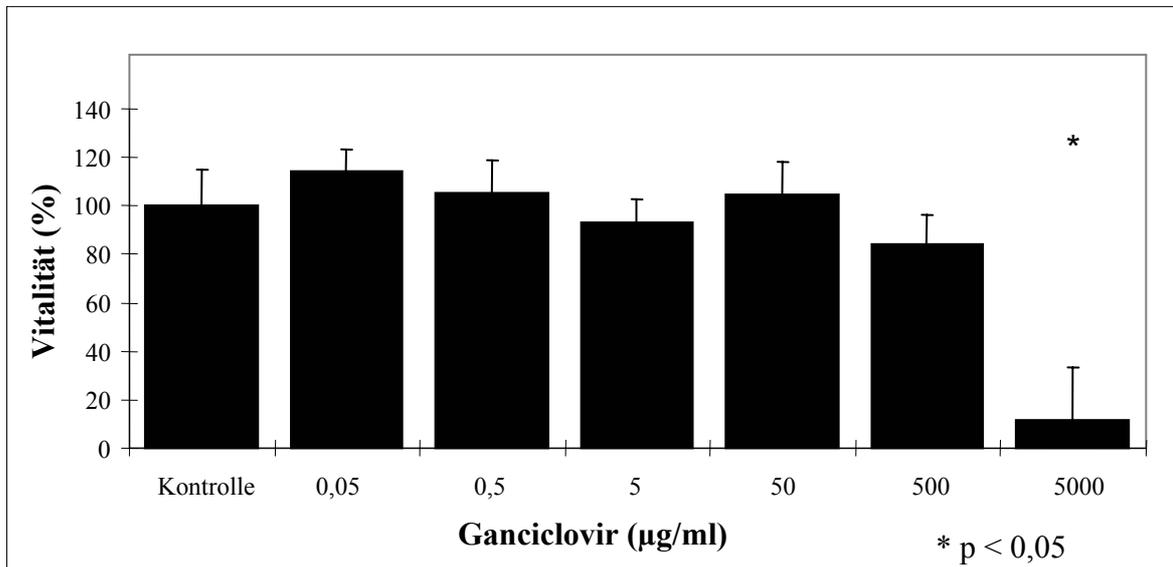


Abb. 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Vitalität in Prozent bei HCMSMC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir. Signifikante Versuchsergebnisse sind entsprechend hervorgehoben.

HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells; p: Irrtumswahrscheinlichkeit

3.3.4. Vitalität der HUVEC, HCAEC und HCMAMC im Vergleich

(Vgl. Abb. 21)

Bei Verwendung der HUVEC lagen alle Vitalitätsmittelwerte für die im Versuch eingesetzten Ganciclovirkonzentrationen unter dem der Kontrollmessung. Die Konzentrationen 0,05 $\mu\text{g/ml}$ sowie 0,5 $\mu\text{g/ml}$ erbrachten jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Demgegenüber konnten signifikante Ergebnisse mit $p \leq 0,001$ für Ganciclovirkonzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ und 5000 $\mu\text{g/ml}$ protokolliert werden. Verglichen mit den HUVEC wiesen bei Verwendung der HCAEC lediglich die Ganciclovirkonzentrationen 500 $\mu\text{g/ml}$ und 5000 $\mu\text{g/ml}$ geringere Vitalitätsmittelwerte als die Kontrollmessung auf. Im paired-t-test errechneten sich für diese Konzentrationen signifikante Ergebnisse ($p \leq 0,001$). Mit $p < 0,05$ signifikant höhere Vitalitätsmittelwerte resultierten unter Verwendung von 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir. Bei Verwendung von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ganciclovir war die Vitalitätsmittelwerte auf 1%-Niveau signifikant ($p < 0,01$). Neben den Ganciclovirkonzentrationen von 500 $\mu\text{g/ml}$ und 5000 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich bei Verwendung

der HCMSMC auch bei 5 µg/ml ein im Vergleich zur Kontrollmessung geringerer Vitalitätsmittelwert. Das festgelegte Signifikanzniveau von 5 % wurde jedoch nur bei Verwendung von 5000 µg/ml Ganciclovir erreicht.

Eine graphische Übersicht der Mittelwerte der Vitalitätsmessung erfolgt in Abbildung 21.

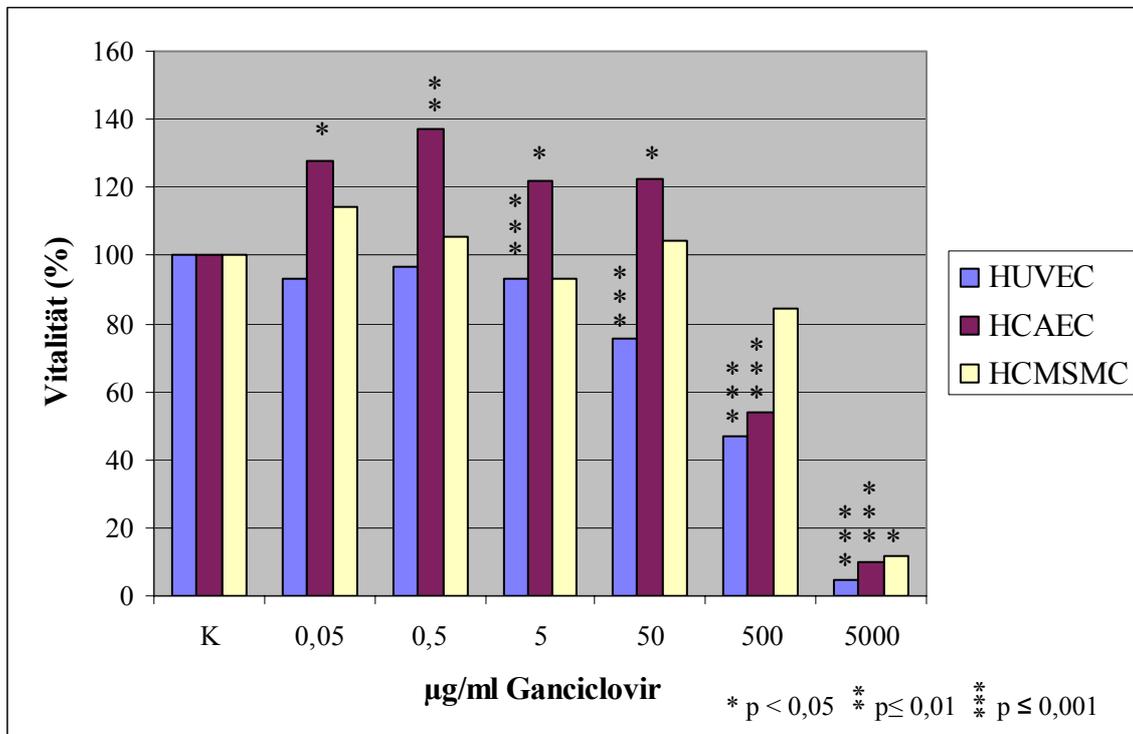


Abb. 21: Mittelwerte aus 12 Versuchswerten in Prozent der Vitalität bei HUVEC, HCAEC und HCMSMC nach Inkubation mit - bzw. ohne Ganciclovir im Vergleich.

Blau: HUVEC, rot: HCAEC, gelb: HCMSMC.

HCAEC: human coronary artery endothelial cells; HCMSMC: human coronary media smooth muscle cells;

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; K: Kontrolle

4. Diskussion

Die Rolle einer HCMV-Infektion sowie der Einfluss einer Ganciclovirtherapie auf die Entstehung von Restenosierungen sind bislang ungeklärt. Da das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und die Proliferation der Gefäßwandzellen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Restenosen sind (Forte et al. 2007, Voisard et al. 2007), wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt des bisher zur Prophylaxe und Therapie von HCMV-Infektionen eingesetzten Virostatikums Ganciclovir auf die ICAM-1-Expression und Proliferation humaner koronarer Gefäßwandzellen (HCMSMC und HCAEC) und HUVEC untersucht.

Ergänzend wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Vitalität der drei Zellreihen quantitativ erfasst.

Da *in vitro* signifikante inhibitorische Effekte auf die ICAM-1-Expression bzw. die Proliferation häufig erst mit Substanzdosen erreicht werden können, die *in vivo*, bei Einhaltung der zugelassenen Höchstdosen dieser Medikamente, weit über dem maximal erreichbaren Plasmaspiegel liegen würden, wird zur Einordnung der Zweckmäßigkeit *in vitro* festgestellter signifikanter Hemmkonzentrationen die so genannte SI/MPL-Ratio (significant inhibition/maximal plasma level) berechnet. Dieser Quotient setzt signifikante Hemmeffekte *in vitro* ins Verhältnis zur maximal erreichbaren Plasmakonzentration einer Testsubstanz.

Substanzen mit einer SI/MPL-Ratio > 1 repräsentieren entsprechend Medikamente mit einem antiproliferativen und/oder ICAM-1-expressionshemmenden Potential, das durch eine systemische Applikation nicht erreicht werden kann, weshalb potentiell nur die Option einer lokalen Hochdosisapplikation dieser Stoffe verbleibt. Substanzen mit einer SI/MPL-Ratio < 1 repräsentieren Medikamente mit einem Hemmpotential, das sowohl nach lokaler als auch nach systemischer Applikation erreicht werden kann (Voisard et al. 2004).

4.1. Testsubstanz Ganciclovir

Ganciclovir (auch DHPG oder BW B759U genannt) ist ein synthetisches, zyklisches Analogon des endogenen Purin-Nukleosids Guanosin, das die Replikation von Herpesviren *in vitro* und *in vivo* hemmt (Scott et al. 2004). Das Spektrum empfindlicher Humanviren umfasst verschiedene DNA-Viren wie HCMV, Herpes-simplex-Virus-1 und -2, die humanen

Herpesviren 6, 7 und 8, das Epstein-Barr-Virus sowie Varicella-Zoster-Virus und Hepatitis-B-Virus.

Intrazellulär wird das Prodrug Ganciclovir zunächst in mehreren Schritten in die biologisch aktive Wirksubstanz umgewandelt. Dabei erfolgt zuerst eine Monophosphorylierung, entweder durch viral kodierte Thymidinkinasen bei infizierten Zellen oder - wie im konkreten Fall einer HCMV-Infektion - durch die viruseigene Proteinkinase pUL 97. Die weitere Phosphorylierung erfolgt durch zelluläre Kinasen. Das so entstehende Ganciclovir-Triphosphat, wird im Zellinnern nur langsam abgebaut (Mc Gavin und Goa 2001, Noble und Faulds 1998, Sia und Patel 2000). Eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme in infizierten Zellen bewirkt eine etwa zehnfach höhere Ganciclovir-Triphosphat-Konzentration in virusinfizierten Zellen verglichen mit nichtinfizierten Zellen (Noble und Faulds 1998).

Die virostatistische Aktivität von Ganciclovir basiert auf einer, zwei Mechanismen folgenden Hemmung der viralen DNA-Synthese. Zum einen hemmt Ganciclovir-Triphosphat kompetitiv den Einbau des physiologischen Nukleotids Desoxyguanosintriphosphat in die virale DNA. Zum anderen findet das als Antimetabolit fungierende Ganciclovir-Triphosphat selbst bei der DNA-Replikation Verwendung. Durch seinen Einbau in eine wachsende DNA-Kette, erfolgt entweder ein Kettenabbruch des Synthesestrangs oder zumindest eine erhebliche Verlangsamung der Elongation durch Hemmung der viralen DNA-Polymerase, was letztendlich zu einer Inhibition der DNA-Replikation führt (Sia und Patel 2000).

Da diese Prozesse bevorzugt, aber nicht völlig ausschließlich, in virusinfizierten Zellen ablaufen, wird neben der Virusvermehrung in infizierten Zellen auch die Zellvermehrung gesunder Zellen inhibiert (Noble und Faulds 1998).

4.2. Effekt von Ganciclovir auf die ICAM-1-Expression

Nach PTCA sowie Stentimplantation ist ein signifikanter Anstieg des TNF- α -Plasmaspiegels zu messen (Schulze et al. 2002). TNF- α wurde bereits eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Restenosen zugeordnet (Monraats et al. 2005, Rajashekhar et al. 2006). Der Einfluss des Zytokins auf die ICAM-1-Expression ist belegt (Miller et al. 2005, Sawa et al. 2007, Voisard et al. 2007). Deshalb wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen vor Messung der ICAM-1-Expression mit TNF- α stimuliert (20 ng/ml, 6 h).

Dabei konnte bei allen drei verwendeten Zellarten eine Zunahme der ICAM-1-Expression nach TNF- α Gabe beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten einer von Voisard et al. (1998) durchgeführten Studie, in der eine zeit- und dosisabhängige

Stimulation der ICAM-1-Expression bei HUVEC, HCAEC und HCMSMC durch TNF- α beobachtet wurde. Analog dieser Publikation fiel auch in der vorliegenden Arbeit die relative Steigerung der ICAM-1-Expression nach TNF- α -Stimulation bei HCMSMC wesentlich geringer aus, als bei den HUVEC und HCAEC. Der Grund hierfür könnte eine bereits hohe basale ICAM-1-Expression bei HCMSMC sein (Voisard et al. 1998). Eine weitere mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen bezüglich der relativen Expressionssteigerung könnte in der Regulation der ICAM-1-Expression durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B begründet liegen.

NF- κ B liegt in einem inaktiven Zustand, gebunden an ein Hemmprotein (I κ B), im Zytosol der Zelle vor. Proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , können zur Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) führen. Dieser Komplex besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β , welche Homo- und Heterodimere bilden können sowie der Regulator-Untereinheit NEMO (NF- κ B essential modulator, auch IKK γ genannt), die für eine regelrechte Organisation dieses Komplexes verantwortlich zu sein scheint (Ghosh et al. 2002). Durch die Phosphorylierung von I κ B kommt es zur Polyubiquitinierung mittels einer spezifischen Ubiquitin-Ligase und dem nachfolgenden Abbau durch das 26S Proteasom. Durch den Abbau von I κ B wird aktiviertes NF- κ B freigesetzt und in den Kern transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert (D'Acquisto et al. 2002, Ghosh et al. 2002, Karin und Ben-Neriah 2000). Durch Zugabe von I κ B konnten Lockeyer et al. (1998) und Gawaz et al. (1998) eine Hemmung der ICAM-1-Expression bei HUVEC induzieren. Obwohl in der Literatur die Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen beschrieben wird (Dagia und Goetz 2003), ist diese für glatte Muskelzellen nur vereinzelt dokumentiert.

Voisard et al. (2001) induzierten durch kombinierte 18-stündige Zellinkubation mit den Antisense-Oligonukleotiden RelA p65 und NF- κ BI p50 - sowie zusätzliche TNF- α -Stimulation im letzten Drittel dieses Zeitraums - eine dosisabhängige Hemmung der ICAM-1-Expression bei HUVEC und HCAEC, wohingegen sich bei HCMSMC kein Effekt zeigte. Damit scheinen Unterschiede in der NF- κ B regulierten ICAM-1-Expression zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen zu bestehen. Es wird angenommen, dass die Aktivierung von ICAM-1 bei HCMSMC zumindest teilweise über andere Signalwege abläuft und wahrscheinlich durch weitere Mitglieder der NF- κ B-Familie vermittelt wird (Siebenlist et al. 1994). Durch Arbeiten von Lindner (1998), der die Rolle des NF- κ B-Systems nach Ballonverletzung von Carotiden der Ratte untersuchte, wird diese Hypothese unter-

stützt. Er fand bei glatten Muskelzellen der Ratte nach Angioplastie neben erhöhten NF- κ B1 p50- und RelA p65-Spiegeln auch erhöhte Spiegel von NF- κ B2 p52, c-Rel und RelB. In den in der vorliegenden Studie mit dem Virostatikum Ganciclovir durchgeführten Versuchsreihen wurde unter Verwendung der höchsten getesteten Ganciclovirkonzentration von 5000 μ g/ml (SI/MPL-Ratio = 555) eine geringe, aber statistisch signifikante Hemmung der ICAM-1-Expression bei allen drei Zellreihen induziert.

Die zur Inhibition der ICAM-1-Expression erforderliche Mindestkonzentration an Ganciclovir war bei HUVEC mit 0,05 μ g/ml am niedrigsten (SI/MPL-Ratio = 0,0055). Zur Hemmung der ICAM-1-Expression bei HCMSMC war dagegen eine 10^3 -fach höhere Ganciclovirdosis erforderlich (SI/MPL-Ratio = 5,55). Die ICAM-1-Expression der HCAEC erwies sich Ganciclovir gegenüber als am wenigsten sensibel. Die zur Inhibition notwendige Konzentration lag um den Faktor 10^5 höher als bei HUVEC (SI/MPL-Ratio = 555).

Die Einordnung dieser Ergebnisse gestaltet sich jedoch schwierig, da die bisherige Datenlage über die Wirkung von Ganciclovir auf die ICAM-1-Expression sehr begrenzt ist.

In einer *in vitro* Studie von Craigen und Grundy (1996) war kein Einfluss von vergleichsweise geringen Dosen Ganciclovir (max. 100 μ g/ml) auf die ICAM-1-Expression nachweisbar. Allerdings ergeben sich bezüglich dieser Arbeit nur eingeschränkte Vergleichsmöglichkeiten, da in den Versuchsreihen von Craigen und Grundy (1996) Lungenfibroblasten anstelle koronarer Gefäßwandzellen Verwendung fanden und die initiale Stimulation der ICAM-1-Expression mit TNF- α fehlte.

Darüber hinaus liegen Daten von *in vitro* Experimenten mit HCMV-infizierten Zellen vor, in denen konsistent keine Hemmung der ICAM-1-Expression nach Ganciclovirinkubation verzeichnet wurde. Allerdings müssen die Eigenheiten des HCMV-Replikationszyklus als ursächlich für diese Differenzen angesehen werden.

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass das HCMV-Virus bei seropositiven Personen bis zu seiner Reaktivierung vor allem in Endothelzellen, mononukleären Zellen sowie in hämatopoetischen Stammzellen latent verbleibt. Im Rahmen der Hämatopoese kann es so auf eine kleine Subpopulation reifender Monozytenvorläufer übertragen werden. Wenn infolge einer Endothelläsion die latent infizierten reifen Monozyten in die Gefäßwand einwandern, kommt es durch ihren Kontakt mit Endothel-, glatten Muskelzellen oder oxidiertem low density Lipoprotein (LDL) nicht nur zu ihrer Transformation in Makrophagen, sondern auch zur Reaktivierung und Replikation des HCMV nach Aktivierung des viralen major immediate early Promotor (MIEP), welcher die immediate early (IE)-Genfreisetzung reguliert (Dengler et al. 2000, Fish et al. 1995, Guetta et al. 1997). Nach gegenwärtiger

Vorstellung erfolgt die Aktivierung des viralen MIE-Promotors durch den humanen Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher zuvor seinerseits durch infektionsbedingt erhöhte Konzentrationen an reactive oxygen species (ROS) aktiviert wurde (Speir et al. 1998).

Der Replikationszyklus des HCMV ist nach der Aktivierung von IE-Genen durch Expression von frühen (E = early)- sowie späten (L = late)-Genen charakterisiert (Scholz et al. 2001). Eine erhöhte ICAM-1-Expression ist durch die IE-Proteine IE 1 und IE 2, unabhängig von interzellulären Zytokinen, belegt (Craigen und Grundy 1996, Valantine 2004).

Dass in bisherigen Studien nach Zugabe von Ganciclovir zu HCMV-infizierten Zellkulturen keine Reduktion der infektionsinduzierten ICAM-1-Expression beobachtet werden konnte - bzw. im Gegenteil sogar erhöhte ICAM-1-Expressionsraten gemessen wurden - liegt darin begründet, dass die antivirale Aktivität von Ganciclovir erst in späten Stadien der Virusreplikation zum Tragen kommt (Craigen und Grundy 1996, Dengler et al. 2000, Prösch et al. 2003, Scholz et al. 2001). Die initial stattfindende Bildung der HCMV-IE-Antigene und damit die Induktion der ICAM-1-Expression wird durch Ganciclovir jedoch nicht gehemmt (Cinatl et al. 2000, Dengler et al. 2000, Nordoy et al. 2000, Scholz et al. 2001). Des Weiteren scheint ein IL-1-vermittelter parakriner Mechanismus zu existieren, durch den die up-Regulation von Adhäsionsmolekülen auch auf nicht infizierten „bystander“-Zellen erfolgt (Dengler et al. 2000). Entsprechend besteht ein Widerspruch zwischen den Ergebnissen unserer Arbeit und bereits publiziertem in vitro Daten. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass die hier vorgestellten Ergebnisse nicht an HCMV-infizierten Zellen gewonnen wurden, was die Vergleichbarkeit der Daten erheblich reduziert.

Parallelen bestehen jedoch zu einer kontrollierten klinischen Studie an HCMV-erkrankten Nierentransplantatempfängern, bei denen sich eine signifikante Verminderung der Plasmakonzentration an freiem ICAM-1 (sICAM-1) nach 14-tägiger systemischer Applikation von Ganciclovir (5 mg/kg Körpergewicht) nachweisen ließ (Nordoy et al. 2000).

4.3. Effekt von Ganciclovir auf die Proliferation

Mit dieser Arbeit wird dargestellt, dass Ganciclovir in hohen Konzentrationen die Proliferation aller drei untersuchter Zellreihen stark hemmt. Ein antiproliferativer Effekt zeigte sich bei HUVEC und HCAEC dosisabhängig ab einer Ganciclovirkonzentration von 50 μ g/ml (SI/MPL-Ratio = 5,55). Eine Proliferationshemmung der HCMSMC erfolgte erst ab einer um den Faktor 10 höheren Ganciclovirkonzentration (SI/MPL-Ratio = 55,5).

Aufgrund des Wirkmechanismus von Ganciclovir sind diese Ergebnisse nicht überraschend. Wie bereits erwähnt, wird Ganciclovir auch in nicht infizierten, gesunden Zellen

durch Phosphorylierung in das biologisch aktive Triphosphat überführt und als Antimetabolit bei der DNA-Replikation verwendet, was letzten Endes zur Hemmung der humanen DNA-Polymerase und damit einer Blockade der DNA-Synthese in der S-Phase führt.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte eine von Lemstrom et al. (1994) sowohl in vivo als auch in vitro durchgeführten Studie, bei welcher eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation von Entzündungszellen in der Adventitia von Aortentransplantaten sowie eine Proliferationshemmung glatter Muskelzellen, bei mit dem Rattenzytomegalievirus (RCMV) infizierten Versuchstieren, nach prophylaktischer Ganciclovirgabe demonstriert wurde. Veränderungen der Plasmakonzentrationen proliferationsrelevanter Proteine wie platelet-derived growth factor (PDGF), basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und transforming growth factor- β (TGF- β) waren dabei nicht zu verzeichnen. Zur weiteren Differenzierung dieser Befunde wurde die in vitro-Wirkung von Ganciclovir auf Zellkulturen nicht infizierter, glatter Muskelzellen von Ratten untersucht. Ganciclovir hemmte - gemessen am Grad der DNA-Synthese - bereits in Dosen von 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ die Proliferation kultivierter glatter Muskelzellen, vom sekretorischen Phänotyp, die glatten Muskelzellen in atheromatösem Plaquematerial ähnlich sind (Thyberg et al. 1990), um ca. 50 %. Bei höheren Dosen (100 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) kam die DNA-Synthese sogar völlig zum Erliegen, wobei die Überlebensfähigkeit der Versuchszellen nicht merklich reduziert wurde. Allerdings ließen sich toxische Effekte in diesen Dosen nicht gänzlich ausschließen. Durch diese ergänzenden in vitro Versuche demonstrierten Lemstrom et al. (1994) direkt antiproliferative Effekte von Ganciclovir auf glatte Muskelzellen.

Bezüglich der Wirkung von Ganciclovir auf die Proliferation gesunder Endothelzellen liegen gegenwärtig keine Angaben vor. In der Literatur werden allerdings HCMV- (Reinhardt et al. 2005 b) und RCMV- (Lemström et al. 1995) induzierte Endothelzellproliferation und Intimaverdickungen beschrieben. Beide Prozesse lassen sich bei prophylaktischer Gabe von Ganciclovir im Tierexperiment komplett vermeiden (Lemström et al. 1997).

Aufgrund der oben beschriebenen Wirkungsweise von Ganciclovir und den hier vorgestellten Daten muss davon ausgegangen werden, dass die von Lemström et al. (1997) beobachteten Effekte hier ebenfalls nicht ausschließlich der antiviralen Wirkung der Testsubstanz zugeordnet werden können. Außerdem wäre schwer zu erklären, warum Ganciclovir zwar die (humane) DNA-Polymerase in glatten Muskelzellen hemmt, auf sich häufiger teilende und damit potentiell sensibler reagierende Endothelien aber weniger oder gar nicht antiproliferativ wirken sollte. Im Gegenteil, die hier präsentierten Daten zeigen, dass die zur Proliferationsinhibition notwendige Ganciclovirdosis bei Endothelzellen geringer ist als bei

glatten Muskelzellen. Einschränkend muss jedoch beachtet werden, dass signifikante Unterschiede zwischen den Zytomegalieviren von Menschen und Tieren bestehen (Morcarski et al. 1996, Wagner et al. 2000). Zum Beispiel unterscheiden sich die Inkubationszeiten des RCMV und des HCMV beachtlich, so dass Zeitpunkt und Dauer einer erfolgreichen prophylaktischen Ganciclovirapplikation im Tierversuch nicht auf die humane Situation übertragen werden können.

4.4. Effekt von Ganciclovir auf die Vitalität

Die nach der Ganciclovirinkubation mittels Luminometer analysierte Vitalität der einzelnen Zellreihen diente zur Erfassung des Anteils gesunder Zellen.

Es wurde dabei ein starker Vitalitätsverlust unter Verwendung der höchsten getesteten Ganciclovirkonzentration bei allen drei untersuchten Zellreihen verzeichnet. Der Einfluss von Ganciclovir auf die Zellvitalität war bei HCMSMC am geringsten. Ein signifikanter Vitalitätsverlust wurde erst unter Verwendung einer Konzentration von 5000 µg/ml beobachtet.

Demgegenüber zeigten HCAEC bereits bei Inkubation mit 0,05 µg/ml Ganciclovir eine veränderte Vitalität. Überraschenderweise nahm die Zellvitalität dieser Zellart unter Verwendung einer Ganciclovirkonzentration von 0,05 – 50 µg/ml sogar zu. Eine Abnahme der Vitalität wurde erst ab einer Ganciclovirdosis von 500 µg/ml gemessen.

Bei HUVEC induzierte bereits eine Ganciclovirinkubation mit 5 µg/ml eine Reduktion der Zellvitalität.

Mit Hilfe dieser ergänzenden Vitalitätsmesswerte sollte differenziert werden, inwieweit die gemessenen Hemmeffekte von Ganciclovir auf ICAM-1-Expression und Proliferation vitaler Zellen von substanzinduzierten Vitalitätsverlusten der untersuchten Zellreihen beeinflusst wurden. Die Gefahr einer Variablenkonfundierung und damit möglichen Fehlinterpretation der Untersuchungsdaten besteht in den Fällen, in denen signifikante Proliferations- sowie ICAM-1-Expressionshemmungen nach Ganciclovirgabe beobachtet wurden, parallel dazu aber signifikante Vitalitätsreduktionen bereits bei gleichen oder sogar niedrigeren Ganciclovirkonzentrationen nachweisbar sind.

Dies trifft beispielsweise bei allen drei Zellreihen auf die Verwendung einer Ganciclovirkonzentration von 5000 µg/ml zu. Diese Testdosis hemmte ICAM-1-Expression und Proliferation aller Zellreihen signifikant. Ein Teil dieser Effekte dürfte auf die parallel dazu auftretenden signifikanten Vitalitätsverluste zurückzuführen sein.

Analoges gilt für einzelne Zellreihen und Fragestellungen bei bereits niedrigeren Ganciclovirdosen. So wurden schon bei 50 µg/ml bei HUVEC sowie 500 µg/ml bei HCAEC und HUVEC Proliferationshemmungen dieser Zellen bei gleichzeitiger Vitalitätsreduktion erfasst. Die gleiche Situation besteht bei den HUVEC bezüglich der ICAM-1-Expression. Hier wurde bereits unter Verwendung der vergleichsweise niedrigen Dosierung von 5 µg/ml Ganciclovir eine ICAM-1-Expressionshemmung beobachtet. Allerdings dürfte auch hier die gleichzeitig gemessene Reduktion der Zellvitalität zumindest teilweise mitverantwortlich dafür sein.

Es lässt sich somit in den obigen Fällen nicht klar differenzieren, ob die erfassten Hemmefekte auf die einzelnen Zellreihen infolge einer Ganciclovirwirkung auf vitale Zellen resultieren oder dadurch bedingt sind, dass relevante Mengen apoptotischer Zellen mit untersucht wurden.

Für eine mögliche klinische Anwendung von Ganciclovir zur Restenoseprophylaxe ist eine derartige Differenzierung aber von nachrangigem Interesse, da hier allein der gewünschte potentiell antiarteriosklerotische Effekt von Bedeutung ist.

4.5. Die Bedeutung von Ganciclovir für die Prophylaxe von Restenosierungen

Aufgrund seiner toxischen Nebenwirkungen und deshalb einer in vivo maximal nutzbaren Plasmakonzentration von 9 µg/ml für Ganciclovir (Crumpacker 1996, Jung et al. 1998), ergaben sich bezüglich der ICAM-1-Expression und Proliferation für den SI/MPL-Quotienten der in humanen Koronarien vorkommenden Zellreihen HCAEC und HCMSMC jeweils Werte größer > 1. Folglich können signifikant inhibierende Effekte durch eine systemische Ganciclovirapplikation nicht erzielt werden, da die zur Hemmung von ICAM-1-Expression und Proliferation potentiell notwendigen Plasmakonzentrationen nicht erreicht werden können. Eine mögliche klinische Bedeutung kommt entsprechend lediglich einer lokalen Hochdosisapplikation von Ganciclovir zu.

Anders gestalteten sich die Ergebnisse bei den zu Vergleichszwecken mit untersuchten HUVEC. Bereits unter Verwendung der drei niedrigsten Ganciclovirkonzentrationen (0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml) ergaben sich SI/MPL-Quotienten < 1. Rein rechnerisch wäre damit eine systemische Ganciclovirapplikation bei diesen Zellen in den obigen Dosierungen möglich. Dieser Zelltyp kommt in koronaren Gefäßwänden allerdings nicht vor und damit ist die theoretisch mögliche systemische Ganciclovirtherapie zur Restenoseprophylaxe praktisch nicht von Bedeutung.

In jüngerer Zeit wurden die wissenschaftlichen Bemühungen verstärkt, Ganciclovir in Kombination mit so genannten Suizidgenen, die mittels Vektoren in Zielzellen eingebracht werden, für die Therapie von malignen Tumoren und zur Prophylaxe einer überschießenden Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung nutzbar zu machen. Dazu werden die humanen Zielzellen mit apathogenen Virenfragmenten (Vektoren) beimpft, deren Genom eine potente virale Thymidinkinase kodiert. Nach Expression dieses Enzyms und gleichzeitiger Gabe von Ganciclovir initiiert die Thymidinkinase durch Phosphorylierung den ersten Schritt in der Umwandlung des Prodrugs Ganciclovir zum aktiven Antimetaboliten. Die „infizierten“ Zellen produzieren also ein Protein, welches bei Zugabe von Ganciclovir ihren eigenen Zelltod verursacht. Gleichzeitig wird durch dieses Vorgehen der Einsatz weit niedrigerer Ganciclovirdosierungen ermöglicht, als bei alleiniger Verwendung von Ganciclovir.

Eine derartige Gentherapie wurde erfolgreich an Zellkulturen (Steg et al. 1997) als auch in vivo eingesetzt (Chang et al. 1995, Luo et al. 2004, Steg et al. 1997). Beispielsweise konnte bei Hasen nach Thymidinkinase-Transfer mittels Adenovirusvektor-beschichtetem Angiographieballon und anschließender systemischer Gabe von Ganciclovir, eine Intimahyperplasie nach zuvor verursachter Iliacalgefäßverletzung verhindert werden (Steg et al. 1997).

In neueren Studien wird zunehmend der kombinierte Einsatz der Herpes simplex Virus Thymidinkinase mit weiteren Suizidgenen wie beispielsweise der E. coli Cytosindesaminase propagiert. Beide Gene führten in Kombination mit Ganciclovir bei Zellkulturen koronarer glatter Gefäßmuskelzellen zu einem höchst effektiven Zellsterben (Cao et al. 2004). Dabei kann zusätzlich ein die Therapieeffizienz potenzierender, so genannter „bystander-Effekt“ genutzt werden (Culver et al. 1992). Ganciclovirtriphosphat wird demzufolge von abgetöteten glatten Gefäßmuskelzellen freigesetzt, um im Anschluss von nicht Vektorinfizierten Nachbarzellen aufgenommen zu werden, die nun ihrerseits absterben (Luo et al. 2004).

Bei allem theoretischen Nutzen dieser neuen Methoden muss einschränkend erwähnt werden, dass eine gezielte lokale Beimpfung von Zielzellen mit Vektoren, vor allem in artherosklerotisch veränderten Bereichen, in vivo häufig nicht ausreichend effektiv gelingt (Steg et al. 1997).

Obwohl trotz bestehender technischer Schwierigkeiten der Gentherapie im Bereich der Restenosierungsprophylaxe die Zukunft gehören könnte, sind mit einem derartigen Vorgehen erhebliche finanzielle Aufwendungen verbunden, so dass sich für diese gegenwärtig

noch nicht völlig ausgereiften Methode ein erheblich ungünstigeres Kosten–Nutzen-Verhältnis als für die derzeit eingesetzten DES ergibt.

Vor diesem Hintergrund liefert die hier vorgestellte Arbeit einen Beitrag, indem mit Ganciclovir eine Substanz untersucht wurde, die in vitro bei ausreichend hoher Dosierung zu einer effektiven Hemmung der ICAM-1-Expression und Gefäßzellproliferation führt, so dass die lokale Hochdosisapplikation von Ganciclovir potentiell in Form von DES durchgeführt werden könnte. In weiteren Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Herstellung eines Ganciclovir beschichteten Stents möglich ist.

5. Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte den direkten Effekt des Virostatikums Ganciclovir (G) auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) und die Proliferation humaner koronarer Gefäßwandzellen. Hierfür wurden glatte Muskelzellen aus humanen Koronarien (HCMSMC) und Endothelzellen aus humanen Koronarien (HCAEC) verwendet. Daneben kamen aus Gründen der Vergleichbarkeit der zu erhebenden Daten, Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren (HUVEC) zum Einsatz.

Die Ergebnisse wurden mit der SI/MPL-Ratio (significant inhibition/maximal plasma level) eingeordnet, welche die Relation zwischen einem signifikanten Effekt in vitro (SI) und dem maximalen Plasmaspiegel in vivo (MPL) beschreibt (bei $G = 9 \mu\text{g/ml}$).

Zur Messung der ICAM-1-Expression wurden die drei Zellarten 18 h mit den Ganciclovirkonzentrationen $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$ und $5000 \mu\text{g/ml}$ inkubiert und während der letzten 6 h mit $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/ml) stimuliert. Die jeweiligen Zellen wurden zum Nachweis der ICAM-1-Expression mit einem fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometer analysiert.

Bei allen drei Zellsorten zeigte sich eine teilweise signifikante Inhibition der Expression von ICAM-1. Bei HUVEC wurden signifikante Inhibitionen bereits mit $0,05 \mu\text{g/ml}$ erreicht (SI/MPL-Ratio = 0.005), bei HCAEC und HCMSMC erst bei einer Konzentration von $5000 \mu\text{g/ml}$ (SI/MPL-Ratio = 555) bzw. $50 \mu\text{g/ml}$ (SI/MPL-Ratio = 5.55).

Der Effekt von Ganciclovir auf die Zellproliferation der HCMSMC, HCAEC und HUVEC wurde nach fünftägiger Inkubation mit obigen Ganciclovirkonzentrationen mittels Zellcounter erfasst.

Bei hohen Konzentrationen von Ganciclovir zeigte sich ein durchwegs starker antiproliferativer Effekt, der bei HUVEC und HCAEC ab $50 \mu\text{g/ml}$ (SI/MPL-Ratio = 5.55) und bei HCMSMC ab $500 \mu\text{g/ml}$ (SI/MPL-Ratio = 55.5) erreicht wurde.

Ergänzend zu den Ganciclovirwirkungen auf die ICAM-1-Expression und Proliferation der Zellen wurde die Wirkung des Virostatikums auf die Zellvitalität der einzelnen Zellreihen untersucht und nach fünftägiger Inkubation mit obigen Ganciclovirkonzentrationen mittels Luminometer analysiert.

Vitalitätsverluste bei gleichzeitiger Inhibition der ICAM-1-Expression zeigten sich bei allen drei verwendeten Zellreihen unter Verwendung der höchsten eingesetzten Ganciclovirkonzentration sowie bei HUVEC zusätzlich bei $5 \mu\text{g/ml}$ Ganciclovir.

Neben der Proliferationshemmung wurde die Zellvitalität ebenfalls bei 5000 µg/ml bei HCMSMC, HCAEC und HUVEC stark reduziert; bei HUVEC außerdem bei 50 µg/ml sowie bei HCAEC und HUVEC bei 500 µg/ml.

Schlussfolgerung: Ganciclovir führt in hohen Konzentrationen zu einer geringen Hemmung der ICAM-1-Expression und einer starken Hemmung der Zellproliferation. SI/MPL-Ratio's > 1 weisen darauf hin, dass diese Effekte nicht durch systemische Applikation der Substanz erreicht werden können, so dass lediglich einer lokalen Hochdosisapplikation der Testsubstanz eine potentielle Bedeutung zukommen könnte. In weiteren Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Herstellung eines Ganciclovir-beschichteten Stents möglich ist.

6. Literaturangabe

1. Blum A, Giladi M, Weinberg M, Kaplan G, Pasternack H, Laniado S, Miller H: High anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis. *Am J Cardiol* 81: 866-868 (1998)
2. Bruggeman CA: Does Cytomegalievirus play a role in atherosclerosis? *Herpes* 7: 51-54 (2000)
3. Cao HQ, Meng XM, Liu DQ, Zhao XW, Ding JF: Killing effect of coexpressing cytosine deaminase and thymidine kinase on rat vascular smooth muscle cells. *Chin Med J* 117: 1464-1470 (2004)
4. Chang MW, Ohno T, Gordon D, Lu MM, Nabel EG, Leiden JM: Adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation following balloon angioplasty of the rat carotid artery. *Mol Med* 1: 172-181 (1995)
5. Cinatl J, Kotchetkov R, Weimer E, Blaheta RA, Scholz M, Vogel JU, Gumbel HO, Doerr HW: The antisense oligonucleotide ISIS 2922 prevents cytomegalovirus-induced upregulation of IL-8 and ICAM-1 in cultured human fibroblasts. *J Med Virol* 60: 313-323 (2000)
6. Costa MA, Simon DI: Molecular basis of restenosis and drug eluting stents. *Circulation* 111: 2257-2273 (2005)
7. Craigen JL, Grundy JE: Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation* 27: 1102-1108 (1996)
8. Crumpacker CS: Ganciclovir. *N Engl J Med* 335: 721-729 (1996)

9. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldenfield EH, Blaese RM: In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552 (1992)
10. Dargatzis DA, Goetz DJ: A proteasome inhibitor reduces concurrent, sequential, and long-term IL-1 β -and TNF- α -induced ECAM expression and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: 813-822 (2003)
11. Dengler T, Raftery M, Werle M, Zimmermann R, Schönrich G: Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin- 1 β . *Transplantation* 69: 1160-1168 (2000)
12. Epstein SE, Speir E, Zhou YF, Guetta E, Leon M, Finkel T: The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. *Lancet* 348: 13-17 (1996)
13. Fabricant CG, Fabricant J, Litrente MM, Minick CR: Virus-induced arteriosclerosis. *J Exp Med* 148: 335-340 (1978)
14. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish RD, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shalmon A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S, for the stent restenosis study investigators: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 331: 496-501 (1994)
15. Forte A, Cipollaro M, Cascino A, Galderisi U: Pathophysiology of stem cells in restenosis. *Histol Histopathol* 22: 547-557 (2007)

16. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K: Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98: 1164-1171 (1998)
17. Ghosh S, Karin M: Missing Pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109: 81-96 (2002)
18. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein SE: Monocytes harboring cytomegalovirus: interaction with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low density lipoprotein. *Gene activity. Circ Res* 81: 8-16 (1997)
19. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M: Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cellbiological and molecular aspects. *Z Kardiol* 84: 5-21 (1995)
20. Jarvis MA, Borton JA, Keech AM, Wong J, Britt WJ, Magun BE, Nelson JA: Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *J Virol* 80: 5588-5598 (2006)
21. Jung D, Griffy K, Dorr A, Raschke R, Tarnowski TL, Hulse J, Kates RE: Effect of high-dose oral ganciclovir on didanosine disposition in human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients. *J Clin Pharmacol* 38: 1057-1062 (1998)
22. Karin M and Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunolog* 18: 621-623 (2000)
23. Klein CL, Kohler H, Bittinger F, Wagner M, Hermanns I, Grant K, Lewis JC, Kirkpatrick CJ: Comparative studies on vascular endothelium in vitro. I. Cytokine effects on the expression of adhesion molecules by human umbilical vein, saphenous vein and femoral artery endothelial cells. *Pathobiology* 62: 199-208 (1994)

24. Knight DA, Briggs BR, Bennett CF, Harindranath N, Waldman WJ, Sedmak DD: Attenuation of cytomegalovirus induced endothelial intracellular adhesion molecule-1 mRNA/protein expression and T-lymphocyte adhesion by a 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotide. *Transplantation* 69: 417-426 (2000)
25. Labinaz M, Pels K, Hoffert C, Aggarwal S, O'Brien ER: Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res* 41: 255-266 (1999)
26. Lemström K, Koskinen P, Krogerus L, Daemen M, Bruggeman C: Cytomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and intimal thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection. *Circulation* 92: 2594-2604 (1995)
27. Lemström K, Sihvola R, Bruggeman C, Häyry P, Koskinen P: Cytomegalovirus infection-enhanced cardiac allograft vasculopathy is abolished by DHPG prophylaxis in the rat. *Circulation* 95: 2614-2616 (1997)
28. Lemstrom KB, Bruning JH, Bruggeman CA, Koskinen PK, Aho PT, Yilmaz S, Lautenschlager IT, Hayry PJ: Cytomegalovirus infection-enhanced allograft arteriosclerosis is prevented by DHPG prophylaxis in the rat. *Circulation* 90: 1969-1978 (1994)
29. Lindner V: The NF-kappaB and IkappaB system in injured arteries. *Pathobiology* 66: 311-320 (1998)
30. Ligthart S, Vlemmix F, Dendukuri N, Brophy JM: The cost effectiveness of drug-eluting stents: A systemic review. *CMAJ* 176: 199-205 (2007)
31. Lockyer JM, Colladay JS, Alperin-Lea WL, Hammond T, Buda AJ: Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Circ Res* 82: 314-320 (1998)

32. Luo Z, Palasis M, Yamakawa M, Liu LX, Vincent KA, Trudell L, Akita GA, Koch WJ, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Catheter-mediated delivery of adenoviral vectors expressing beta-adrenergic receptor kinase C-terminus inhibits intimal hyperplasia and luminal stenosis in rabbit iliac arteries. *J Gene Med* 6: 1061-1068 (2004)
33. McGavin JK, Goa KL: Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 61: 1153-1183 (2001)
34. Melnick JL, Adam E, De Backey ME: Possible role of cytomegalievirus in arterogenesis. *JAMA* 263: 2204-2207 (1990)
35. Miller AM, Mc Phaden AR, Preston A, Wadsworth RM, Wainwright CL: TNF-alpha increases the inflammatory response to vascular ballon injury without accelerating neointimal formation. *Atherosclerosis* 179: 51-59 (2005)
36. Mocarski ES, Fields BN, Knipe DM, Howely PM: Cytomegalieviruses and their replication. *Virology*. Third Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2447-2492 (1996)
37. Monraats PS, Pires NM, Schepers A, Agema WR, Boesten LS, de Vries MR, Zwindermann AH, de Maat MP, Doevendans PA, de Winter RJ, Tio RA, Waltenberger J, 't Hart LM, Frants RR, Quax PH, van Vlijmen BJ, Havekes LM, van der Laarse A, van der Wall EE, Jukema JW: Tumor necrosis factor- α plays an important role in restenosis development. *FASEB J* 19: 1998-2004 (2005)
38. Neumann JF, Kastrati A, Miethke T, Mehilli J, Pogatsa-Murray G, Koch W, Seyfrth M, Schömig A: Previous cytomegalovirus infection and restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 104: 1135-1139 (2001)
39. Noble S, Faulds D: Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 56: 115-146 (1998)

40. Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC: Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur H J* 27: 2784-2814 (2006)
41. Nordoy I, Müller F, Nordal KP, Rollag H, Aukrust P, Frøland SS: Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol* 120: 333-337 (2000)
42. Ozaki Y, Yamaguchi T, Suzuki T, Nakamura M, Kitayama M, Nishikawa H, Inoue T, Hara K, Usuba F, Sakurada M, Awano K, Matsuo H, Ishiwata Sugao, Yasukawa T, Ismail TF, Hishida H, Kato O: Impact of cutting balloon angioplasty (CBA) prior to bare metal stenting on restenosis. *Circ J* 71: 1-8 (2007)
43. Plow EF, D'Souza SE: A role for intercellular adhesion molecule-1 in restenosis. *Circulation* 95: 1355-1356 (1997)
44. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140: 665-663 (1992)
45. Printeseva OY, Peclo MM, Gown AM: Various cell types in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140: 889-896 (1992)
46. Prösch S, Priemer C, Höflich C, Liebenthal C, Babel N, Krüger DH, Volk HD: Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir Ther* 8: 555-567 (2003)
47. Rahbar A, Söderberg-Nauclér C: Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. *J Virol* 79: 2211-2220 (2005)

48. Rajashekhar G, Willuweit A, Patterson CE, Sun P, Hilbig A, Breier G, , Breier G, Helisch A, Clauss M: Continuous endothelial cell activation increases angiogenesis: evidence for the direct role of endothelium linking angiogenesis and inflammation. *J Vasc Res* 43: 193-204 (2006)
49. Reinhardt B, Mertens T, Mayr-Beyerle U, Frank H, Luske A, Schierling K, Waltenberger J: HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF beta receptor. *Cardiovasc Res* 67: 151-160 (2005 a)
50. Reinhardt B, Schaarschmidt P, Bossert A, Lüske A, Finkenzeller G, Mertens T, Michel D: Upregulation of functionally active vascular endothelial growth factor by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 86: 23-30 (2005 b)
51. Sawa Y, Sugimoto Y, Ueki T, Ishikawa H, Sato A, Nagato T, Yoshida S: Effects of TNF- α on Leukocyte Adhesion Molecule Expressions in Cultured Human Lymphatic Endothelium. *J Histochem Cytochem* 29: 22-30 (2007)
52. Sia IG, Patel R: New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol* 13: 83-121 (2000)
53. Scott JC, Partovi N, Ensom MH: Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* 26: 68-77 (2004)
54. Scholz M, Doerr HW, Cinatl J: Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Res* 49: 129-145 (2001)
55. Schulze PC, Kluge E, Schuler G, Lauer B: Periprocedural kinetics in serum levels of cytokines and adhesion molecules in elective PTCA and stent implantation: impact on restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 2105-2107 (2002)

56. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-455 (1994)
57. Smith SC, Dove JT, Jacobs AK, Kennedy JW, Kereiakes D, Kern JM, Kuntz RE, Popma JJ, Schaff HV, Williams DO: ACC/AHA guidelines of percutaneous coronary interventions (revision of the 1993 PTCA guidelines) executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty). *J Am Coll Cardiol* 15: 2215-2239 (2001)
58. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE: Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265: 391-394 (1994)
59. Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE: Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 210-216 (1998)
60. Stassen FR, Vega Cordova X, Vliegen I, Bruggeman CA: Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J Clin Virol* 35: 349-353 (2006)
61. Steg PG, Ouafae T, Aubailly N, Caillaud JM, Dedieu JF, Berthelot K, Le Roux A, Feldman L, Perricaudet M, Denèfle P, Branellec D: Reduction of restenosis after angioplasty in an atheromatous rabbit model by suicide gene therapy. *Circulation* 96: 408-411 (1997)
62. Tanimoto S, Daemen J, Tsuchida K, Garcia-Garcia HM, de Jaegere P, van Domburg RT, Serruyes PW: Two year clinical outcome after coronary stenting of small vessels using 2.25-mm Sirolimus-and Paclitaxel-eluting stents: Insight into the research and t-search registries. *Catheter Cardiovasc Interv* 69: 94-103 (2007)

63. Takahashi S, Kaneda H, Tanaka S, Miyashita Y, Shiono T, Takaaki S, Taketani Y, Domae H, Matsumi J, Mizuno S, Minami Y, Sugitatsu K, Saito S: Late angiographic stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation. *Circ J* 71: 226-228 (2007)
64. Thyberg J, Hedin U, Sjölund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of differential properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10: 966-999 (1990)
65. Valantine HA, Gao SZ, MenonSG, Relund DG, Hunt SA, Oyer P, Stinson EB, Brown BW, Merigan TC, Schroeder JS: Impact of prophylactic immediate post-transplant Ganciclovir of development of transplant atherosclerosis: a post hoc analysis of a randomized, placebo-controlled study. *Circulation* 100: 61-66 (1999)
66. Valantine HA: The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 4: 169-177 (2004)
67. Virami R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A: Drug eluting stents: Are human and animal studies comparable? *Heart* 89: 133-138 (2003)
68. Voisard R: Humane Restenose-Modelle: Annäherungen an die klinische Situation. Med. Habilitationsschrift, Universität Ulm 2002
69. Voisard R, Obwald M, Baur R, Jakob U, Susa M, Mattfeldt 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- α . *Coron artery Dis* 9: 737-745 (1998)
70. Voisard R, Huber N, Baur R, Susa M, Ickrath O, Both A, Koenig W, Hombach V: Different effects of antisense RelA p65 and NF-kappaB1 p50 oligonucleotides on the nuclear factor-kappaB mediated expression of ICAM-1 in human coronary endothelial and smooth muscle cells. *BMC Mol Biol* 2: 7 (2001)

71. Voisard R, Baur R, Herter T, Hombach V: Two decades 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)
72. Voisard R, Wiegemann D, Baur R, Hombach V, Kamenz J: Low-dose irradiation stimulates TNF-alpha-induced ICAM-1 mRNA expression in human coronary vascular cells. *Med Sci Monit* 13: 107-111 (2007)
73. Wagner M, Michel D, Schaarschmidt P, Vaida B, Jonjic S, Messerle M, Mertens T, Koszinowski U: Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity. *J Virol* 74: 10729-10736 (2000)
74. Yasukawa H, Imaizum T, Matsuoka H, Nakashima A, Morimatsu M: Inhibition of intimal hyperplasia after ballon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation* 95: 1515-1522 (1997)
75. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE: Association between prior cytomegalievirus infection and the risk of restenosis after coronary artherectomy. *N Engl J Med* 335: 624-630 (1996)
76. Zhou YF, Zu XY, Wanishawad C, Shou M, Epstein SE: The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 24: 608-613 (1999)
77. Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Fredericks S, Kaski JC: Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 110: 1747-1753 (2004)

7. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all denen, die mich während des Erstellens dieser Dissertation auf vielfältigste Weise unterstützt und motiviert haben:

Meinem Doktorvater PD Dr. med. Rainer Voisard, der mir dieses interessante Thema überlassen und mich bestens betreut hat, aber auch motivierend zur Seite stand, danke ich in besonderem Maße.

Regine Baur und Iris Gastrock-Bahlitsch danke ich für die ausgezeichnete und freundliche Einarbeitung in die Methodik der Zellkultur. Für die kompetente und zuverlässige Unterstützung sowie freundschaftliche Zusammenarbeit während der experimentellen Phase dieser Dissertation danke ich Regine Baur im Besonderen.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Vinzenz Hombach, in dessen Abteilung diese Dissertation angefertigt wurde, für die uneingeschränkte Unterstützung des Projekts. Dem gesamten Laborteam Voisard und den Mitarbeitern der angrenzenden Labore möchte ich für die freundliche Aufnahme und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Laborzeit danken.

Herrn Dr. Lutz von Müller danke ich für die großzügige und freundliche Überlassung des Zytoflowlabors.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir neben der materiellen Unterstützung in der Zeit des Studiums und während des Erstellens dieser Arbeit verständnisvoll und motivierend zur Seite standen. Meinem Lebensgefährten und „Mitstreiter“ Rüdiger und meiner Schwester Maren danke ich für ihr offenes Ohr und ihre Hilfe bei den größeren und kleineren Problemen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind.