



Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf
kultivierte vaskuläre glatte Muskel- und
Endothelzellen und Charakterisierung von
Gewebereaktionen auf 17β -Estradiol- und
Genistein-Eluting Stents in porcinen, kultivierten
Carotisabschnitten

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Doreen Staar

Rostock, Dezember 2012

Gutachter:

- 1. Gutachter:** PD Dr. rer. nat. habil. Marian Löbler,
Institut für Biomedizinische Technik, Universitätsmedizin Rostock
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. habil. Renate Horn
Institut für Biowissenschaften, Pflanzengenetik, Universität Rostock
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Walther
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Einreichung: 03. Dezember 2012

Datum der Verteidigung: 12. Juli 2013

Für meine 4 Sta(a)rfighter

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	STAND DER FORSCHUNG.....	4
2.1.	ENTSTEHUNG ATHEROSKLEROTISCHER LÄSIONEN UND DEREN BEHANDLUNG.....	4
2.1.1.	<i>Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes.....</i>	4
2.1.2.	<i>Atherogenese.....</i>	5
2.1.3.	<i>Die Rolle von Angiotensin II, des Renin-Angiotensin-Systems und des AT1-Rezeptors in der Atherogenese.....</i>	7
2.1.4.	<i>Koronare Herzkrankheit (KHK).....</i>	11
2.1.5.	<i>Behandlung atherosklerotischer Läsionen und der Folgeerkrankungen.....</i>	11
2.2.	HAUPTKOMPLIKATION: RESTENOSE UND IN-STENT RESTENOSE.....	13
2.3.	DRUG ELUTING STENTS.....	15
2.4.	LATE STENT THROMBOSE.....	17
2.5.	ÖSTROGENE ALS WIRKSTOFFE IN DER DES-TECHNOLOGIE.....	19
2.5.1.	<i>17β-Estradiol – Wirkweise und Bedeutung für die Restenose-Prävention.....</i>	19
2.5.2.	<i>Genistein – Einsatz von Phytoöstrogenen als Alternative zu 17β-Estradiol.....</i>	23
3.	ZIELSTELLUNG.....	27
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	28
4.1.	MATERIAL.....	28
4.2.	UNTERSUCHUNGEN AUF ZELLKULTUREBENE.....	30
4.2.1.	<i>Isolierung primärer porciner Endothel- und glatter Muskelzellen.....</i>	30
4.2.1.1.	<i>Probenentnahme und Zellisolierung.....</i>	30
4.2.1.2.	<i>Immunhistochemische Charakterisierung der Primärzellen ppEC und ppSMC.....</i>	31
4.2.2.	<i>Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf die Vitalität und Proliferation vaskulärer Endothel- und glatter Muskelzellen.....</i>	33
4.2.2.1.	<i>Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für den Vitalitäts- und Proliferationsnachweis.....</i>	33
4.2.2.2.	<i>MTS-Test zum Nachweis der Vitalität.....</i>	34
4.2.2.3.	<i>BrdU-Test zum Nachweis der Proliferation.....</i>	35
4.2.2.4.	<i>Untersuchungen des Einflusses einer Genistein/Sirolimus-Kombinationslösung auf das Proliferationsverhalten der humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC.....</i>	36
4.2.3.	<i>Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf die Migration primärer vaskulärer glatter Muskelzellen.....</i>	36
4.2.3.1.	<i>Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für die Migrationstestung.....</i>	36
4.2.3.2.	<i>Zellzählung.....</i>	37
4.2.4.	<i>Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus ausgewählter Proteine in primären porcinen Endothel- und glatten Muskelzellen mittels</i>	

Inhaltsverzeichnis

<i>Westernblot</i>	38
4.2.4.1. Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für die Proteinisolierung.....	38
4.2.4.2. Proteinisolierung.....	39
4.2.4.3. Westernblot.....	40
4.3. KULTIVIERUNG PORCINER CAROTISABSCHNITTE.....	43
4.3.1. <i>Kultivierungsbedingungen</i>	44
4.3.2. <i>Gewebekulturaufbau</i>	45
4.3.3. <i>Untersuchungen des kultivierten Gewebematerials</i>	46
4.3.3.1. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	46
4.3.3.2. Histologische Untersuchungen (H+E-, Azan- und Elastika Färbung).....	47
4.3.3.3. Immunfluoreszenz zur Untersuchung der Wirkstoffverteilung und -anreicherung im Gewebe.....	48
4.4. STATISTIK.....	49
5. ERGEBNISSE.....	50
5.1. UNTERSUCHUNGEN AUF ZELLKULTUREBENE.....	50
5.1.1. <i>Ergebnisse der Primärzellisolierung</i>	50
5.1.2. <i>Einfluss von 17β-Estradiol und Genistein auf Vitalität und Proliferation von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen</i>	52
5.1.2.1. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC.....	53
5.1.2.2. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC.....	57
5.1.2.3. Einfluss einer Genistein/Sirolimus-Kombinationslösung auf das Proliferationsverhalten der humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC.....	61
5.1.2.4. Zusammenfassung.....	64
5.1.3. <i>Einfluss von 17β-Estradiol und Genistein auf die Migration primärer vaskulärer glatter Muskelzellen</i>	65
5.1.3.1. Wirkung auf die porcinen Primärzellen ppSMC.....	65
5.1.3.2. Vergleich zu den humanen Primärzellen HCASMC.....	67
5.1.4. <i>Einfluss von 17β-Estradiol und Genistein auf den Status ausgewählter Proteine in primären porcinen Endothel- und glatten Muskelzellen</i>	68
5.1.4.1. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus von ppEC.....	68
5.1.4.2. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus von ppSMC.....	73
5.2. KULTIVIERUNG PORCINER CAROTISABSCHNITTE.....	78
5.2.1. <i>Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung</i>	78
5.2.2. <i>Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer Serum- und äußerer Mediumversorgung</i>	82
5.2.3. <i>Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und implantiertem Metallstent</i>	84
5.2.4. <i>Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und</i>	

Inhaltsverzeichnis

	<i>implantiertem 17β-Estradiol-Eluting Stent</i>	87
5.2.5.	<i>Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und implantiertem Genistein-Eluting Stent</i>	90
6.	<i>DISKUSSION</i>	94
6.1.	17B-ESTRADIOL UND GENISTEIN ALS POTENTIELLE WIRKSTOFFE IN DER INTERVENTIONELLEN KARDIOLOGIE.....	95
6.1.1.	<i>Der Einfluss von 17β-Estradiol auf ausgewählte zelluläre Funktionen</i>	95
6.1.2.	<i>Der Einfluss von Genistein auf ausgewählte zelluläre Funktionen</i>	97
6.1.3.	<i>Der Einfluss von 17β-Estradiol und Genistein auf Proteine von proliferations-, migrations- und inflammationsregulierenden Signalwegen</i>	100
6.1.4.	<i>17β-Estradiol versus Genistein: Zusammenfassung der untersuchten zellulären und molekularen Mechanismen im Vergleich zur Literatur</i>	107
6.1.5.	<i>17β-Estradiol- und Genistein-Eluting Stent Implantation in porcinen kultivierten Carotisabschnitten</i>	111
6.2.	SCHLUSSFOLGERUNG: TAUGLICHKEIT VON 17B-ESTRADIOL UND GENISTEIN ALS DES-INKORPORATION ZUR REDUKTION VON NEOINTIMALER HYPERPLASIE UND RESTENOSE	116
7.	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	118
8.	<i>AUSBLICK</i>	120
9.	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	121
10.	<i>ANHANG</i>	135

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ang	Angiotensin
Aogen	Angiotensinogen
AT1	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT2	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMS	bare metal stent
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DES	Drug-Eluting Stent
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelial Cell
ECM	Extrazelluläre Matrix
EES	Everolimus-Eluting Stent
EGF	Epidermal Growth Factor
ELAM	Endotheliales Leukozyten Adhäsionsmolekül
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBN	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
FCS	Fötale Kälberserum
FRAP	FKBP-12 Rapamycin Associated Protein
GP	Glycoprotein
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IST	In-Stent Thrombose
JAK	Janus kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MMP	Matrix Metalloproteinase
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium, inner salt
NF-κB	Nuclear Transcription Factor kappa-B
NGF	Nerve Growth Factor
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PBMA	Poly (n-Butyl Methacrylat)
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
PCI	perkutane transluminale koronare Intervention
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PES	Paclitaxel-eluting stent
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PKC	Protein Kinase C
PLLA	Poly-L-lactid

Abkürzungsverzeichnis

PMS	Phenazin Methosulfat
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
ppEC	primary porcine Endothelial Cells
ppSMC	primary porcine Smooth Muscle Cells
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PTK	Protein Tyrosinkinase
RAMSES	Rostock Advanced Manufacturing of Spraycoated drug Eluting Stents
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RAS	Renin-Angiotensin-System
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SES	Sirolimus-eluting Stent
SMC	Smooth Muscle Cell
sog.	sogenannte
SR	Scavenger-Rezeptor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCS	Tube Chamber System
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
u. a.	unter anderem
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Activating Antigen
z. B.	zum Beispiel
ZES	Zotarolimus-Eluting Stent

1. Einleitung

Störungen des Herz-Kreislauf-Systems führen in den westlichen Industrienationen zu zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen, die sich häufig mit Frühinvalidität oder letalem Ausgang manifestieren. Die koronare Herzkrankheit mit einhergehender Herzinsuffizienz und folgendem Myokardinfarkt stellt dabei die häufigste Todesursache dar. Zudem werden zunehmend zerebrovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfälle, sowie die periphere Verschlusskrankheit beobachtet (ORTMANN et al., 2004; MILLONIG et al., 2002).

Hauptursache bei einem Großteil dieser Vorfälle ist die Atherosklerose, deren Genese, bedingt durch verschiedene Risikofaktoren, über Jahrzehnte symptomlos erfolgt. Durch chronische, inflammatorische Prozesse und dem degenerativen, arteriosklerotischen Umbau der arteriellen Blutgefäße mit Plaquebildung resultiert eine Reduzierung des Blutgefäßlumens sowie Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust des betroffenen Gefäßabschnittes. Betroffene Organe weisen eine eingeschränkte Vitalität und Funktionalität auf (GALLE, 2004). Durch eine mögliche Plaqueruptur mit einhergehender Thrombenbildung, einem lokal begrenzter Prozess, kann binnen weniger Minuten ein lebensbedrohlicher Zustand entstehen (GIMBRONE JR., 1999).

Die bevorzugte Behandlung stellt die von Andreas Grüntzig entwickelte und 1977 zuerst durchgeführte minimal-invasive perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) dar (SLAVIN et al., 2007). Der Großteil der heute praktizierten perkutanen transluminalen koronaren Interventionen (PCI) wird mit der Implantation von Blutgefäßstützen (Stents) kombiniert, die Mitte der 80er Jahre diese Behandlungsmethode revolutionierten (DENES et al., 2012). Heute kommen in Deutschland auf eine Bypassoperation sechs Koronarinterventionen (BRUCKENBERGER, 2007). Die Erfolgsquote perkutaner transluminaler koronarer Interventionen wird jedoch durch einen möglichen sekundären Gefäßverschluss drastisch eingeschränkt. Diese sogenannte Restenose, verursacht durch die Ausbildung einer Neointima mit erhöhten Proliferations- und Migrationsraten vaskulärer Gefäßmuskelzellen, tritt bei einer konventionellen PTCA innerhalb von 6 Monaten mit einer Häufigkeit von 20-60 % (SLAVIN et al., 2007; RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008), bei einer perkutanen Intervention mit Metallstent-Implantation mit 10-30 % auf (LÜSCHER et al., 2007; MOULIAS und ALEXOPOULOS, 2011).

Das Ziel der Forschung besteht daher in der Weiterentwicklung der PCI und somit der weiteren Reduktion der Restenoserate. Im Fokus des Interesses stehen dabei lokal applizierbare restenosehemmende Pharmaka. Der Vorteil der lokalen Anwendung liegt zum einen in der gezielten Medikamentengabe in der entsprechenden Blutgefäßläsion, zum anderen in der geringen systemischen Belastung des behandelten Patienten. Dieser Ansatz wurde in der Weiterentwicklung der Stenttechnologie und des Stentdesigns umgesetzt,

indem Blutgefäßstützen mit Drug-Delivery Systemen entwickelt wurden. Bei diesen sog. Drug-Eluting Stents (DES) handelt es sich in der Regel um Polymer-beschichtete Stents mit Wirkstoffinkorporation zur Inhibition der Neointimabildung durch Einfluss auf verschiedene zelluläre Signalwege, die in Inflammation, Proliferation, Migration und ECM-Remodeling involviert sind (GARCÍA-GARCÍA et al., 2006).

Die ersten DES wurden im April 2002 in Europa bzw. März 2003 in den USA kommerzialisiert (ONG und SERRUYS, 2005), bei den inkorporierten restenosehemmenden Medikamenten handelte es sich zunächst um Paclitaxel oder Sirolimus. Die Restenoseraten konnten signifikant auf weniger als 10 % weiter reduziert werden (WEISSMAN et al., 2007; MORICE et al., 2006; BABAPULLE et al., 2004), die Langzeitergebnisse stellten die Forschung aber vor ein neues Problem: der Stent Thrombose (LÜSCHER et al., 2007).

Die akute, subakute und späte in-Stent Thrombose betrifft alle Stenttypen. Insbesondere die späte in-Stent Thrombose scheint jedoch ein spezielles Problem von Drug-Eluting Stents zu sein (CARLSSON et al., 2006). Eine Ursache für Stent Thrombosen ist die Verletzung bzw. Aktivierung des Endothels durch die vaskuläre Intervention. Ein normal funktionierendes Endothel ist essentiell zur Verhinderung von Thrombosen. Die Funktion besteht in der Regulierung von Angiogenese und Wundheilung und der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und Homöostase. Als Barriere reguliert das Endothel die Permeabilität der Blutgefäßwand, die Thrombogenität, die Leukozyten-Adhärenz, die Koagulation, den Blutdruck, die Produktion wachstumsinhibierender Moleküle und die Modulation der SMC-Proliferation (GARCIA et al., 2001; MEHTA und MALIK, 2006).

Nach einer vaskulären Intervention mit der Schädigung des Endothels nimmt eine Endothelialisierung des traumatisierten Bereichs etwa 2 Wochen in Anspruch; der komplette Heilungsprozess ist nach einem Monat abgeschlossen. Der primäre Grund für die verzögerte Reendothelialisierung nach der Intervention mit einem DES und folgender Stent Thrombose ist bisher nicht vollständig verstanden, multiple Faktoren spielen dabei aber eine Rolle (lokale Hypersensitivitätsreaktionen auf Polymer oder Wirkstoff, Bifurkalläsionen, antiproliferativer Einfluss des aus dem DES freigesetzten Medikaments; LÜSCHER et al., 2007; SILBER et al., 2008).

Hinsichtlich dieses Wissens sollte eine schnelle Endothelialisierung Spätkomplikationen in Form einer Stent Thrombose und somit weitere Interventionen reduzieren oder verhindern können. Ein Drug-Eluting Stent sollte daher folgenden Anforderungen entsprechen: Ein oder mehrere Wirkstoffe sollten inkorporierbar sein, welche die Regenerationen eines funktionalen Endothels begünstigen und die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen hemmen. Die inkorporierten Wirkstoffe sollten über eine kontrollierbare Freisetzungskinetik aus dem Implantat verfügen, um die optimale therapeutische Dosis mit der temporalen Heilungsreaktion synchronisieren zu können.

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen wurden in diesem Zusammenhang verschiedene Arbeitsgruppen auf den kardioprotektiven Effekt von Östrogenen während der menopausalen Hormonersatztherapie aufmerksam. Durch die Verabreichung von Östrogenen konnte das Risiko atherosklerotischer Erkrankungen sowie restenotischer Vorgänge nach PCI reduziert werden (ABU-HALAWA et al., 1998; WU et al., 2003). Zahlreiche Autoren, beispielsweise DUBEY et al., 2000; DAI-DO et al., 1996 und GERALDES et al., 2003 zeigten, dass das Östrogen 17 β -Estradiol die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen hemmt, die Migration und Proliferation von Endothelzellen jedoch begünstigt. Zudem wurde eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie und die Reendothelialisierung im Tiermodell Schwein (CHANDRASEKAR et al., 2005; CHANDRASEKAR et al., 2001; CHANDRASEKAR et al., 2000; NEW et al., 2002; KYRIAKIDES et al., 2006; GERALDES et al., 2008) sowie im Kaninchen (HAN et al., 2007) nachgewiesen.

Da 17 β -Estradiol jedoch nachteilige Effekte auf das reproduktive System sowohl bei Frauen als auch Männern hat, ist das therapeutische Potenzial und somit die Einsetzbarkeit eingeschränkt (SQUADRITO et al., 2000). Eine Alternative zu 17 β -Estradiol stellt das Phytoöstrogen Genistein dar. Es ist 17 β -Estradiol in der chemischen Struktur sehr ähnlich und es wurden von vielen Autoren ebenso kardioprotektive Effekte (CLARKSON, 2002), wie proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften auf glatte Gefäßmuskelzellen (YU et al., 2008; XU et al., 2004; PAN et al., 2001). und eine Begünstigung der Endothelzellproliferation, beschrieben (XIANG et al., 2010).

Da in der Literatur das Östrogen 17 β -Estradiol als mögliche DES-Inkorporation diskutiert wird, sollen im Rahmen dieser Arbeit im Tiermodell Schwein die publizierten Daten zu 17 β -Estradiol verifiziert und der Wirkstoff auf seine Eignung als Stentinkorporation beurteilt werden. Auf Grund der bekannten Nachteile von 17 β -Estradiol soll das Phytoöstrogen Genistein gleichermaßen auf die Tauglichkeit als restenosehemmendes Medikament geprüft und die Resultate der 17 β -Estradiol-Testung als Referenz herangezogen werden.

2. Stand der Forschung

2.1. Entstehung atherosklerotischer Läsionen und deren Behandlung

Unter dem Oberbegriff Arteriosklerose versteht man die verschiedenen degenerativen Veränderungen arterieller Blutgefäße, wobei die Atherosklerose den pathogenetisch spezifischen, stenotisch ablaufenden Prozess beschreibt, der sich, lokalisiert an großen und mittelgroßen arteriellen Blutgefäßen, im gesamten Körper mit nachfolgender Organischämie oder Infarkt im entsprechenden Versorgungsgebiet manifestiert (RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008).

Der atherosklerotische Umbau von arteriellen Blutgefäßen ist eine chronische, inflammatorische Erkrankung (ROSS, 1999). Es handelt sich dabei um einen komplexen Prozess, dessen Pathogenese bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Der Zeitraum der Atherogenese kann ca. 45 Jahre umfassen und findet seinen Ursprung oftmals schon in der Kindheit. Nach dieser langen, in der Regel dem Patienten unbekanntem präklinischen Phase ist der Übergang in die klinische Phase meist sehr plötzlich (MCGILL et al., 2000; GIMBRONE JR., 1999; CHARAKIDA et al., 2005).

2.1.1. Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes

Um die Atheroskleroseentstehung besser darstellen zu können, soll zuvor auf den grundlegenden Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes eingegangen werden.

Man kann 3 große Gruppen von Arterien unterscheiden: die elastischen Arterien (conducting arteries), die muskulären Arterien (distributing arteries) und die Arteriolen.

Ein arterielles Blutgefäß muskulären Typs ist in der Regel aus drei Schichten aufgebaut: Der *Tunica intima* (Intima), der *Tunica media* (Media) und der *Tunica externa sive adventitia* (Adventitia).

Diese Schichten sind konzentrisch angeordnet, wobei die Intima das Blutgefäß nach innen, dem Blutgefäßlumen, abgrenzt.

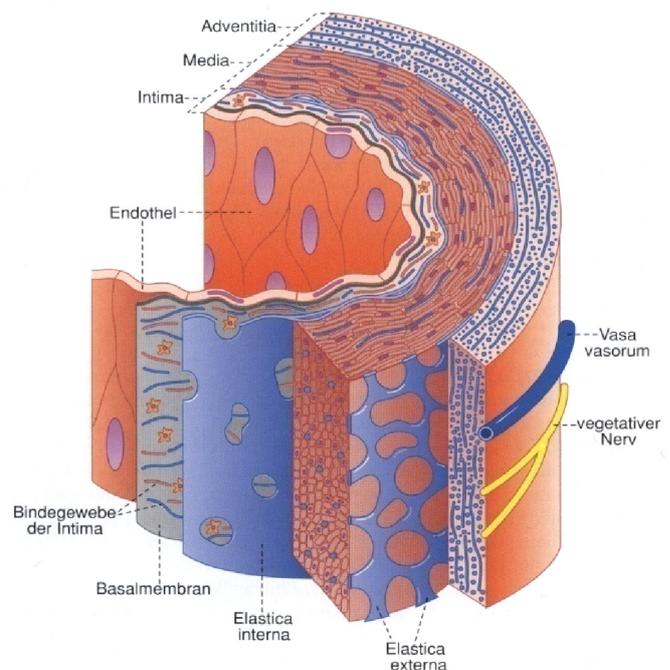


Abb. 2.1: Wandaufbau einer Arterie (WELSCH, 2006)

Diese besteht aus einem Endothel, welches an eine subendotheliale Bindegewebschicht grenzt, einer anschließenden Basalmembran und der aus ein bis zwei kräftigen Membranen bestehenden *Elastica interna*.

Die Wandmitte wird von der *Media* gebildet. Diese besteht hauptsächlich aus zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen und Bindegewebsfasern und der anschließenden *Elastica externa*. Nach außen wird die Gefäßwand mit der überwiegend aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen und zahlreichen elastischen Fasern bestehenden sowie fibroblastenhaltigen *Adventitia* abgeschlossen. Diese geht ohne scharfe Grenzen in das benachbarte Bindegewebe über (WELSCH, 2006).

2.1.2. Atherogenese

Das Endothel spielt bei der Atherogenese eine zentrale Rolle. Als physikalische Barriere zwischen der Blutgefäßwand und dem Lumen reguliert diese Struktur unter physiologischen Bedingungen auf mechanische und humorale Signale hin zahlreiche Funktionen wie den Blutdruck, Leukozytenadhäsion, Koagulation, Fibrinolyse, Plättchenadhäsion und -aggregation sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Veränderungen in dieser Struktur, bedingt durch verschiedene Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, oxidativer Stress, gestörte endotheliale NO-Produktion, Homocystinurie, Adipositas, Diabetes, Rauchen, chronische Infektionen (*Helicobacter pylorii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Herpes virus*), Scherstress und genetische Disposition können zu Störungen der endothelialen Integrität, der sog. endothelialen Dysfunktion, führen (GIMBRONE JR., 1999; VERMA et al., 2003; CHARAKIDA et al., 2005; GEBBERS, 2007).

Zunächst nahm man an, dass diese Veränderungen des Endothels auf einen mechanischen Reiz hin ausgelöst worden sind. Diese von ROSS 1973 aufgestellte „response to injury“-Hypothese als Auslöser atherosklerotischer Prozesse (ROSS und GLOMSET, 1973) gilt als überholt; vielmehr ist bekannt, dass auch bei einer mikroskopisch intakten Gefäßwand chronisch entzündliche Prozesse ablaufen können (ROSS, 1999). GOLDSTEIN prägte 1977 die „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese. Als Folge einer endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer Aufnahme von chemisch modifiziertem LDL (Low Density Lipoprotein) durch Makrophagen und zur Schaumzellbildung (GOLDSTEIN und BROWN 1977).

Der inflammatorische Prozess der Atherogenese mit der Plaqueentstehung lässt sich in drei Stadien unterteilen (CHENG et al., 2005):

- Anstieg der vaskulären Permeabilität
- Infiltration von Leukozyten
- Tissue Remodeling.

Anstieg der vaskulären Permeabilität:

Als Folge der u. a. durch Hypertonie verursachten Veränderungen der Hämodynamik (DANCU et al., 2004) und dem Auftreten von Verwirbelungen in Zusammenhang mit einer gestörten NO-Produktion kann es, zusätzlich verstärkt durch weitere Risikofaktoren, zu Veränderungen des Endothels mit inflammatorischen Prozessen kommen (LUCAS et al., 2006). Dieser Verlauf ist durch eine erhöhte Endothelzellproliferation, Apoptose und einer ansteigenden Endothelpermeabilität gekennzeichnet. Es erfolgt die Freisetzung verschiedener Mediatoren wie den Eicosanoiden, dem Vaskulären Permeabilitätsfaktor und dem Vascular Endothel Cell Growth Factor sowie ein Rearrangement von Proteinen des Zytoskeletts (SUZUKI et al., 2003).

Infiltration von Leukozyten:

Die endotheliale Dysfunktion mit erhöhter Permeabilität der Gefäßwand begünstigt die Adhäsion und die Infiltration von inflammatorischen Zellen, den Monozyten. Es erfolgt die Aktivierung des Endothels und die damit verbundene Expression von Adhäsionsmolekülen wie den Selectinen (z. B. E-Selectin), der Immunglobulin-Superfamilie (z. B. Endotheliales Leukozyten Adhäsionsmolekül [ELAM], Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 [VCAM-1], Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 [ICAM-1]) und den Integrinen sowie die Konzentrationserhöhung vasoaktiver Mediatoren wie z. B. das Endothelin-1 und Prostaglandine und Faktoren, die die Koagulation beeinflussen wie der von Willebrandt Faktor, Tissue Plasminogen Activator und Plasminogen Activator Inhibitor-1 Factor. Gleichzeitig steigt die chemotaktische Aktivität durch die Bildung von z. B. Macrophage Chemotactic Protein-1 und Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), die von endothelialen, glatten Muskel- und den inflammatorischen Zellen selbst durch die Stimulation lokal freigesetzter Zytokine produziert werden und Rekrutierung und Reifung der Monozyten unterstützen (CHARAKIDA et al., 2005; CUSHING et al., 1990; CHEN et al., 1998; SUKOVICH et al., 1998; ANTONOV et al., 2004; DI VIRGILIO und SOLINI, 2002; CHENG et al., 2005; MILLER et al., 2003).

Die Zellen rollen entlang der Endotheloberfläche, wobei die Chemokinrezeptoren der Leukozyten mit entsprechenden Liganden des Endothels in Kontakt kommen. Es erfolgt die Aktivierung von Integrinen und die feste Adhäsion durch die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (ARNAL et al., 2004). VCAM-1 bindet dabei den spezifischen Integrinrezeptor Very Late Activating Antigen 4 (VLA-4), der von Monozyten und Lymphozyten, aber nicht von Granulozyten exprimiert wird. Dadurch erfolgt eine selektive Rekrutierung von Lymphozyten in der frühen Atherogenese. Dieser Prozess wird von der Auswanderung der Monozyten aus dem vaskulären in den subendothelialen Raum gefolgt, einem initialen Schritt der Plaque-Bildung (ARNAL et al., 2004; CUSHING et al., 1990; CHEN et al., 1998; SUKOVICH et al., 1998; ANTONOV et al., 2004; DI VIRGILIO und SOLINI, 2002).

Tissue Remodeling:

Ein weiterer Schlüsselprozess der Atherogenese stellt die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen sowie die Akkumulation und Modifikation von Lipoproteinen in der arteriellen Intima dar (CHEN et al., 1998; ANTONOV et al., 2004). Durch die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen sind diese in der Lage oxidiertes Low Density Lipoprotein (oxLDL) über Scavenger-Rezeptor Pathways (wichtigste Scavenger-Rezeptoren: SRA und CD36 [ANTONOV et al., 2004]) zu phagozytieren, wodurch die Makrophagen aktiviert werden und Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen. Da die Aufnahme nicht durch intrazelluläre Cholesterolkonzentrationen limitiert wird, folgt die Schaumzellbildung, die Lipidanreicherung im subendothelialen Raum und die Entstehung von Fatty Streaks. Zum Teil sterben die Schaumzellen ab, wodurch der Inhalt in den nekrotischen Kern der entstehenden Plaque freigesetzt und diese kontinuierlich verändert wird. Zudem erfolgt eine Stimulation der Proliferation und Migration von unter physiologischen Bedingungen nur in der Media vorkommenden glatten Muskelzellen durch LDL, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Neben der mitogenen Stimulation verändern diese auch den Phänotyp durch Verlust der kontraktiven Eigenschaften und Befähigung zur Synthese („Inflammatorische Differenzierung“; DI VIRGILIO und SOLINI, 2002).

Durch ein Remodeling der extrazellulären Matrix (ECM), SMC-Proliferation, der Ablagerung von Lipiden und der weiterhin erfolgenden Infiltration von Makrophagen erfolgt ein anhaltendes Plaqueremodelling. Zudem bildet sich eine fibröse Kappe, die den Lipidkern vom Blut trennt. Entstehen Schwachstellen in der fibrösen Kappe, kann eine Plaqueruptur folgen, an deren Oberfläche Thrombosen (TEDGUI, 2005) oder Mikroembolien entstehen können bzw. sich eine fortschreitende Entzündung manifestieren kann (LUCAS et al., 2006).

Die Bildung von Blutgerinnseln und die inflammatorischen Pathways beschleunigen die lokale Makrophagen- und T-Zellaktivierung (LUCAS et al., 2006), wodurch in kürzester Zeit ein Gefäßverschluss (Stenose) resultiert.

2.1.3. Die Rolle von Angiotensin II, des Renin-Angiotensin-Systems und des AT1-Rezeptors in der Atherogenese

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist in der Pathogenese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen wie Hypertonie und Atherosklerose involviert, bei deren Verlauf die Inflammation in der Gefäßwand eine Schlüsselrolle spielt (RUIZ-ORTEGA et al., 2003; KON und JABS, 2004; RUIZ-ORTEGA et al., 2000; SUZUKI et al., 2006). Als wichtigstes Effektorpeptid des RAS gilt dabei das Angiotensin II, welches neben der hämodynamischen Aktivität, als lokaler, biologisch aktiver Mediator in der Initiation und Verstärkung pathologischer Vorgänge eine Rolle spielt (TSUDA et al., 2005; XU et al., 2004) und in allen drei Phasen der Atherogenese involviert ist (CHENG et al., 2005).

Angiotensin II wird über das RAS gebildet, wobei Angiotensinogen durch Renin gespalten und das inaktive Dekapeptid Angiotensin I gebildet wird. Durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) erfolgt die Konvertierung zum aktiven Oktapeptid Angiotensin II, was als zirkulierendes Hormon vorkommt, aber auch lokal im Gewebe über den ACE-Pathway gebildet werden kann. Bei vaskulären, inflammatorischen Erkrankungen spielt die Bildung durch endotheliale Zellen eine wichtige Rolle (RAKUGI et al., 1994; CHENG et al., 2005).

Angiotensin II wirkt über die Bindung an spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche: dem Angiotensin II Typ 1 (AT1) und Angiotensin II Typ 2 (AT2) Rezeptor (CHENG et al., 2005; DOUILLETTE et al., 2006; MUKOYAMA et al., 1993; KAMBAYASHI et al., 1993; RUIZ-ORTEGA et al., 2000). Der AT1 Rezeptor vermittelt viele wichtige kardiovaskuläre Reaktionen, wie die Stimulierung der Produktion von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β), Bildung von Matrixkomponenten, Vasokonstriktion, vaskuläres und kardiales Remodeling sowie vaskuläres Zellwachstum (RAKUGI et al., 1993; DEBLOIS et al., 1996; PRESCOTT et al., 1991).

Es erfolgt zudem die Stimulation intrazellulärer Signale wie der Calcium-Mobilisierung und die Aktivierung von Proteinkinasen (z. B. Protein Kinase C [PKC], Tyrosinphosphorylierung) sowie die Aktivierung des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathways (GRIENGLING et al., 1997; MOLLOY et al., 1993; DUFF et al., 1992; TSUDA et al., 1992). Diese durch Angiotensin II stimulierten Signalwege können zur direkten Transkriptionsaktivierung von Genen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixkomponenten führen, die Hypertrophie oder Hyperplasie in glatten Gefäßmuskelzellen verursachen (FUNAKOSHI et al., 1999).

Über den AT2 Rezeptor hat Angiotensin II Einfluss auf apoptotische Vorgänge, die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und die Bildung von Second Messengers (MAP Phosphatase Aktivierung, Kinase Inhibition; MATSUBARA, 1998; WOLF et al., 1997).

Die Aktivität des Hormons Angiotensin II ist in atherosklerotischen Prozessen sowie bei vaskulären Verletzungen erhöht (SCHIEFFER et al., 2000). Es wird beschrieben, dass als Reaktion darauf eine Hochregulation des RAS erfolgt, insbesondere von Renin (IDE et al., 2008), Angiotensinogen (RAKUGI et al., 1993), ACE und Angiotensin II (RAKUGI et al., 1994; AKISHITA et al., 2001; IDE et al., 2008). Über den AT1 Rezeptor beeinflusst Angiotensin II insbesondere das Tissue Remodeling, die Entstehung von oxidativem Stress und die Stimulation von Transkriptionsfaktoren; alles grundlegende Prozesse der neointimalen Hyperplasie.

Während des Tissue Remodelings wird über den AT1 Rezeptor durch Angiotensin II die p44/42 MAPK-vermittelte Zellteilung von SMCs (MEIJERING et al., 2009) durch autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, VEGF, TGF- β) stimuliert (CHENG et al., 2005; FUNAKOSHI et al., 1999; DAEMEN et al., 1991). Die AT1-vermittelte Stimulation von Wachstumsfaktoren bewirkt zudem die Phosphorylierung von Protein Tyrosinkinasen (PTK), wichtige Regulatoren des Zellwachstums und der Differenzierung (POLKOWSKI und MAZUREK,

2000). Angiotensin II beeinflusst über den AT1 Rezeptor zudem Hypertrophie und Hyperplasie (DOUILLETTE et al., 2006; FUNAKOSHI et al., 1999), Fibrose (CHENG et al., 2005), Vasokonstriktion (RUIZ-ORTEGA et al., 2000), Hypertonie (FUNAKOSHI et al., 1999; CHENG et al., 2005), die Expression von vasoaktiven Substanzen (Endothelin und Aldosterone; CHENG et al., 2005), von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1 und ICAM-1; DOUILLETTE et al., 2006), von Chemokinen (z. B. MCP-1; CHEN et al., 1998; DOUILLETTE et al., 2006) und die Bildung von Matrix-Komponenten (Collagen und Fibronectin; FUNAKOSHI et al., 1999).

Zudem wird durch Angiotensin II ebenfalls über den AT1 Rezeptor die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) bewirkt. Es erhöht die Expression und die Aktivität der NADH/NAD(P)H Oxidase über multiple Signalwege (Phospholipase D-, Proteinkinase C-, Rac- und Src-abhängige Pathways; CHENG et al., 2005; SOHN et al., 2000), was endotheliale Dysfunktion und die Bildung von Peroxynitrit mit sich bringt (WATTANAPITAYAKUL et al., 2001). Die p22phox Untereinheit ist dabei als essenzielles Protein in der Aktivierung der NADPH-Oxidase von zentraler Bedeutung (MA et al., 2001).

Angiotensin II ist in allen Phasen der Atherogenese involviert. Die vaskuläre Permeabilität wird durch den durch Angiotensin II verstärkten Blutdruck und den daraus resultierenden Schädigungen am Endothel erhöht. Zudem ist Angiotensin II von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Leukozyten-Adhäsion an der Arterienwand bei kardiovaskulären Erkrankungen. Durch die Hochregulation proinflammatorischer Mediatoren in vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen wird die Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen an die Endothelzellen gesteuert. Neben dem Einfluss auf die Endothelpermeabilität sowie die Leukozyten-Adhäsion moduliert Angiotensin II Zellhypertrophie und -proliferation sowie Gewebefibrose. Die proliferationsstimulierenden Effekte werden über autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) reguliert (CHENG et al., 2005).

Der wichtigste Transkriptionsfaktor bei inflammatorischen Erkrankungen oder chronischen Immunantworten, ist der Nuclear Transcription Factor kappa-B (NF- κ B). Durch Stimuli wie z. B. der Freisetzung von Zytokinen (IL-6 und TNF- α) und Wachstumsfaktoren, mechanischen Kräften oder auch Angiotensin II, alle relevant bei kardiovaskulären Erkrankungen, kommt es zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors. NF- κ B reguliert Gene für Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine, Angiotensinogen und andere für die Zellproliferation und die Immunantwort wichtige Gene (RUIZ-ORTEGA et al., 2000; GUIJARRO und EGIDO, 2001).

Es wird also deutlich, dass das Hormon Angiotensin II in allen Phasen der Atherogenese eine zentrale Rolle spielt, aber auch in anderen inflammatorischen Prozessen, wie der Restenose, die im späteren Verlauf dieser Arbeit noch näher erläutert wird, von Bedeutung ist.

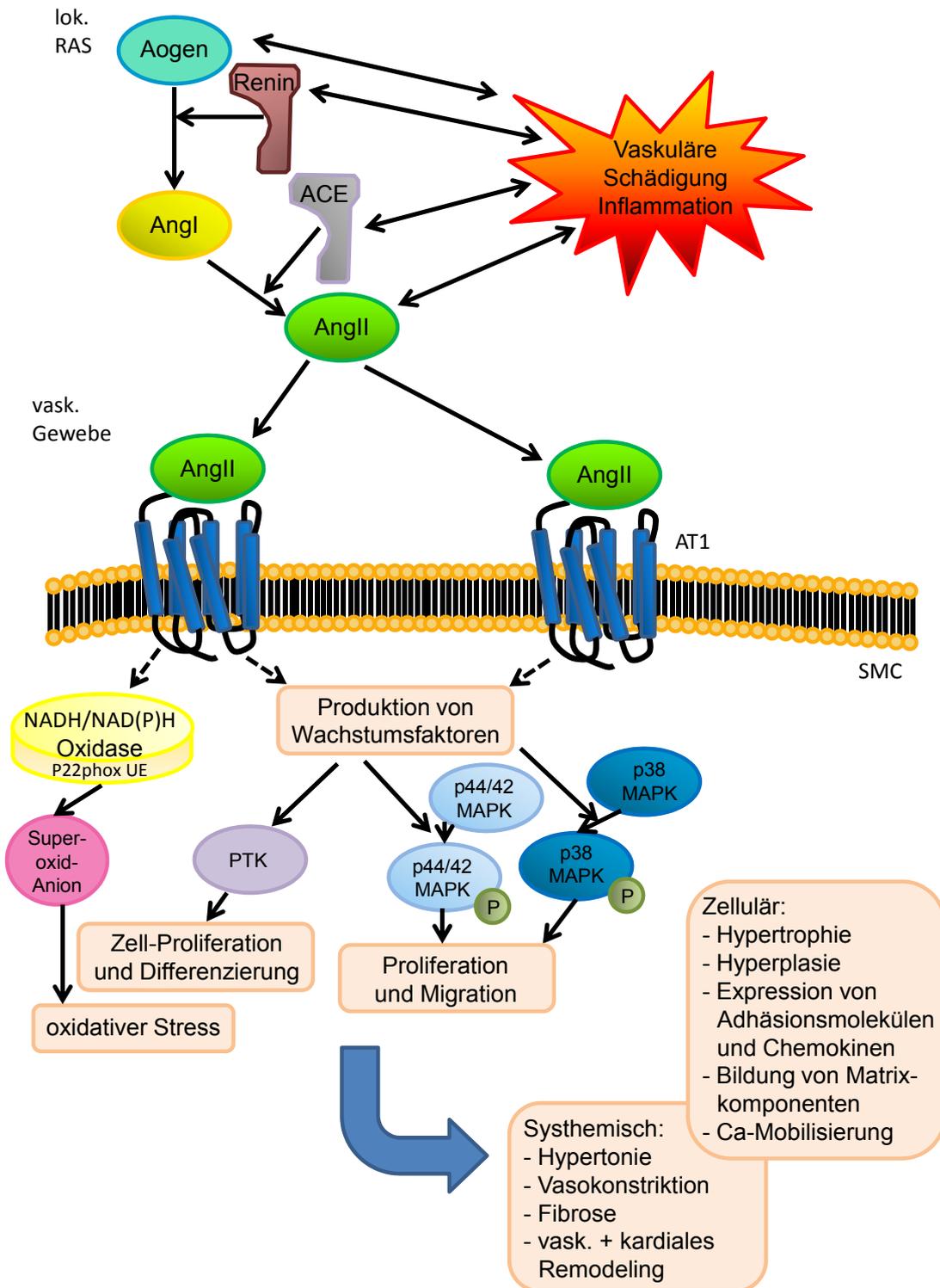


Abb. 2.2: Angiotensin II vermittelte kardiovaskuläre Reaktionen nach vaskulärer Schädigung
 Erläuterungen siehe Text; Abk.: Aogen: Angiotensinogen; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; AT1: Angiotensin II Typ 1 Rezeptor; PTK: Protein Tyrosinkinase; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
 -->: zusätzliche Signalwege

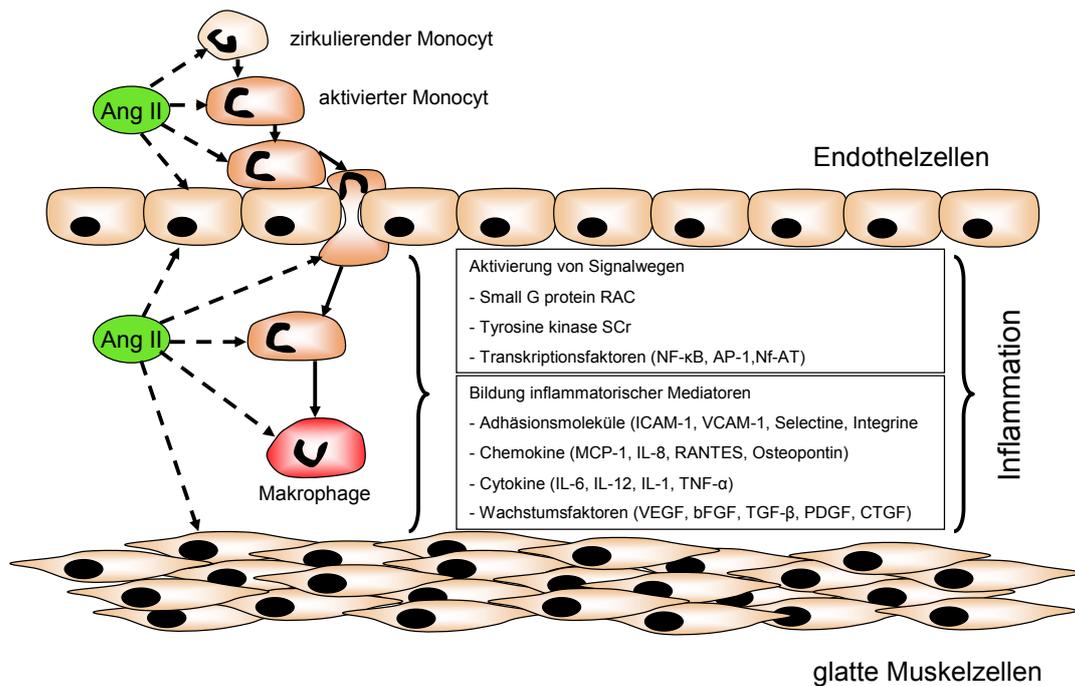


Abb.2.3: Mechanismen der Angiotensin II induzierten Inflammation (CHENG et al., 2005)

2.1.4. Koronare Herzkrankheit (KHK)

Die klinische Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzgefäße stellt die Koronare Herzkrankheit dar. Aus der Abnahme der koronararteriellen Perfusion des Herzens resultiert ein Missverhältnis zwischen zu geringem Sauerstoffangebot und zu hohem Sauerstoffbedarf des Herzmuskels. Es entstehen Folgeerkrankungen wie der Herzinfarkt, die Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen. Das Leitsymptom der Koronaren Herzkrankheit ist die Angina pectoris, umgangssprachlich auch als „Herzenge“ bezeichnet.

Der Krankheitsverlauf mündet in der Regel in den lebensbedrohlichen Phasen der Koronaren Herzkrankheit, man spricht dann vom akuten Koronarsyndrom. Kennzeichnend dafür ist eine instabile Angina pectoris, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt und dem plötzlichen Herztod (RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008).

2.1.5. Behandlung atherosklerotischer Läsionen und der Folgeerkrankungen

Bei der Behandlung von atherosklerotischen Läsionen unterscheidet man zwischen einer nicht invasiven (medikamentösen) und einer invasiven (Revaskularisierungs-) Therapie.

Die nicht invasive Therapieform hat zum einen das Ziel, die myokardiale Sauerstoffversorgung durch Senkung des Gefäßtonus in den Herzkranzgefäßen, der Verlängerung der Diastolendauer und der Senkung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (Vorlast) zu verbessern. Des Weiteren soll durch Senkung der Kontraktilität, der Herzfrequenz und der Nachlast der Sauerstoffbedarf des Herzens verringert werden. Weiterhin sind die Reduktion des Risikos eines thrombotischen Koronarverschlusses und die Senkung des LDL-Cholesterins

Stand der Forschung

als wichtigster Risikofaktor für die Koronare Herzkrankheit Ziele der medikamentösen Behandlung.

Tab. 1.1. Nicht invasive Behandlung atherosklerotischer Läsionen (RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008)

Medikament	Wirkweise
Betablocker	<ul style="list-style-type: none">- Senkung des Sauerstoffverbrauchs des Herzens → Therapie der ersten Wahl bei KHK- Präparate: Metoprolol, Bisoprolol, Carvedilol
Nitrate	<ul style="list-style-type: none">- Vor- und Nachlastsenkung- Koronardilatation
Calciumkanalblocker	<ul style="list-style-type: none">- Antianginös
ACE-Hemmer	<ul style="list-style-type: none">- Nachlastsenkung- Antiproliferativ durch Hemmung der Angiotensin II-Bildung- Nicht antianginös
Thrombozytenaggregationshemmer	<ul style="list-style-type: none">- Präparate: Acetylsalicylsäure, alternativ Clopidogrel- Aber: Blutungsgefahr (Pham et al., 2011)
Cholesterinsynthesehemmer	<ul style="list-style-type: none">- Statine- Senkung des LDL-Cholesterins (wichtigster Risikofaktor der KHK)- besondere Bedeutung bei manifester Erkrankung, da Gesamtcholesterin durch Diät allein nicht mehr ausreichend gesenkt werden kann

Für die invasive Revaskularisierung stehen zwei grundlegend verschiedene Therapieformen zur Verfügung: Katheterintervention und Bypass-Operation.

Bei einer nachweisbaren Stenose mit mehr als 75%igem Gefäßverschluss mit einer Ischämie im Versorgungsgebiet, ist eine minimalinvasive Katheterintervention indiziert, die zum Ziel hat, das stenotisierte Blutgefäß wieder zu eröffnen. Erste Schritte der Perkutanen Koronaren Intervention wurden 1964 durch DOTTER und JUDKINS beschrieben. 13 Jahre später führte ANDREAS GRÜNTZIG die erste perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) durch, was die Interventionen in der Kardiologie grundlegend veränderte und neue Wege in der Therapie von Herzerkrankungen eröffnete. Probleme dieser Behandlungsmethode bestanden jedoch in dem akuten Recoil des Blutgefäßes sowie in hohen Restenoseraten nach der Ballonangioplastie. Durch die Einführung von Blutgefäßstützen (Stents) Mitte der 80er Jahre konnten diese signifikant reduziert werden. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Stents aus unterschiedlichen Materialien, in verschiedenen Designs sowie Drug-Eluting Stents verfügbar. Die Mehrheit aller koronaren Interventionen erfolgt in Kombination mit einer Stentimplantation (LEVENSON, 2003; CURCIO et al., 2011; GARCÍA-GARCÍA et al., 2006; SERRUYS et al., 1994; FISCHMAN et al., 1994).

Weitere Formen der minimalinvasiven Katheterinterventionen stellen die Rotations-, Laser- oder Hochfrequenzangioplastie sowie die Atherektomie dar.

Perkutane transluminale koronare Interventionen werden in der Regel von einer medikamentösen Antikoagulations-Therapie begleitet (Clopidogrel für 6 Monate, Acetylsalicylsäure ohne zeitliche Begrenzung; RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008).

Die primäre Erfolgsquote liegt bei 90-95 %, innerhalb von 6 Monaten sind jedoch bei 20-60 % der Patienten eine Restenose sowie pektangiöse Beschwerden beobachtbar (SLAVIN et al., 2007; RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008). Bei perkutanen koronaren Interventionen mit Stentimplantation liegt die Quote je nach Komorbidität, Gefäßgröße, Patientenkollektiv, anatomischer Morphologie und Komplexität der Gefäßläsion bei 10-30 % (LÜSCHER et al., 2007; MOULIAS und ALEXOPOULOS, 2011; LEVENSON, 2003).

Die Restenose und die Late Stent Thrombose sind nach wie vor die Probleme der minimalinvasiven perkutanen koronaren Intervention.

Ist die Angina pectoris durch eine medikamentöse Therapie oder einer Katheterintervention nicht mehr beherrschbar, muss der stenotisierte Gefäßabschnitt mittels einer Bypass-Operation umgangen werden. Eine weitere Indikation für diesen invasiven Eingriff stellt zudem eine koronare Mehrgefäßerkrankung dar. 80 % der so behandelten Patienten sind postoperativ beschwerdefrei, 10-20 % der Venenbypässe verschließen sich jedoch innerhalb des ersten Jahres, 20-30 % innerhalb von 5 Jahren (RENZ-POLSTER und KRAUTZIG, 2008).

2.2. Hauptkomplikation: Restenose und in-Stent Restenose

Der Erfolg perkutaner transluminaler koronarer Interventionen wird durch den Wiederverschluss (Restenose) des behandelten Blutgefäßabschnitts limitiert. Um mögliche Therapieansätze zur Reduktion dieser Problematik zu entwickeln, müssen die restenotischen Prozesse grundlegend verstanden werden.

Bei der Restenose handelt es sich um einen Wundheilungsprozess als Reaktion auf die mechanische Verletzung nach einer Katheterintervention. Durch die direkte Verletzung glatter Gefäßmuskelzellen, der Deendothelialisierung, der Thrombus-Deposition und Plaquezerstörung sowie der Überdehnung des Blutgefäßes bei dem Eingriff wird die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen und die Deposition der extrazellulären Matrix und damit die neointimale Hyperplasie und ein Gefäßremodeling induziert (CURCIO et al., 2011; WELT und ROGERS, 2002; COSTA und SIMON, 2005). Beim neointimalen Wachstum und der Lumenverengung des betroffenen Gefäßes spielen inflammatorische Prozesse eine zentrale Rolle (WELT und ROGERS, 2002; WELT et al., 2003).

Durch den Einsatz von Stents, der stetigen Verbesserung des Stentdesigns, der Optimierung der Implantationstechnik, dem zunehmendem Wissen über den Mechanismus der Restenoseentstehung und Weiterentwicklungen in der flankierenden Pharmakotherapie konnten die Akutergebnisse kurzfristig gesichert und verbessert werden. Die Restenose bleibt jedoch weiterhin eine signifikante Limitation des Langzeiterfolges (WELT und ROGERS, 2002; LEVENSON 2003). Die Restenose findet als Prozess in drei Phasen statt:

- Inflammatorische Phase
- Zelluläre Proliferation

- Remodeling sowie Synthese extrazellulärer Matrixproteine (FORRESTER et al., 1991; WELT und ROGERS, 2002; RAFFETTO und KHALIL, 2008).

Inflammatorische Phase:

Die Rekrutierung und die Infiltration von Leukozyten erfolgen am Ort der vaskulären Schädigung. Diese ist durch eine Störung des Zellzusammenhangs des Endothels sowie durch die Anlagerung von Blutplättchen und Fibrin gekennzeichnet. Die Interaktion zwischen Blutplättchen und Leukozyten spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der inflammatorischen Reaktion.

Durch Schädigung des Endothels gehen antithrombotische Faktoren wie NO, Prostaglandin und Tissue Plasminogen Activator verloren, was die Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen zur Folge hat (SLAVIN et al., 2007). Aktivierte Blutplättchen exprimieren Adhäsionsmoleküle wie P-Selectin und Glycoprotein (GP) Iba. Über Plättchenrezeptoren wie P-Selectin- und Glycoprotein-Ligand werden Leukozyten locker an die Blutplättchen gebunden und „rollen“ entlang der geschädigten Oberfläche. Durch den Einfluss von Zytokinen folgt die feste Adhäsion und Migration über die Blutplättchen. Es handelt sich dabei um einen Integrin-abhängigen Prozess (WANG et al., 2012). Das in Neutrophilen und Monozyten vorkommende Mac-1 (β_2 -Integrin) ist bei der Leukozytenbindung nach einer vaskulären Verletzung dabei von zentraler Bedeutung. Die Migration der Leukozyten über die Blutplättchen-Fibrin Oberfläche in das Gewebe wird durch die Zytokinfreisetzung von glatten Gefäßmuskelzellen und im Gewebe vorkommenden Leukozyten zusätzlich begünstigt (WELT und ROGERS, 2002).

Zelluläre Proliferation:

Die von Blutplättchen, Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen freigesetzten Zytokine Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) wirken mitogen und agieren als chemotaktische Faktoren für glatte Muskelzellen (SMCs) und Makrophagen. Dadurch wird die Proliferation von vaskulären Zellen wie SMCs und Monozyten/Makrophagen und die Migration der SMCs aus der Media in die Neointima begünstigt (WELT und ROGERS, 2002; COSTA und SIMON, 2005). Die Makrophagen setzen zudem PDGF und Interleukin-6 frei, was zusätzlich stimulierend auf die glatten Gefäßmuskelzellen wirkt.

Normalerweise besitzen die in der *Tunica Media* lokalisierten, kontraktilen SMCs nur eine geringe proliferative Aktivität, sie befinden sich somit in der G_0 -Phase des Zellzyklus. Durch die mechanische Verletzung und die freigesetzten Wachstumsfaktoren erfolgt ein phänotypischer Wechsel zu Myofibroblasten mit synthetisierenden, sekretorischen, proliferativen und migratorischen Charakteristika; die Zellen gehen nun in die G_1/S Phase des Zellzyklus über.

Die Progression von der G_0 in die G_1 Phase wird durch die Cyclin-Dependent Kinase (CDK) reguliert. Unter physiologischen Bedingungen wird durch die Präsenz endogener Inhibitoren

der CDK, wie p21^{cip1}, p27^{kip1} und Molekülen der INK4 Familie, der Übergang aus der G₁ in die G₀-Phase des Zellzyklus reguliert und somit die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen drastisch eingeschränkt. Vaskuläre Inflammation und Verletzungen reduzieren den Level von p27^{kip1}, was die Ruhephase der SMCs beendet und diese zur erhöhten Proliferation befähigt (SLAVIN et al., 2007).

Da auch die SMC-Migration durch den Zellzyklus reguliert wird, SMCs haben nur in der G₁ Phase des Zellzyklus und zu keinem späteren Zeitpunkt nach einem mitogenen Stimulus die Möglichkeit zu migrieren, werden die glatten Muskelzellen durch den Wechsel aus der G₀ in die G₁-Phase des Zellzyklus zur Migration befähigt.

Durch die Änderung des Phänotyps von kontraktile zu synthetisierend, sekretorisch, proliferativ und migratorisch erfolgt die Ausbildung einer Neointima mit folgender Wiederverengung des behandelten Blutgefäßabschnittes (WELT und ROGERS, 2002; COSTA und SIMON, 2005; SLAVIN et al., 2007).

Remodeling sowie Synthese extrazellulärer Matrixproteine:

In dem Prozess, auch als negatives Remodeling bezeichnet, werden zudem zahlreiche Matrixproteine in das Blutgefäßlumen sezerniert. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt das ECM (extrazelluläre Matrix)-Remodeling (Abbau und Resynthese von Bestandteilen der ECM) einer strengen Regulation und befindet sich im Gleichgewicht. Während der Ausbildung der Neointima erfolgt eine erhöhte Produktion von ECM-Bestandteilen, was über längere Zeit einen Wechsel zu einem geringeren zellulären Anteil in der Neointima führt. Die ECM der Neointima enthält verschiedene Kollagensubtypen (Typ 1 und III) und Proteoglycane, welche Hauptbestandteile der entstehenden restenotischen Plaque sind. Der Prozess der Neointimabildung umfasst zudem auch die Reendothelialisierung der verletzten Oberfläche.

Die Kombination aus Elastic Recoil, der Neointima-Bildung durch Inflammation und zellulärer Proliferation und Migration sowie dem negativen Remodeling führt zu den hohen Restenoseraten nach Ballonangioplastie (WELT und ROGERS, 2002; COSTA und SIMON, 2005; SLAVIN et al., 2007; RAFFETTO und KHALIL, 2008).

2.3. Drug Eluting Stents

Die „Erste Revolution“ der interventionellen Kardiologie wurde Ende der 70er Jahre durch die Einführung der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie durch GRÜNTZIG geprägt. Die PTCA bewirkte jedoch ballonassoziierte Probleme wie das Elastic Recoil, das eingeschränkten Remodeling, der vaskulären SMC-Proliferation und somit der neointimalen Hyperplasie, was restenotische Prozesse und somit den Wiederverschluss des behandelten Blutgefäßes bei bis zu 60 % der Patienten zu Folge hatte. Mitte der 80er Jahre wurde diese Problematik durch die Einführung des Metallstents (BMS) reduziert, der „Zweiten Revolution“ der interventionellen Kardiologie. Da die Restenoserate mit 20-30 % immer noch sehr hoch

war, wurden Drug-Delivery Systeme zur lokalen Applikation antiproliferativer, restenosehemmender Pharmaka am Ort der Neointimabildung entwickelt und in der Stenttechnologie angewendet. Die Einführung der Drug-Eluting Stents (DES) führte zur „Dritten Revolution“ in der interventionellen Kardiologie.

Die erste DES-Implantation im Menschen wurde im Dezember 1999 durch SOUSA in Sao Paulo (Cypher SES [Sirolimus-Eluting Stent]) durchgeführt (MOSES et al., 2003). Gleichzeitig erfolgte auch die Entwicklung des TAXUS PES (Paclitaxel-Eluting Stent; STONE et al., 2004). Zunächst hatten DES eine sehr gute Erfolgsquote, perkutane Revaskularisierungsmaßnahmen wurden deutlich weniger notwendig als bei der Verwendung von BMS, was einen rasant steigenden Einsatz von DES nach sich zog. Dieser erste Enthusiasmus wurde durch die Erkenntnis der Late Stent Thrombose (LST) gedämpft (MAHMOUDI et al., 2011). Im Jahr 2006 berichtete CAMENZIND auf dem European Society of Cardiology Congress von einer signifikant höheren Sterberate durch Myokardinfarkt nach DES-Implantation (6,3 %) als nach einer Intervention mit einem klassischem Metallstent (3,9 %) (CURCIO et al., 2011). Zudem haben Patienten, deren atherosklerotische Läsion durch PCI mit DES-Implantation behandelt wurden ein wesentlich längeres thrombotisches Risiko als Patienten nach BMS-Implantation (HAO et al., 2011).

Trotzdem besteht das Ziel weiterhin darin, DES sicherer zu machen. Es soll die SMC-Proliferation bei gleichzeitiger Begünstigung der Endothelialisierung inhibiert werden.

Prinzip medikamentenfreisetzender Stents:

Stentdesigner bezwecken die Herstellung effektiver Blutgefäßstützen mit maximaler Sicherheit. Neben einer optimalen Flexibilität müssen Stents gut führ- und darstellbar sein sowie eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Die Stentstruktur beeinflusst die Eigenschaften des Stents maßgeblich. Sowohl Elastic Recoil als auch zu hohe Steifigkeit können bei Katheterinterventionen zu Problemen führen (BARRAGAN et al., 2000; ORMISTON et al., 2000). Zudem kann das Design des Stents die Fließeigenschaften intravaskulärer Zellen und somit den Heilungsprozess und die neointimale Hyperplasie beeinflussen. Somit haben Unterschiede in Stentdesign und -geometrie auch Einfluss auf den späten Gefäßwiederverschluss und die neointimale Proliferation, was sich wiederum auf die Restenoserate und die Quote nachfolgender Interventionen auswirkt (HOFFMANN et al., 2001). Neben dem Stentdesign und der -geometrie hat auch das Material maßgeblich Einfluss auf die Stenteigenschaften. Stents der „Ersten Generation“ wurden in der Regel aus 316 L Edelstahl hergestellt, es wurden aber auch andere Materialien wie beispielsweise eine Kobalt-Chrom Legierung (MULTI-LINK VISION Stent) verwendet. In der Weiterentwicklung von Stentmaterialien hat sich die Forschung zunehmend auf Drug-Delivery Systeme konzentriert und Drug-Eluting Stents mit lokal freisetzenden, restenosehemmenden Medikamenten, die einen Wiederverschluss durch Verdickung der Intima des Blutgefäßes verhindern sollen,

entwickelt. Diese Pharmaka müssen dazu in zelluläre Signalwege eingreifen, die in der Inflammation, Migration, Proliferation und Sekretion von ECM involviert sind.

DES haben in der Regel eine Polymerbeschichtung als Reservoir, in der Medikamente inkorporiert und kontrolliert freigesetzt werden, was definierte pharmakologische, pharmakokinetische, physikochemische und mechanische Anforderungen an Wirkstoff und Trägermatrix, Medikamenten-Konzentration und Polymerrezeptur (Formulierung) voraussetzt (DOOSTZADEH et al., 2010; GARCÍA-GARCÍA et al., 2006).

Die Trägersubstanz muss biologisch inert und sterilisierbar sein, während der Expansion konform bleiben und mechanisch resistent gegen Abrasion während der Implantation sein.

Entsprechende Materialien müssen eine kontrollierbare und sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige Medikamentenfreisetzung zulassen. Sie dürfen keinesfalls thrombogene oder inflammatorische Effekte auf die Blutgefäßwand und das Gewebe ausüben.

Je nach Medikament sind heute verschiedene Trägersubstanzen verfügbar. Es handelt sich meistens um Polymerbeschichtungen mit biokompatiblen, nichterodierbaren, biodegradierbaren oder bioabsorbierbaren Eigenschaften, es befinden sich aber auch andere Beschichtungen wie z. B. Keramik im Einsatz.

Ein effektiver, in einen DES inkorporierter Wirkstoff sollte komplexe Signalwege, die zur neointimalen Hyperplasie nach Stentimplantation führen, inhibieren. Dabei stellen inflammatorische und proliferative Mechanismen des normalen Heilungsprozesses und die spezifische Rolle von Komponenten des Bluts und der Gefäßwand in der Gefäßwiederherstellung Angriffsziele für potenzielle Therapeutika dar, um die neointimale Proliferation zu reduzieren. Die klinischen Effekte von DES sind also von den einzelnen Komponenten sowie deren Wechselwirkungen abhängig (ONG und SERRUYS, 2005).

Zu den bekannten Drug-Eluting Stents gehören u. a. der Sirolimus-Eluting Stent (SES; Cypher®; Cordis Corporation, Miami Lakes, FL, USA), der Paclitaxel-Eluting Stent (PES; Taxus®; Boston Scientific Corporation, Maple Grove, MN, USA; NAKAZAWA et al., 2007), der Everolimus-Eluting Stent (EES; Xience V®; Abbot Vascular, Santa Clara, CA, USA) und der Zotarolimus-Eluting Stent (ZES; Endeavor ®; Medtronic Vascular, Santa Rosa, CA, USA; BYRNE et al., 2009). Erläuterungen dazu sind dem Anhang zu entnehmen.

2.4. Late Stent Thrombose

Die zentrale Komplikation nach der Implantation von Drug-Eluting Stents ist die Late Stent Thrombose (LST; GARG und MAURI, 2007; GERALDES et al., 2008).

Bei der In-Stent Thrombose wird nach dem Zeitraum des Auftretens der Komplikation nach Stent-Implantation unterschieden. Nach:

- < 24 h: Akute Stent Thrombose
- < 30 Tage: Subakute Stent Thrombose
- > 30 Tage: Late Stent Thrombose

- > 12 Monate: Very Late Stent Thrombose (LÜSCHER et al., 2007; SERRUYS und DAEMEN, 2007).

Verschiedene Faktoren können zur In-Stent Thrombose führen. Behandlungsabhängige Faktoren umfassen eine schlechte Positionierung des Implantats, eine Unterexpansion, falsche Stentlänge, ein persistierender langsamer koronarer Blutfluss, die Platzierung mehrerer Stents bei multiplen Läsionen oder eine Malapposition bzw. eine Late Stent Fehlposition durch eine Thrombenlösung. Diese Faktoren können während der Intervention verhindert werden und es sind keine Unterschiede zwischen DES und BMS beschrieben.

Zu den patienten- und läsionsabhängigen Faktoren werden eine geringe Ejektionsfraktion, Diabetes mellitus, fortgeschrittenes Alter, die Stentimplantation bei akutem Koronarsyndrom, ASS- und/oder Clopidogrel-„Resistenz“, Nierenfunktionsstörung und der Myokardinfarkt gezählt. Gerade Patienten mit akutem Koronarsyndrom haben eine verzögerte Heilung und verringerte Endothelialisierung in der inflammatorischen und thrombogenen Umgebung des exponierten nekrotischen Kerns sowie eine verstärkte Blutplättchenreaktivität. Zudem begünstigt die Stentimplantation in Gefäßen mit ostialen und Bifurkationsstenosen oder in Abschnitten mit einer In-Stent Restenose die Entstehung von LST (SILBER et al., 2008).

Eine verstärkte Blutgerinnung ist ein wichtiger Mechanismus in der Prognose von LST. Zum einen können Stents als Fremdkörper eine Fremdkörperreaktion mit Blutplättchenaggregation und somit die Aktivierung der Gerinnungskaskade induzieren. Zum anderen kann durch die Stentdilataion mit zu hohem Druck oder einem störrischen Ballon eine signifikante vaskuläre Schädigung verursacht werden, wodurch es zur Freisetzung von thrombogenen Molekülen aus *Subintima* und *Media* inklusive Plaquematerial in den Blutstrom kommt.

Die Thrombogenität des Stents liegt zum einen in Stentdesign (z. B. Stentstrut-Größe) und zum anderen in Material (z. B. Polymertyp) und Wirkstoffinkorporation begründet.

Die Wirkstoffe in Sirolimus-Eluting Stents (SES) und in Paclitaxel-Eluting Stents (PES) wurden in nicht-erodierbaren Polymeren inkorporiert, was eine chronische Infiltration von Eosinophilen der Arterienwand und somit eine Hypersensitivitätsreaktion verursachen kann. Zudem wurden für Sirolimus und Paclitaxel prothrombogene Effekte beschrieben. Beide Wirkstoffe penetrieren auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften leicht in die Zellen der Gefäßwand, was zur chronischen Retention des Medikaments in der Arterienwand führt. Somit wird die Tissue Factor Expression induziert, was eine prothrombotische Umgebung nach der Implantation des Drug-Eluting Stents schafft und somit das Phänomen der Late Stent Thrombose begünstigen kann.

Nach vaskulärer Schädigung folgt im Rahmen der Heilungsreaktion normalerweise auch eine Endothelialisierung des geschädigten Gewebes bzw. des Implantats. Die Wirkstoffe Sirolimus und Paclitaxel hemmen jedoch nicht nur SMC-Proliferation und -Migration sondern supprimieren auch Endothelzellen sowie die Proliferation, Migration und Differenzierung von

Endothel-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Dieser Zusammenhang führt zu einer Reduktion der endothelialen Heilungsreaktion und somit zu einer Erhöhung der Thrombogenität von Sirolimus-Eluting und Paclitaxel-Eluting Stents (LÜSCHER et al., 2007; SILBER et al., 2008)

2.5. Östrogene als Wirkstoffe in der DES-Technologie

Kardioprotektive Eigenschaften von Östrogenen wurden in den letzten 2 Jahrzehnten von vielen Autoren publiziert (u. a. STAMPFER et al., 1991; MENDELSON und KARAS, 1999; The Writing Group for the PEPI Trial, 1995). Es wurde gezeigt, dass Frauen nach der Menopause ein erhöhtes Risiko aufweisen, an kardiovaskulären Störungen zu erkranken. Es besteht also eine direkte Verbindung zwischen der körpereigenen Östrogenkonzentration und deren Einfluss auf das kardiovaskuläre System, insbesondere dem Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten (MATURANA et al., 2007; SIMONCINI et al., 2007).

Zudem wurde in epidemiologischen Studien gezeigt, dass durch die Gabe von Östrogen in der Hormon-Ersatz-Therapie menopausaler Frauen das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen reduziert werden konnte (STAMPFER et al., 1991; GRODSTEIN et al., 2000). Die Applikation von Östrogenen konnte außerdem das Risiko atherosklerotischer Läsionen sowie restenotische Vorgänge nach PCI reduzieren (ABU-HALAWA et al., 1998; WU et al., 2003).

DUBEY et al., 2000, DAI-DO et al., 1996 und GERALDES et al., 2003 zeigten, dass das Östrogen 17 β -Estradiol die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen hemmt, CONCINA et al., 2000 konnten zudem nachweisen, dass die Migration und Proliferation von Endothelzellen begünstigt werden. Zudem wurde eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie und die Reendothelialisierung im Tiermodell Schwein (CHANDRASEKAR et al., 2005; CHANDRASEKAR et al., 2001; NEW et al., 2002; KYRIAKIDES et al., 2006; GERALDES et al., 2008) sowie im Kaninchen (HAN et al., 2007) nachgewiesen. SCHNAPER und Mitarbeiter haben in einem Übersichtsartikel zudem die positiven Auswirkungen von Östrogenen auf die endotheliale Zellbiologie beschrieben (SCHNAPER et al., 2000).

Die Literaturdaten des Östrogens 17 β -Estradiol sollen im Rahmen dieser Arbeit verifiziert und dessen Wirkweise weiter aufgeklärt werden.

2.5.1. 17 β -Estradiol – Wirkweise und Bedeutung für die Restenose-Prävention

Bei 17 β -Estradiol (1,3,5(10)-estradiene-3,17 β -diol) handelt es sich um ein C18 Steroidhormon mit einem Phenol-A-Ring, welches sowohl das weibliche als auch das männliche reproduktive System beeinflusst.

Struktur: C₁₈H₂₄O₂

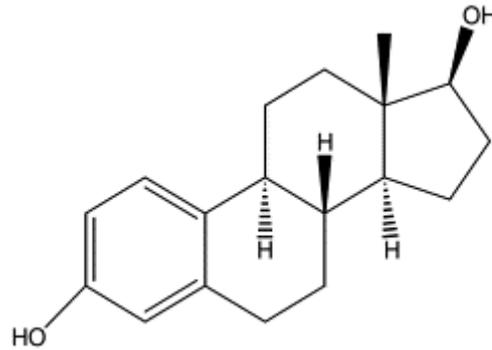


Abb. 2.4: Strukturformel von 17β-Estradiol (DYKENS et al., 2004)

Mit einem Molekulargewicht von 272,4 g/mol ist es eines der wichtigsten natürlichen Östrogene und wird vom Grafschen Follikel, der weiblichen Follikel und der Plazenta produziert, in kleineren Mengen auch von den Nebennieren und den männlichen Hoden gebildet (TSANG et al., 1980; GORE-LANGTON et al., 1988; PENTIKÄINEN et al., 2000).

Über die Östrogenrezeptoren ERα und ERβ ist 17β-Estradiol in die Regulation von verschiedenen Targets involviert. Die Östrogenrezeptoren gehören zur Steroid/Thyroid Hormon Rezeptor Superfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen DNA- und Ligandenbindungsdomänen und regulieren Gene, die vaskuläre Strukturen und Funktionen beeinflussen. Die Rezeptor-Ligand Interaktion setzt eine Signalkaskade in Gang, wie die Dissoziation von Hitzeschockproteinen, die Rezeptordimerisation, Phosphorylierung, Translokation in den Zellkern und die Assoziation mit spezifischen Zielgenen, was die Aktivierung verschiedener biologischer Prozesse mit sich führt (GERALDES et al., 2003). Die Östrogenrezeptoren ERα und ERβ haben eine ähnlich hohe Affinität zu 17β-Estradiol (PENTIKÄINEN et al., 2000).

Das Steroidhormon 17β-Estradiol beeinflusst so umfassend kardiovaskuläre Prozesse. Neben der positiven Veränderung der Plasmalipidzusammensetzung (WALSH et al., 1991) erfolgt die Reduktion der Plättchen und Monozyten-Akkumulation sowie der Kollagen- und Elastin-Synthese und/oder -Deposition (DUBEY et al., 2000). 17β-Estradiol bewirkt zudem die Hemmung der PDGF-induzierten Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen (DAI DO et al., 1996; KOLOGIE et al., 1996; SUZUKI et al., 1996; SOMJEN et al., 1998), wahrscheinlich über die Hemmung der Angiotensin II Rezeptor 1 (AT1)-vermittelten Aktivierung von Extracellular signal-Regulated Kinases (ERKs; LIU et al., 2002). Ein Großteil aller Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli wird über Kinase- und Phosphatase-Pathways reguliert. Eine der wichtigsten Kinase-Familien in inflammatorischen Zellen stellen die hochkonservierten Mitogen-Activated-Protein-Kinasen (MAPKs) dar. Für Säuger sind vier Subfamilien der MAPK bekannt: 1. Extracellular signal-regulated Kinases (ERK1/2; bekannt auch als p44/42 MAPK, 2. c-jun N-terminal Kinases (JNKs; auch als Stress-Activated Kinases (SAPKs) bezeichnet, 3. ERK5/big MAP Kinase 1 (BMK1) und 4. p38 MAPKs (LUO und REIDY, 2002). Die für diese Arbeit interessanten p44/42 MAPK sind hauptsächlich in Pathways des

Zellwachstums und -differenzierung involviert. Die beiden verwandten ERKs p44 MAPK (ERK1) und p42 MAPK (ERK2) werden ubiquitär exprimiert. Die Aktivierung dieser Pathways durch Phosphorylierung führt zur Aktivierung von Nuclear Transcription Factors und anderen, im Cytoplasma lokalisierten Kinasen und somit unter anderem zur Stimulation zellulärer Proliferation und Migration (KOISTINAHO und KOISTINAHO, 2002).

Es ist jedoch bekannt, dass durch 17 β -Estradiol die Angiotensin II-Bildung durch Einfluss auf den Renin-Angiotensin-Pathway gehemmt wird, was die Expression des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (AT1), über den sämtliche kardiovaskuläre Auswirkungen des Hormons reguliert werden (NICKENIG et al., 1998), inhibiert. Die Modulation der Angiotensin II Konzentration erfolgt durch die Inhibierung des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und somit der Reduktion von zirkulierendem Angiotensin II (BROSNIHAN et al., 1999). Möglicherweise reguliert 17 β -Estradiol aber auch die AT1 Rezeptor Expression durch die Manipulierung der AT1 Rezeptor Genexpression (WU et al., 2003). Durch die 17 β -Estradiol-vermittelte Hemmung des AT1-Rezeptors soll die p44/42-MAPK-Expression und Aktivierung in SMCs reduziert werden, wodurch eine SMC-Proliferationshemmung resultiert (DUBEY et al., 2000; GERALDES et al., 2003). Die Proliferationsregulation erfolgt neben den ERKs auch über die Proteintyrosinkinasen. Die Tyrosin-Phosphorylierung ist ein fundamental wichtiger Mechanismus in der Signal-Transduktion und Regulation in allen eukaryotischen Zellen und steuert viele Prozesse wie u. a. Zellwachstum, -differenzierung und -entwicklung, metabolische Homöostase, und Gentranskription (HUNTER, 2009). Es handelt sich bei der Tyrosin-Phosphorylierung in vivo um einen reversiblen und dynamischen Prozess, der durch die gegensätzlich arbeitenden Proteine Protein-Tyrosin Kinase und Protein-Tyrosin Phosphatase reguliert wird (BURKE und ZHANG, 1998).

Neben der Proliferationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen ist für 17 β -Estradiol bekannt, die Endothelialisierung (CONCINA et al., 2000; CHANDRASEKAR et al., 2005; LIU et al., 2002) u. a. durch eNOS-Expression zu stimulieren (KIM et al., 2006, MIYAZAKI-AKITA et al., 2007). Dadurch wird die Stimulation von Endothelzellen bewirkt (ODENLUND et al., 2008), was sich durch eine erhöhte Expression und Aktivierung des p44/42 MAPK-Pathways in vaskulären ECs widerspiegelt (GERALDES et al., 2002). GERALDES et al. publizierten 2003 in diesem Zusammenhang, dass dieser biphasische Effekt in SMCs durch die ER β -vermittelte Inhibierung der p44/42 und p38 MAPK Phosphorylierung entsteht, in ECs durch die ER α -vermittelte Induktion der p44/42 und p38 MAPK Phosphorylierung.

Desweiteren wird für 17 β -Estradiol die Fähigkeit zur Hemmung des Fibrinogen Plasminogen Activator Inhibitors beschrieben, was auf ein fibrinolytisches Potential schließen lässt (KOH et al., 1997).

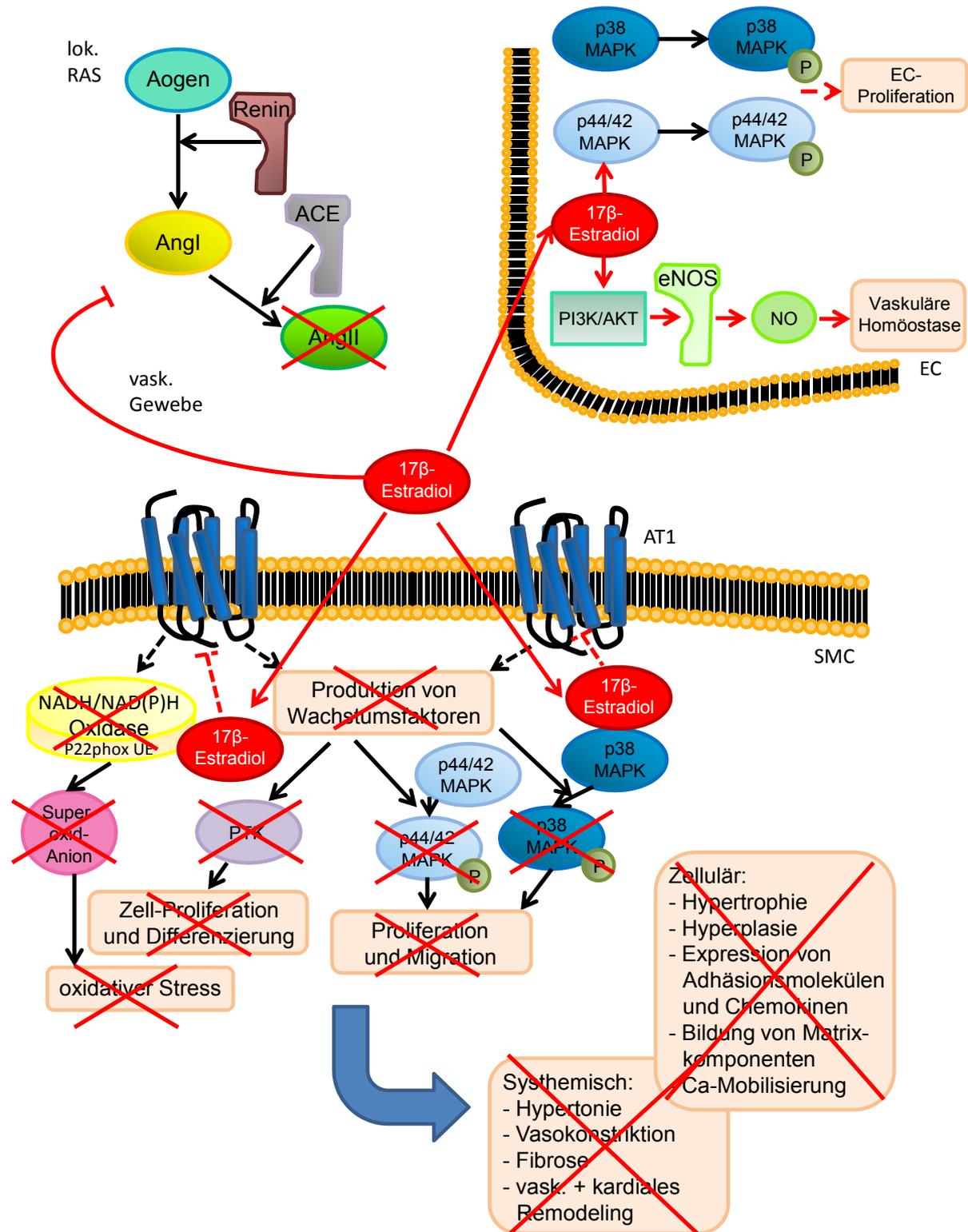


Abb. 2.5: Die Wirkweise von 17β -Estradiol auf AT1-vermittelte vaskuläre Reaktionen nach vaskulärer Schädigung
 Erläuterungen siehe Text; Abk.: Aogen: Angiotensinogen; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; AT1: Angiotensin II Typ 1 Rezeptor; PTK: Protein Tyrosinkinasen; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinasen
 --> : zusätzliche Signalwege

Zusätzlich wurde für 17β -Estradiol die Induktion der NO-Produktion durch vaskuläre Endothelzellen aufgezeigt (HAYASHI et al., 1995; SIMONCINI et al., 2000; DUBEY et al., 2000;

HISAMOTO et al., 2000). Durch 17β -Estradiol erfolgt eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)/Akt, was wiederum zur Aktivierung von eNOS und zur Erhöhung der NO-Produktion führt (HAYNES et al., 2000). NO ist in der vaskulären Homöostase durch den Einfluss auf Endothel- und glatte Muskelzellen sowie auf Leukozyten und Blutplättchen von zentraler Bedeutung (ALBRECHT et al., 2003).

Bei schädigungsbedingten inflammatorischen Prozessen ist die NO-Produktion in der Gefäßwand gestört, was die neointimale Hyperplasie und das Negative Remodeling begünstigt. Die Wirkweise von 17β -Estradiol auf AT1-vermittelte vaskuläre Reaktionen nach vaskulärer Schädigung ist in Abb. 2.5 zusammenfassend dargestellt.

Die biphasische Wirkweise von 17β -Estradiol auf unterschiedliche vaskuläre Zelltypen macht diesen Wirkstoff sehr interessant. Auf Grund der beschriebenen kardioprotektiven Effekte soll 17β -Estradiol als Referenz in dieser Arbeit herangezogen werden, um für weiterführende Untersuchungen am Phytoöstrogen Genistein Vergleichswerte vorliegen zu haben.

2.5.2. Genistein – Einsatz von Phytoöstrogenen als Alternative zu 17β -Estradiol

Da 17β -Estradiol trotz der kardioprotektiven Eigenschaften nachteilige Effekte zum einen auf das reproduktive System sowohl bei Frauen als auch Männern hat und zusätzlich kanzerogen wirkt (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 1997; COLDITZ, 1999; PICKAR et al., 1998), ist das therapeutische Potenzial und somit die Einsetzbarkeit eingeschränkt (SQUADRITO et al., 2000; DUBEY et al., 1999). Eine Alternative zu 17β -Estradiol stellt das Phytoöstrogen Genistein dar. Es ist 17β -Estradiol in der chemischen Struktur sehr ähnlich und es wurden von vielen Autoren ebenso kardioprotektive Effekte (CLARKSON, 2002) wie proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften auf glatte Gefäßmuskelzellen (YU et al., 2008; PAN et al., 2001). und eine Begünstigung der Endothelzellproliferation (XIANG et al., 2010) beschrieben.

Das Isoflavon Genistein (5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one) ist in zahlreichen Pflanzen wie der Sojabohne, der Lupine oder der Ackerbohne zu finden (COWARD et al., 1993; KAUFMAN et al., 1997) und interagiert mit den tierischen und humanen Östrogenrezeptoren mit vergleichbaren Effekten wie die Östrogene.

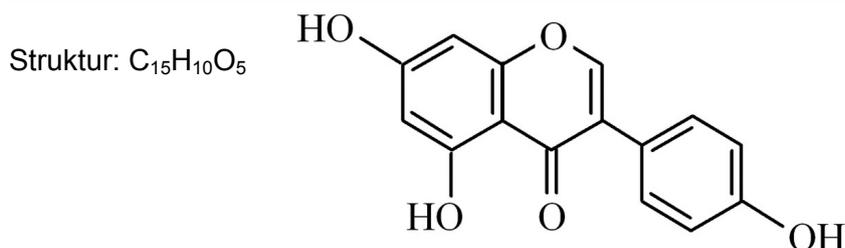


Abb. 2.6: Strukturformel von Genistein (WOOD et al., 2006)

Für das in Blutgefäßen sowohl Östrogenrezeptor-abhängig als auch -unabhängig agierende Phytoöstrogen Genistein (CLARKSON et al., 1998) wurden positive Auswirkungen auf atherosklerotische Läsionen und kardiovaskuläre Risikofaktoren beschrieben (ANTHONY et al., 1998; VAN DER SCHOUW et al., 2000; WANGEN et al., 2001). Daraus lässt sich neben der östrogenen Wirkweise (AN et al., 2001) ein protektiver Effekt durch hypolipideme (CASSIDY und HOOPER, 2006) und antioxidative Eigenschaften (RUIZ-LARREA et al., 1997) bei kardiovaskulären Ereignissen ableiten (ANTHONY et al., 1996; KONDO et al., 2002).

Genistein kann genauso wie 17β -Estradiol die Östrogenrezeptoren stimulieren, wobei eine feste Bindung an ER β erfolgt. Dabei ist es aber 1/3 potenter als 17β -Estradiol (KUIPER et al., 1998). Genistein ist vergleichbar mit 17β -Estradiol in der Lage den AT1 Rezeptor zu hemmen. Wie in vorhergehenden Kapiteln erläutert, werden über den AT1 Rezeptor zahlreiche Mechanismen während des Tissue Remodelings nach vaskulärer Verletzung und Inflammation reguliert, wie unter anderem die p44/42 MAPK-vermittelte Zellteilung von SMCs (MEIJERING et al., 2009), Hypertrophie und Hyperplasie (DOUILLETTE et al., 2006; FUNAKOSHI et al., 1999), Fibrose (CHENG et al., 2005), Vasokonstriktion (RUIZ-ORTEGA et al., 2000), Hypertonie (FUNAKOSHI et al., 1999; CHENG et al., 2005) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS; CHENG et al., 2005; SOHN et al., 2000).

Es wurden wie für das Phytoöstrogen Genistein proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften auf glatte Gefäßmuskelzellen (YU et al., 2008; XU et al., 2004; PAN et al., 2001) durch die Hemmung der Phosphorylierung von p44/42 MAPK in SMCs, bei gleichzeitiger Stimulation von Endothelzellen durch Phosphorylierung von p44/42 MAPK in ECs (XIANG et al., 2010) beschrieben.

Für Genistein wurden zudem antioxidative Aktivitäten publiziert. Durch die Applikation von Genistein wird die p22phox NADPH Oxidase Untereinheit supprimiert, was zu einer Reduktion von Superoxidanionen (XU et al., 2004) sowie von oxidativen DNA-Schäden (DJURIC et al., 2001) führt.

Außerdem stimuliert Genistein die Bildung von NO durch die Phosphorylierung von eNOS sowie der Verstärkung der eNOS Gentranskription und Proteinsynthese in humanen Endothelzellen, was zusätzlich zur Produktion von NO führt (SI und LIU, 2008). NO ist von zentraler Bedeutung in der vaskulären Homöostase (ALBRECHT et al., 2003).

Des Weiteren ist für Genistein die Wirkung als Protein Tyrosinkinase (PTKs) Inhibitor beschrieben worden. Bei PTKs handelt es sich um wichtige Regulatoren in Kontrollnetzwerken, die das zelluläre Wachstum und die Differenzierung steuern. Eine spezielle Form stellen die Rezeptor Tyrosinkinasen dar. Diese sind in der Signaltransduktion von der extrazellulären Umgebung in das Zellinnere von Bedeutung. Die Rezeptor Tyrosinkinasen werden durch Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF, IGF und NGF reguliert (POLKOWSKI und MAZUREK, 2000).

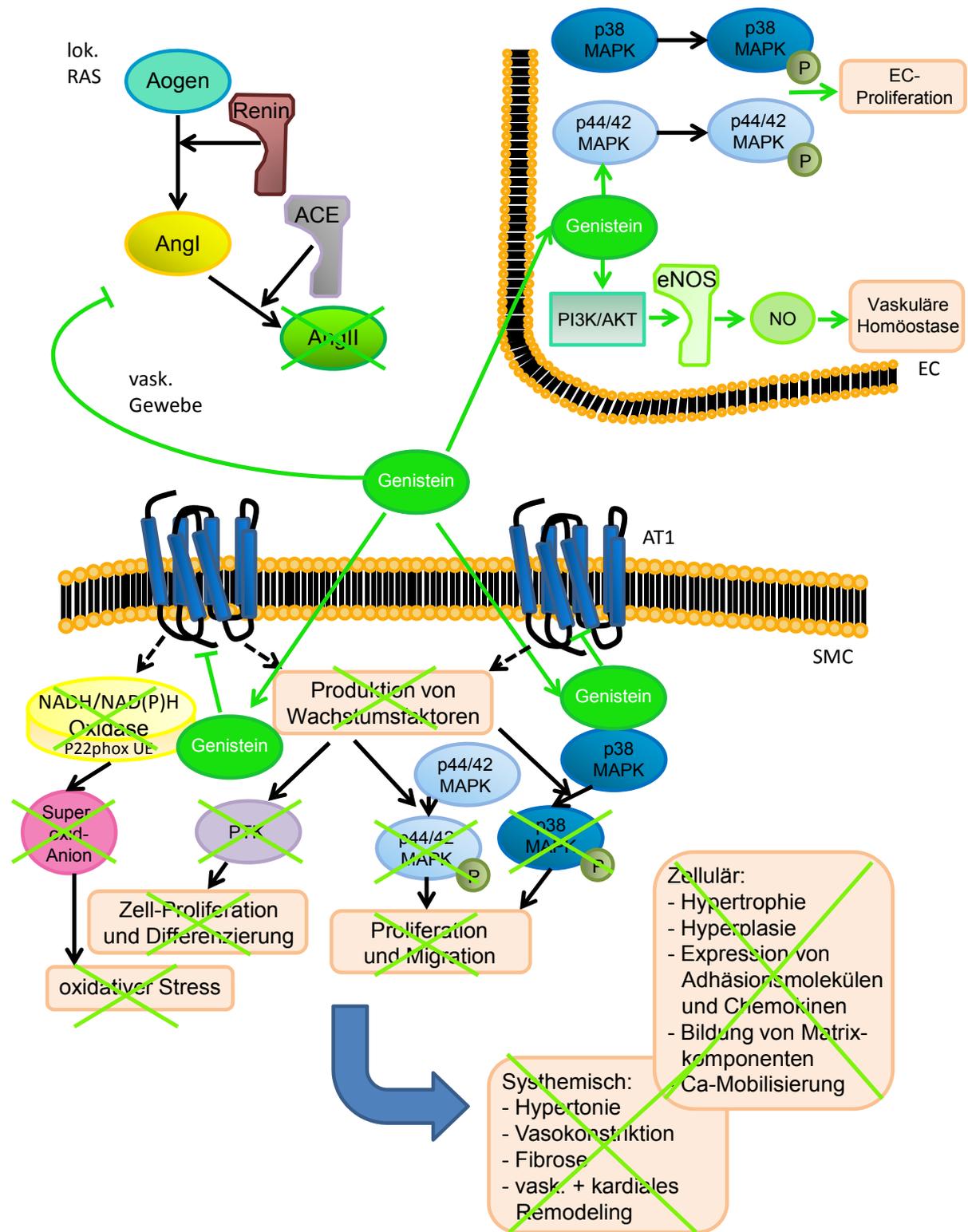


Abb. 2.7: Die Wirkweise von Genistein auf AT1-vermittelte vaskuläre Reaktionen nach vaskulärer Schädigung
 Erläuterungen siehe Text; Abk.: Aogen: Angiotensinogen; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; AT1: Angiotensin II Typ 1 Rezeptor; PTK: Protein Tyrosinkinasen; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinasen
 --> : zusätzliche Signalwege

Werden Protein Tyrosinkinasen inhibiert, folgt die Hemmung multipler Schritte des Zellzyklus von glatten Muskelzellen (SHIMOKADO et al., 1995).

Als Topoisomerase II Inhibitor ist Genistein zusätzlich in der Lage auf DNA-Ebene in die Regulation der Replikation, der Transkription und in DNA-Reparaturprozesse hemmend einzuwirken. Für die Topoisomerase II sind in sich schnell teilenden Zellen erhöhte Aktivitäten bekannt (POLKOWSKI und MAZUREK, 2000).

Des Weiteren ist Genistein in der Lage die Nitrotyrosin Produktion zu inhibieren (XU et al., 2004). Zudem agiert Genistein als Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Agonist und kann so den Lipid-Metabolismus verbessern (MEZEI et al., 2003; DANG et al., 2003), ein Risikofaktor bei vaskulären Erkrankungen. Die Wirkweise von Genistein auf AT1-vermittelte vaskuläre Reaktionen nach vaskulärer Schädigung ist in Abb. 2.7 zusammenfassend dargestellt.

Für das Isoflavon Genistein wird genauso wie für 17β -Estradiol ein biphasischer Wirkmechanismus beschrieben. Neben der Hemmung der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen wird die von vaskulären Endothelzellen induziert. Im Gegensatz zu 17β -Estradiol beeinflusst Genistein aber nicht das reproduktive System und es sind keine kanzerogenen Effekte bekannt.

Daher handelt es sich bei Genistein um einen potenten Kandidaten in der Entwicklung neuer Drug-Eluting Stents und soll im Rahmen dieser Arbeit auf die Eignung als restenosehemmendes Medikament untersucht werden.

3. Zielstellung

Diese Arbeit beschreibt einen Teil der Forschungen zur Entwicklung eines potenten Drug-Eluting Stents, deren Gesamtziel in der signifikanten Reduktion der Restenoserate nach perkutaner transluminaler koronarer Intervention besteht. Wirkungen dieser Implantate sollten in kultivierten porcinen Blutgefäßabschnitten untersucht und beurteilt werden um somit für solche wissenschaftlichen Arbeiten unabdingbare Tierversuche auf ein kleinstmögliches Maß reduzieren zu können.

Die Entwicklung von Drug-Eluting Stents setzt die genaue Charakterisierung des zu inkorporierenden Pharmakons voraus. Restenosehemmende Medikamente zur Inhibition der Neointimabildung müssen Einfluss auf verschiedene zelluläre Signalwege, die in Inflammation, Proliferation, Migration und ECM-Remodeling involviert sind, nehmen.

Dazu sollte das Phytoöstrogen Genistein im Vergleich zu 17β -Estradiol hinsichtlich Vitalität, Proliferation und Migration an vaskulären Zelllinien und porcinen und humanen Primärzellen untersucht werden. Zum besseren Verständnis der Wirkweise von 17β -Estradiol und Genistein sollten diese Resultate durch Westernblotuntersuchungen ergänzt werden. Unter Berücksichtigung der am Institut für Biomedizinische Technik ermittelten Freisetzungskinetik sollten entsprechende Wirkstoffmengen auf einen Drug-Eluting Stent aufgebracht, und in einen kultivierten Blutgefäßabschnitt implantiert werden.

Relevante Gewebeteile (porcine Carotisabschnitte) sollten dazu in einem Perfusionssystem kultiviert, über einen ausreichenden Zeitraum vital erhalten und histologisch und morphologisch beurteilt werden. In vorhergehenden Arbeiten am Institut wurde bereits ein geeignetes Kulturmedium entwickelt. Das Ziel bestand nun darin den Kulturaufbau sowie die Kultivierungsbedingungen hinsichtlich getrennter innerer und äußerer Blutgefäßversorgung zu optimieren, um kultivierungsbedingte Schäden an der Endothelschicht des kultivierten Blutgefäßes zu reduzieren.

In die im Perfusionssystem kultivierten Blutgefäßabschnitte sollten ein Metall-, ein 17β -Estradiol- oder ein Genistein-Eluting Stent implantiert werden um die Auswirkungen der Blutgefäßstützen auf die Zellen des Gewebeverbands zu charakterisieren. Die Informationen über die Implantat-abhängigen Gewebereaktionen im Kultivierungsmodell können auf den Nutzen in vivo übertragen werden und eine erste Beurteilung zur Anwendbarkeit dieser Implantate in der interventionellen Kardiologie erlauben.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Material, Geräte, Chemikalien, Grundmedien, Puffer und Lösungen

Die Arbeit mit Zell- und Gewebekulturen erforderte steriles Arbeiten. Daher wurden alle Instrumente und Materialien entweder mit Heißluft, H₂O₂-Plasma oder durch Autoklavieren sterilisiert bzw. durch den Hersteller sterilisierte Einwegmaterialien genutzt, Medien und Lösungen steril filtriert oder autoklaviert und ein Großteil der Arbeitsschritte an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Genaue Material- Chemikalien- und Gerätelisten sowie die Zusammensetzungen der Grundmedien, Puffer und sonstigen Lösungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Zelllinien und primäre Zellkulturen

BFA: Die bovine fötale Endothelzelllinie BFA aus der Aorta weist eine endotheliale Morphologie auf. Die Kultivierung erfolgte in Ham's F 12-Medium (Biochrom) mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 20 % (v/v) FCS bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre.

ECACC Nr.: 87022601

A7r5: Die Zelllinie A7r5 wurde aus der thorakalen Aorta einer embryonalen BDIX-Ratte isoliert. Es handelt sich dabei um glatte Muskelzellen, die eine flache, spindelförmige Morphologie aufweisen. Diese Zellen wurden in DMEM-Medium (Applichem) mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

ECACC Nr.: 86050803

ppEC und ppSMC: Die porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert und charakterisiert. Bei der Zellkultur ppEC handelt es sich um vaskuläre Endothelzellen, die durch Kollagenaseverdau aus dem Zellverband der Intima porciner Carotisabschnitte gewonnen wurden. Sie weisen bei ausreichender Zelldichte einen lückenlosen Zellverband mit typischer flächiger endothelialer und z. T. lang gestreckter Morphologie auf.

Die vaskuläre glatte Muskelzellkultur ppSMC wurde durch PDGF-stimuliertes Auswachsen aus porcinen Carotisstücken gewonnen und umfasst Zellen mit typischem spindelförmigen, länglichen Aussehen. Zudem sind zahlreiche Ausläufer bei diesem Zelltyp zu beobachten. Die Kultivierung erfolgte für beide Zelltypen in DMEM-Medium (Applichem) mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) FCS bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Isolierung wird unter Punkt 4.2.1. näher beschrieben.

HCAEC und HCASMC: Es wurden in weiterführenden Arbeiten am Institut die humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC verwendet.

Die humanen Primärzellen HCAEC wurden aus der Koronararterie (Spenderorgan) eines 54jährigen Mannes isoliert und weisen eine endotheliale Morphologie auf. Diese Zellen

wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV 2 mit Supplement (Promocell) bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Promocell Order Nr.: C-12221

Bei der Primärzellen HCASMC handelt es sich um humane glatte Muskelzellen, die aus der Koronararterie (Spenderorgan) einer 36jährigen Frau isoliert wurden. Die Kultivierung erfolgte in Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit Supplement (Promocell) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Promocell Order Nr.: C-12511

Wirkstoffe: 17β-Estradiol und Genistein

Im Rahmen der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen an den Zellkulturen und zur Inkorporation in Stents wurden die Wirkstoffe 17β-Estradiol und Genistein von SIGMA verwendet (Cat. No.: 17β-Estradiol: E8875, Genistein: G6649). Es wurden Stammlösungen in absolutem Ethanol mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

- 17β-Estradiol: 10⁻¹ M
- Genistein: 5 x 10⁻² M.

Diese Stammlösungen dienten als Grundlage für weitere Verdünnungen, die mit den Versuchsbedingungen entsprechenden Zellkulturmedien erfolgten.

Prüfkörper: Stents

In der Gewebekultur sollten in dieser Arbeit der Gewebe-Stent-Kontakt und die durch die inkorporierten Wirkstoffe 17β-Estradiol und Genistein ausgelösten Gewebereaktionen näher untersucht werden. Es wurden verschiedene Stent-Prototypen in porcine Carotisabschnitte implantiert und im Perfusionssystem kultiviert.

- Unbeschichteter Metallstent (316-L, Länge: 13 mm, Durchmesser nach Dilatation: 3,5 mm, Oberfläche 3D gesamt: 66,3 mm²; Quelle: Cortronic)
- DES mit Genistein-Inkorporation: (Beschichtung eines Metallstents: 70/30 % (w/w) PLLA/Genistein, Schichtdicke: 5-10 µm, Masse der Gesamtbeschichtung: 700 µg)
- DES mit 17β-Estradiol-Inkorporation (Beschichtung eines Metallstents: 70/30 % (w/w) PLLA/17β-Estradiol, Schichtdicke: 5-10 µm, Masse der Gesamtbeschichtung: 700 µg)

Die Drug-Eluting-Stents (DES) mit Genistein und 17β-Estradiol Inkorporation wurden mittels eines teilautomatisiertem Spraycoating-Verfahrens mit der RAMSES (*Rostock Advanced Manufacturing of Spraycoatet drug Eluting Stents*)-Anlage (**patentiert für das Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock**) hergestellt.

Basis für diese Stents war ein Metallstent mit Poly-L-lactid (PLLA) Beschichtung, in der der entsprechende Wirkstoff inkorporiert wurde. Der jeweilige Wirkstoff wurde in einem definierten Verhältnis mit dem Polymer gemischt (70 % PLLA / 30 % Genistein bzw. 70 % PLLA / 30 % 17β-Estradiol) und auf den Stent gleichmäßig mit der elektropneumatischen Beschichtungsanlage durch Dipl.-Ing. Peter Littwin aufgebracht.

Für diese DES erfolgten am Institut für Biomedizinische Technik durch Dr. rer. nat. Thomas Langer Freisetzungsstudien in isotonischer Salzlösung, Phosphatpuffer und porcinem Blutplasma. Es wurde dabei der Gehalt an Wirkstoff, der in das entsprechende Elutionsmedium übergeht mittels HPLC über einen definierten Zeitraum quantifiziert und in Relation zu der Wirkstoffmenge in der Beschichtung gesetzt, um das Freisetzungsverhalten des entsprechenden Wirkstoffes genau zu bestimmen.

4.2. Untersuchungen auf Zellkulturebene

4.2.1. Isolierung primärer porciner Endothel- und glatter Muskelzellen

4.2.1.1. Probenentnahme und Zellisolierung

Die Primärzellisolierung erfolgte nach OPITZ et al. (2004) und LINDL (2002) an porcinem Schlachtmaterial, welches freundlicherweise durch das Versuchsschlachthaus des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf zur Verfügung gestellt wurde. Den ca. 6 Monate alten, meist weiblichen Schweinen der deutschen Landrasse (DL) wurden Blutgefäßabschnitte der *Arteria Carotis communis* sowie der *Arteria carotis interna et externa* entnommen und in Transportmedium (DMEM-Medium + 200 µg/ml Penicillin/Streptomycin + 5×10^{-3} M Amphotericin) bei 4 °C bis zur Zellisolierung aufbewahrt.

Nach dem Entfernen aller Gewebsreste wurde der Gefäßabschnitt mit steriler 1 x Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), supplementiert mit 300 µg/ml Penicillin/Streptomycin, gewaschen. Daraufhin wurde eine sterile 0,2%ige Kollagenaselösung (in 1 x PBS + eine Spatelspitze BSA) in das Gefäßlumen gegeben, das Blutgefäß mit Klemmen verschlossen, in 1 x PBS gelegt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Durch den Kollagenaseverdau wurden die Endothelzellen aus dem Gewebeverband gelöst und konnten durch das Öffnen einer Klemme in ein mit DMEM-Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt werden. Durch ein weiteres Spülen des Gefäßabschnittes mit DMEM-Medium, sollte eine möglichst hohe Zellausbeute erlangt werden. Nach dem Pelletieren der Zellen (350 x g) wurden diese in Primaria-Zellkulturflaschen (BD Biosciences) ausgesät und mit DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sobald ein subkonfluenter Zellrasen zu beobachten war, erfolgte die Passage mit Trypsin/EDTA in gebräuchliche T75-Zellkulturflaschen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieser Zelltyp als ppEC (primary porcine Endothelial Cells) bezeichnet.

Nach der Endothelzellgewinnung konnte dieser Carotisabschnitt für die Gewinnung vaskulärer glatter Muskelzellen weiter genutzt werden. Dazu wurde das Blutgefäß mit PBS gespült und in ca. 5 x 5 mm große Stücke geteilt. Mit der Gefäßinnenseite nach unten wurden die Gefäßstückchen in Primaria-Petrischalen (BD Biosciences) gelegt und mit 5 ml DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin zunächst für 2 Wochen bei 37

°C und 5 % CO₂ kultiviert, um ein Auswachsen der Fibroblasten zu gewähren. Das Medium musste dabei alle 2-3 Tage gewechselt werden.

Daraufhin wurden die Gefäßstücke in neue Primaria- Petrischalen überführt und mit DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin + 10 ng/ml PDGF kultiviert. Bei PDGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen begünstigt und somit ein Auswachsen dieses Zelltyps aus dem Carotisabschnitt bewirkt. Nach 2 Tagen wurde das Medium erneuert. Nach einer Inkubationsdauer von 4 Tagen wurden die Gefäßstückchen verworfen und die ausgewachsenen vaskulären glatten Muskelzellen mit DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sobald auch bei diesem Zelltyp ein subkonfluenten Zellrasen beobachtbar war, erfolgte die Passage mit Trypsin/EDTA in herkömmliche T75-Zellkulturflaschen. Dieser Zelltyp wird im weiteren Verlauf ppSMC (primary porcine Smooth Muscle Cells) genannt.

Die weitere Kultivierung, Cryokonservierung und Reaktivierung der ppEC und ppSMC erfolgte nach Standardprotokollen (LINDL, 2002).

4.2.1.2. Immunhistochemische Charakterisierung der Primärzellen ppEC und ppSMC

Nach Zellisolierung und Kultivierung musste ein Nachweis erfolgen, ob es sich bei den gewonnenen Zellkulturen wirklich um vaskuläre Endothel- bzw. glatte Muskelzellen handelt. Dieser Nachweis wurde immunhistochemisch mit dem EnVision + ®System-HRP (AEC) der Firma Dako (For Use With Mouse Primary Antibodies: REF K4004, Lot: 035193; For Use With Rabbit Primary Antibodies: REF K4008, Lot: 054161) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für den Nachweis der Endothelzellen (ppEC) wurde der von-Willebrand-Faktor herangezogen, der selektiv in Endothelzellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle in der Hämostase durch Plättchenadhäsion und -aggregation spielt (VISCHER, 2006). Der Nachweis der glatten Muskelzellen erfolgte an Hand von α -Smooth Muscle Actin, einer Actin-Isoform, die nur in vaskulären glatten Muskelzellen vorkommt (WANG et al., 2004).

Als Positivkontrollen dienten für die Endothelzellen BFA und HCAEC, für die glatten Muskelzellen A7r5 und HCASMC. Die Negativkontrollen stellten ppECs und ppSMCs, die an Stelle des primären Antikörpers nur mit Antikörperverdünnungslösung behandelt wurden.

Zunächst wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen in Culture Slides ausgesät. Bei Culture Slides handelt es sich um speziell für die Zellkultur beschichtete Objektträger, auf die ein 4-Kammer-System aufgebracht wurde. Dieses System ermöglichte eine Kultivierung von Zellen auf einem Objektträger, was für den späteren immunhistochemischen Nachweis und die anschließende mikroskopische Beurteilung von Bedeutung war. Pro Kammer wurde 1 ml Zellsuspension pipettiert. Die Kultivierung erfolgte für

48 h in DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂, um ein Adhärenzen der Zellen auf dem Objektträger zu gewährleisten.

Daraufhin wurden die Zellen für 10 min mit 100 % Ethanol fixiert und der pH-Wert mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, pH 7,6) durch 5minütige Inkubation eingestellt.

Danach erfolgte die Blockierung mit Peroxidase Block (gebrauchsfertig im EnVision + ®System) für 5 min. Anschließend wurden die Zellen 3 x 5 min mit TBS (pH 7,6) gewaschen. Während der Wartezeiten konnten die entsprechenden Verdünnungen der primären Antikörper (siehe Tabelle 4.1) hergestellt werden.

Tab. 4.1: primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Nachzuweisendes Protein / Zelltyp	Name des primären Antikörpers	Wirt	Hersteller	Verdünnung
α-smooth-muscle-actin / ppSMC	Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (Clone 1A4, Code No. M0851)	Mouse	DAKO	1:100 in Antikörperverdünnung (Antibody Diluent; BD Pharmingen™)
von-Willebrand-Faktor / ppEC	Polyclonal Rabbit Anti-Human von Willebrand Factor (REFN1505, Lot 08433)	Rabbit	DAKO	Gebrauchsfertige Lösung

Nach Entfernen des Waschpuffers wurde 500 µl Antikörperlösung zu den entsprechenden Zellen pipettiert, die Negativkontrollen wurden mit der entsprechenden Menge Antikörperverdünnungslösung behandelt. Es erfolgte eine 30minütige Inkubation in der feuchten Kammer.

Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung durch 3 x 5minütiges Waschen mit TBS (pH 7,6) von den Zellen wieder entfernt und es erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers. Je nach Wahl des primären Antikörpers handelte es sich dabei um den Labelled Polymer-HRP Anti Mouse (Nachweis von α-Smooth Muscle Actin / ppSMC) bzw. dem Labelled Polymer-HRP Anti Rabbit (Nachweis von von-Willebrand-Faktor / ppEC; gebrauchsfertig im EnVision + ®System). Die Inkubationsdauer des sekundären Antikörpers umfasste wiederum 30 min in der feuchten Kammer. Zum Entfernen des sekundären Antikörpers erfolgte wiederholt ein 3 x 5minütiges Waschen mit TBS (pH 7,6).

Zur Visualisierung der Antigen/Antikörperreaktion wurde das AEC + Substrat Chromogen (gebrauchsfertig im EnVision + ®System) auf die Zellen gegeben und für 30 min abgedunkelt in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte dann für 4 min mit Contrast Blue (KPL, Product Code: 71-00-06, Lot: 030104) und anschließendem 5minütigem Bläuen mit Leitungswasser.

Der Objektträger wurde daraufhin mit Aqua dest. gespült und abschließend getrocknet. Nach dem Entfernen der Kammern erfolgte das Einbetten mit Aquatek®.

4.2.2. Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf die Vitalität und Proliferation vaskulärer Endothel- und glatter Muskelzellen

4.2.2.1. Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für den Vitalitäts- und Proliferationsnachweis

Ein geeigneter Wirkstoff für eine Stentbeschichtung muss bestimmte Eigenschaften hinsichtlich des Einflusses auf Vitalität und Proliferation auf vaskuläre Zelltypen vorweisen. Es soll die Proliferation glatter Muskelzellen gehemmt, die Vitalität und Proliferation vaskulärer Endothelzellen jedoch begünstigt oder nicht beeinträchtigt werden.

Daher sollten die Wirkstoffe 17β-Estradiol und Genistein hinsichtlich ihres Einflusses auf die Vitalität mit Hilfe des MTS-Tests und Proliferation mit Hilfe des BrdU-Tests auf die Zelllinien BFA und A7r5 sowie auf die Primärzellen ppEC und ppSMC in verschiedenen Konzentrationsbereichen untersucht werden. Zudem wurden in weiterführenden Untersuchungen am IBMT Versuche zum Stoffeinfluss dieser beiden Pharmaka auf die Proliferation und Vitalität humaner vaskulärer Endothelzellen (HCAEC) sowie humaner vaskulärer Gefäßmuskelzellen (HCASMC) durchgeführt, deren Ergebnisse für Vergleichszwecke herangezogen werden sollen.

Da die Resultate der Zelllinien BFA und A7r5 für die weiterführenden Arbeiten keine Konsequenzen haben, werden diese im Anhang dargestellt.

In der folgenden Tabelle sind die zu untersuchenden Konzentrationsbereiche sowie die erforderlichen Kontrollen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4.2: Wirkstoffkonzentrationen für MTS- und BrdU-Test (BFA, A7r5, ppEC, ppSMC)

17β-Estradiol	Genistein	Kontrollen	
10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	NC1	Kontrolle ohne Arretierung
10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l	NC2	Kontrolle mit Arretierung ohne Restimulierung
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l		
10 ⁻⁷ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l	NC3	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung
10 ⁻⁸ mol/l	10 ⁻⁸ mol/l		
10 ⁻⁹ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l	EtC*	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung + 0,1 % EtOH [17β-Estradiol-Testung] bzw. 0,2 % EtOH [Genistein-Testung]
10 ⁻¹⁰ mol/l	10 ⁻¹⁰ mol/l		
10 ⁻¹¹ mol/l	10 ⁻¹¹ mol/l		
10 ⁻¹² mol/l	10 ⁻¹² mol/l		
		B	Blindwert

*Bei ETC handelt es sich um die Lösungsmittelkontrolle. Die Konzentration von Ethanol entspricht der Menge, die in dem Versuchsansatz mit der höchsten Wirkstoffkonzentration enthalten ist.

Für alle Wirkstoffkonzentrationen sowie für die Kontrollen und den Blindwert wurden jeweils vier Parallelen nach 24 und 48 h mit Hilfe des MTS-Tests zur Bestimmung der Vitalität sowie des BrdU-Tests zur Bestimmung der Proliferationsrate getestet. Die Versuche wurden an allen vier Zelltypen durchgeführt und mindestens 2-mal wiederholt. Die Versuchsbedingungen in der Zellkultur wurden nach MOHACSI et al., 1997 abgeleitet.

Zunächst wurden die zu testenden Zellen mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/ml (A7r5, ppEC, ppSMC) in DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin bzw. 5×10^3 Zellen/ml (BFA) in Ham's F12-Medium + 20 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 72 h vor Versuchsbeginn in 96er Wellplatten mit 200 µl/Well ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert um ein Adhären der Zellen zu gewährleisten. Als Blindwert wurde das Medium verwendet, in dem die Zellen ausgesät wurden.

Daraufhin wurden die Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus für 48 h arretiert (außer NC1). Dazu wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese mit 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des zelltypspezifischen Arretierungsmediums (200 µl/Well).

Tab. 4.3: Arretierung der Zellen

Zelltyp	Arretierungsmedium
A7r5	DMEM-Medium + 2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.
ppEC	DMEM-Medium + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.
ppSMC	DMEM-Medium + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.
BFA	Ham's F12-Medium + 0 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.

Nach Ablauf der 48stündigen Arretierungsphase erfolgte die Wirkstoffzugabe in den in Tabelle 4.2. angegebenen Konzentrationen. Die Pharmaka 17β-Estradiol und Genistein wurden je nach Zelltyp in DMEM- bzw. Ham's F12-Medium + 5 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin verdünnt und 200 µl/Well der entsprechenden Wirkstofflösung pipettiert. Die Kontrolle NC1 wurde weiterhin mit DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (A7r5, ppSMC, ppEC) bzw. Ham's F12-Medium + 20 % FCS + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (BFA) kultiviert, die Kontrolle NC2 mit dem entsprechendem Arretierungsmedium. Für die Kontrolle NC3 sowie für die Ethanolkontrolle EtC und den Blindwert wurde DMEM- bzw. Ham's F12-Medium + 5 % FCS (v/v) + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet und ebenfalls 200 µl/Well pipettiert. Nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre erfolgte die Restimulierung mit Wachstumsfaktoren. Die Restimulierung der glatten Gefäßmuskelzellen (A7r5, ppSMC) erfolgte mit PDGF, die der vaskulären Endothelzellen (BFA, ppEC) mit EGF.

Die Wachstumsfaktoren wurden mit einer Konzentration von 25 ng/ml verwendet und alle Ansätze außer den Kontrollen NC1 und NC2 damit versetzt. Nach 24 und 48 h erfolgte die Durchführung des MTS- und des BrdU-Tests.

4.2.2.2. MTS-Test zum Nachweis der Vitalität

Der MTS-Test (CellTiter[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) wird zur Bestimmung lebender Zellen in Proliferations-, Vitalitäts- oder Chemosensitivitätstestungen genutzt. Es handelt sich dabei um eine colorimetrische Methode bestehend aus einer Tetrazoliumkomponente (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS^(a)) und einem Elektronenkopplungsreagenz

(Phenazin Methosulfat; PMS). Durch die Aktivität mitochondrialer und zellulärer Dehydrogenasen (DH) lebender, metabolisch aktiver Zellen wird MTS (gelb) zu einem Formazanprodukt (braun reduziert, das in Zellmedien löslich ist (MALICH et al., 1997)). Die Absorption des Formazansalzes kann optisch bei 492 nm gegen eine Referenz von 690 nm im ELISA-Reader bestimmt werden und ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen in Kultur. Zur Durchführung des MTS-Tests wurde das Medium von den Zellen komplett entfernt und durch 200 µl/Well MTS-Medium ersetzt.

Nach 60-120minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 %CO₂ unter Ausschluss von Licht erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen eine Referenz von 690 nm.

4.2.2.3. BrdU-Test zum Nachweis der Proliferation

Der BrdU-Test (Roche) wird für den Nachweis der Proliferation von Zellen herangezogen. Bei BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) handelt es sich um ein Pyrimidinanalogon, welches in die DNA anstelle von Thymin bei der DNA-Replikation während der Zellteilung eingebaut wird (HUONG et al., 1991). Nach Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA wird ein gegen BrdU gerichteter Peroxidase-gekoppelter Antikörper zu den Zellen gegeben, der spezifisch das in die DNA eingebaute BrdU bindet. Dieser Immunkomplex kann mit Hilfe eines Substrates (TMB) visualisiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenz von 690nm quantifiziert werden. Die gemessene Extinktion korreliert mit der Stärke der DNA-Neusynthese und damit auch der Anzahl proliferierender Zellen.

Die Durchführung des BrdU-Tests erfolgte wie folgt nach Herstellerangaben: 24 h vor der Messung wurden die zu untersuchenden Zellen mit BrdU markiert. Das BrdU-Labeling-Reagenz (1000fach im BrdU-Kit) wurde 1:100 mit sterilem Zellkulturmedium (je nach untersuchtem Zelltyp) verdünnt, jeweils 20 µl/Well pipettiert (Endverdünnung 1:1000) und die Zellen bei 37 °C und 5 %CO₂ reinkubiert.

Danach wurde das gesamte Medium aus den Platten entfernt und 200 µl/Well Fixierlösung (gebrauchsfertig im BrdU-Kit) zu den Zellen gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fixierlösung aus den Wells entfernt und 100 µl/Well anti-BrdU-POD working solution (1:100 Verdünnung der anti-BrdU-POD Stammlösung mit der Antikörperverdünnungslösung [gebrauchsfertig im BrdU-Kit]) pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben 3mal mit 200 µl/Well 1 x BrdU-Waschpuffer (10fach im BrdU-Kit, Verdünnung in Aqua dest.) gewaschen und 100 µl/Well Substratlösung (gebrauchsfertig im BrdU-Kit) pipettiert. Es erfolgte eine 5-30minütige Inkubation unter leichtem Schütteln, bis die gewünschte Farbintensität (Blaufärbung) erreicht wurde. Diese Substratreaktion wurde daraufhin mit 25µl/Well 1 M H₂SO₄ abgestoppt und eine weitere min unter Schütteln inkubiert (Farbumschlag von blau zu gelb). Daraufhin erfolgte die

photometrische Bestimmung der Extinktion bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm.

4.2.2.4. Untersuchungen des Einflusses einer Genistein/Sirolimus-Kombinationslösung auf das Proliferationsverhalten der humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC

In Tabelle 4.4 sind die zu testenden Konzentrationen und die Kontrollen zusammengefasst. Die Zellen wurden unter denselben Bedingungen, wie unter Punkt 4.2.2.1. erläutert, kultiviert. Die Proliferation wurde mittels des BrdU-Tests (Punkt 4.2.2.3.) nach 48 h Wirkstoffeinfluss ermittelt.

Tab. 4.4 Wirkstoffkonzentrationen für MTS- und BrdU-Test (BFA, A7r5, ppEC, ppSMC)

Genistein	Sirolimus	Genistein/Sirolimus	Kontrollen	
10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l	NC1	Kontrolle ohne Arretierung
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	NC2	Kontrolle mit Arretierung ohne Restimulierung
10 ⁻⁷ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l		
10 ⁻⁸ mol/l	10 ⁻⁸ mol/l	10 ⁻⁸ mol/l	NC3	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung
10 ⁻⁹ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l		
10 ⁻¹⁰ mol/l	10 ⁻¹⁰ mol/l	10 ⁻¹⁰ mol/l	B	Blindwert
10 ⁻¹¹ mol/l	10 ⁻¹¹ mol/l	10 ⁻¹¹ mol/l		

4.2.3. Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf die Migration primärer vaskulärer glatter Muskelzellen

4.2.3.1. Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für die Migrationstestung

In der folgenden Tabelle sind die zu untersuchenden Konzentrationsbereiche sowie die erforderlichen Kontrollen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4.5 Wirkstoffkonzentrationen für Migrationstest (ppSMC; HCASMC)

17β-Estradiol	Genistein	Kontrollen	
10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	K ₀	Kontrolle mit Arretierung ohne PDGF-Behandlung
10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l		
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	K _P	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung (10 ng/ml PDGF)
10 ⁻⁷ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l		
10 ⁻⁸ mol/l	10 ⁻⁸ mol/l	K _E	Kontrolle mit Arretierung + 0,2 % Ethanol ohne PDGF-Behandlung
10 ⁻⁹ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l		
10 ⁻¹⁰ mol/l	10 ⁻¹⁰ mol/l	K _{PE}	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung (10 ng/ml PDGF + 0,2 % Ethanol)
10 ⁻¹¹ mol/l	10 ⁻¹¹ mol/l		
10 ⁻¹² mol/l	10 ⁻¹² mol/l	K _{Ly}	Kontrolle mit Arretierung + 1 mM Ly294002
		K _{PLY}	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung (10 ng/ml PDGF) + 1 mM Ly294002

Für alle Wirkstoffkonzentrationen sowie für die Kontrollen wurden jeweils 2 Parallelen je Zelltyp getestet. Die Versuche wurden mindestens 2-mal wiederholt. 72 h vor Versuchsbeginn wurden 3 T75-Zellkulturflaschen mit der entsprechenden subkonfluenten Zellkultur aus der Routinezellkultur bereitgestellt und mit frischem Medium (DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) und 100 µg/ml Pen./Strep.) versorgt. Zum Arretieren der Zellen wurde nach 72 h das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Arretierungsmediums (siehe Tabelle 4.3, 15 ml/Flasche). Die Zellen wurden nun für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Durchführung des Migrationsversuches wurden Migrationseinsätze von Millipore (Millicell Cell Culture Plate Assemblies; Cat. No. PSET010R5) genutzt, die zuvor mit Kollagen beschichtet wurden. Dazu wurde eine Kollagenlösung (Stammlösung: Kollagen S, Typ I; 3 mg/ml, Roche) mit einer Konzentration von 0,75 mg/ml in 70 % Ethanol hergestellt. Die Migrationseinsätze wurden in die dazugehörige 24er Wellplatte gegeben und 50 µl Kollagenlösung in jeden Einsatz pipettiert. Die Einsätze wurden daraufhin mindestens 3 h in der Sterilwerkbank luftgetrocknet.

Bevor die Zellen nun in die Migrationseinsätze ausgesät werden konnten, wurden zunächst 500 µl DMEM-Medium + 5 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.) in die Wells gegeben. Daraufhin wurden die arretierten Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in den Einsätzen ausgesät. Dabei wurden in jeden Einsatz 450 µl Zellsuspension pipettiert. Nach 2stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe der Wirkstoffe in den entsprechenden Konzentrationen, so dass die Endkonzentrationen in den Einsätzen den Angaben aus Tabelle 4.4 entsprachen. Die Verdünnungen von Genistein und 17β-Estradiol erfolgten in DMEM-Medium + 5% FCS + 100 µg/ml Pen./Strep. Die Kontrollen wurden zunächst mit demselben Medium weiter kultiviert, den Kontrollansätzen K_E und K_{PE} wurde zudem 0,2% Ethanol zugesetzt, die Kontrollen K_{LY} und K_{PLY} mit 1 mM Ly294002 (Migrationshemmer) behandelt.

Nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die wirkstoffversetzten Versuchsansätze und die Kontrollen K_P, K_{PE} und K_{PLY} mit 10 ng/ml PDGF restimuliert. PDGF ist ein Wachstumsfaktor der neben einer Erhöhung der Zellproliferation von glatten Gefäßmuskelzellen während arteriosklerotischer und restenotischer Vorgänge auch migrationsfördernd ist. Der Wachstumsfaktor wurde in die mit den Einsätzen gefüllten Wells pipettiert, so dass die Endkonzentration im Well den angegebenen 10 ng/ml entsprach. Nun wurden die Proben weitere 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.2.3.2. Zellzählung

Um die Anzahl migrierter Zellen bestimmen zu können, mussten die sich auf der Außenseite der Membran befindenden Zellen zunächst gefärbt, die Membranen von den Einsätzen entfernt und auf einen Objektträger überführt werden.

Dazu wurde zunächst das Medium aus den Wells und den Einsätzen entfernt und die Membraninnenseite mit einem Wattestäbchen abgerieben. Nach dem Waschen der Einsätze mit 1 x PBS erfolgte das Färben der migrierten Zellen mit dem Diff-Quick-Kit nach Herstellerangaben.

Die Zellen wurden dazu zunächst 5 s mit Fixierlösung behandelt und daraufhin für jeweils 5 s mit Färbelösung I (Eosin) und Färbelösung II (Hämalaun) gefärbt. Danach wurden die Membranen, auf denen sich die gefärbten Zellen befanden von den Einsätzen entfernt und mit der Innenseite nach unten auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Eindecken mit Immersionsöl konnte der Versuch lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Dazu wurden die gefärbten Zellkerne gezählt. Pro Einsatz wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt.

4.2.4. **Untersuchung des Einflusses von 17β-Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus ausgewählter Proteine in primären porcinen Endothel- und glatten Muskelzellen mittels Westernblot**

4.2.4.1. **Zellkulturbedingungen und Wirkstoffzugabe für die Proteinisolierung**

Die Proteinisolierung und die Untersuchungen zum Expressionsverhalten einiger Proteine erfolgten an den vaskulären Primärzellen ppEC und ppSMC.

In der folgenden Tabelle sind die zu untersuchenden Konzentrationsbereiche sowie die erforderlichen Kontrollen zusammengefasst.

Tab. 4.6: Wirkstoffkonzentrationen für Proteinbiochemie

17β-Estradiol	Genistein	Kontrollen	
10 ⁻⁴ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	NC1	Kontrolle ohne Arretierung
10 ⁻⁵ mol/l	10 ⁻⁵ mol/l	NC2	Kontrolle mit Arretierung ohne Restimulierung
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l		
10 ⁻⁷ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l	NC3	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung
10 ⁻⁸ mol/l	10 ⁻⁸ mol/l		
10 ⁻⁹ mol/l	10 ⁻⁹ mol/l	EtC*	Kontrolle mit Arretierung und Restimulierung + 0,1 % EtOH [17β-Estradiol-Testung] bzw. 0,2 % EtOH [Genistein-Testung]
10 ⁻¹⁰ mol/l	10 ⁻¹⁰ mol/l		
10 ⁻¹¹ mol/l	10 ⁻¹¹ mol/l		
10 ⁻¹² mol/l	10 ⁻¹² mol/l		

*Die Ethanolmenge in EtC entspricht der Menge Ethanol, die je nach Pharmakon in der höchsten Wirkstoffkonzentration enthalten ist.

In jeder Versuchsreihe wurde für beide Zelltypen pro Wirkstoffkonzentration bzw. Kontrolle je eine Flasche nach 24 h und 48 h Wirkstoffeinfluss aufgearbeitet, die Zellkulturbedingungen wurden nach MOHACSI et al., 1997 und XU et al., 2004 abgeleitet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit einer Konzentration von 5 x 10⁴ Zellen/ml in DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) und 100 µg/ml Pen./Strep. in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Das Gesamtvolumen der Zellsuspension pro Flasche betrug dabei 5 ml. Nach 72stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in der G₀-Phase des

Zellzyklus für 48 h arretiert (außer Kontrolle NC1). Als Arretierungsmedium wurde DMEM-Medium + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep. verwendet.

Daraufhin erfolgte die Zugabe des jeweiligen Wirkstoffes in den in Tabelle 4.6 angegebenen Konzentrationen. Die Wirkstoffverdünnungen erfolgten in DMEM-Medium + 5 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep. + 1 µg/ml Angiotensin II. Bei Angiotensin II handelt es sich um ein wichtiges Effektorpeptid des Renin Angiotensin Weges, das bei zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen eine große Rolle spielt (GUO et al., 2006; siehe 2.1.3.)

Für die Kontrolle NC1 wurde weiterhin DMEM-Medium + 10 % FCS (v/v) und 100 µg/ml Pen./Strep. verwendet, die Kontrolle NC2 wurde mit frischem Arretierungsmedium (DMEM-Medium + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.) weiter kultiviert, die Kontrolle NC3 mit DMEM-Medium + 5 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep. + 1 µg/ml Angiotensin II. Die Ethanolkontrolle EtC wurde mit demselben Medium wie NC3 versorgt, es wurde dort zusätzlich die in Tabelle 4.6 angegebene Menge Ethanol zugegeben. Nach 6stündiger Inkubation erfolgte die Restimulierung mit PDGF (ppSMC) bzw. EGF (ppEC). Die Wachstumsfaktoren wurden mit einer Konzentration von 25 ng/ml verwendet und zu den mit Wirkstoff versetzten Ansätzen sowie NC3 gegeben. Die Kultivierung erfolgte weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Zellen lysiert und die Gesamtproteinmenge isoliert.

4.2.4.2. Proteinisolierung

Alle Arbeitsschritte der Proteinisolierung erfolgten auf Eis, Zentrifugen wurden bei 4 °C betrieben und alle Lösungen eisgekühlt verwendet.

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und das Medium mit den abgelösten Zellen in ein Reagenzglas überführt. Daraufhin wurde die Zellkulturflasche mit 1 x PBS gespült, diese Lösung in das mit Zellsuspension gefüllte Reagenzglas gegeben und die Zellen bei 350 x g (1500 rpm) für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl eiskaltem 1 x PBS aufgenommen. Nach Resuspendierung wurde diese Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette komplett abgenommen und verworfen. Je nach Pelletgröße erfolgte die Zugabe von 100-500 µl Lysepuffer (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology®; [#9803]) + 1 mM AEBSF-Hydrochlorid (Applichem; A1421) + 10 µg/ml Leupeptin-Hemisulfat (Applichem; A2183). Bei AEBSF handelt es sich um einen Proteasehemmer, der Thrombin und andere Serin-Proteasen irreversibel durch die Sulfonylierung einer funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum der Enzyme hemmt. AEBSF ist ein kaum giftiger Ersatzstoff zum sonst gebräuchlichen PMSF (PROUTY AND GOLDBERG, 1972). Bei Leupeptin handelt es sich um ein aus Streptomyces-Spezies isoliertes Peptidantibiotikum welches reversibel Serin- und Cysteinproteasen inhibiert (UMEZAWA, 1976; BRASS und SHATTIL, 1988).

Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurde der Zellaufschluss durch eine Ultraschallbehandlung auf Eis für 4 x 15 s bei 50 % unterstützt (Labsonic M, Sartorius).

Danach erfolgte das Pelletieren der Zelltrümmer bei 10000 x g für 10 min. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet mit den Zelltrümmer verworfen. 10 µl der Proteinlösung wurden für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben. Bis zur Zugabe des Probenpuffers erfolgte die Lagerung auf Eis.

Proteinbestimmung nach Bradford (KRUGER, 1994):

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Proben erfolgte mit Hilfe einer BSA-Eichgerade (BSA-Konzentrationen (1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml). Für das Erstellen der Eichgerade wurde eine BSA-Stammlösung von 0,2 mg/ml in Aqua dest. verwendet. Die Ansätze der Eichgerade sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tab. 4.7: BSA-Eichreihe

BSA-Konzentration (µg/ml)	1	2	4	6	8	10
BSA (0,2 mg/ml) (µl)	5	10	20	30	40	50
Aqua dest. (µl)	785	780	770	760	750	740
Lysepuffer (µl)	10	10	10	10	10	10
Bradford-Reagenz 5 x (µl)	200	200	200	200	200	200

Nach 5minütiger Inkubation unter Ausschluss von Licht erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Photometer. Für die Proteinbestimmung der einzelnen Proben wurde zu 10 µl Probe (in Lysepuffer) 790 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford-Reagenz pipettiert und nach 5minütiger Inkubation im Dunkeln bei 595 nm gemessen. Anhand der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet werden. Die Eichgerade wurde für jeden Aufarbeitungstag neu erstellt. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 2:1 mit 3 x Probenpuffer gemischt und für 5min auf 95°C erhitzt. In dieser Form konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

4.2.4.3. Westernblot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; LAEMMLI, 1970):

Es wurde die Multigel Long Gelelektrophoresekammer für die Proteintrennung von Biometra nach Herstellerangaben genutzt. Das Gel für die Proteintrennung bestand aus einem 12%igem Trenn- und einem 5%igem Sammelgel. Ein bzw. zwei Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammer mit 1 x Elektrodenpuffer gefüllt. Es wurden 10 µg Protein geladen, als Größenmarker wurde der PeqGOLD Proteinmarker II (Peqlab, 27-2010) mit einem Größenspektrum von 10-200 kDa verwendet. Zunächst wurde eine Stromstärke von 20 mA/Gel angelegt, nachdem die Proben aus dem Sammelgel gewandert waren, erfolgte eine Erhöhung auf 30 mA/Gel. Die Laufzeit betrug ca. 2 h.

Semi-Dry-Blot (BURNETTE, 1981, HEERMANN et al., 1988):

Nach dem Entfernen des Gels aus der Elektrophoreseapparatur, wurde dieses bis zum Aufbau des Semi-Dry-Blots in Anodenpuffer II aufbewahrt. 6 Blotpapiere (Whatmannpapier)

und eine PVDF-Membran wurden auf das Gelmaß zurechtgeschnitten. 2 Blotpapiere wurden in Anodenpuffer I getränkt, 1 in Anodenpuffer II und 3 in Kathodenpuffer. Die PVDF-Membran wurde zur Benetzung 15 min in Methanol geschwenkt und 5 min unter Schwenken mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde die Membran mindestens 5 min bis zum Aufbau des Blots in Anodenpuffer II adaptiert. Zum Übertragen der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran (Blot) wurde die Fastblot B43 Apparatur von Biometra verwendet. Der Zusammenbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema:

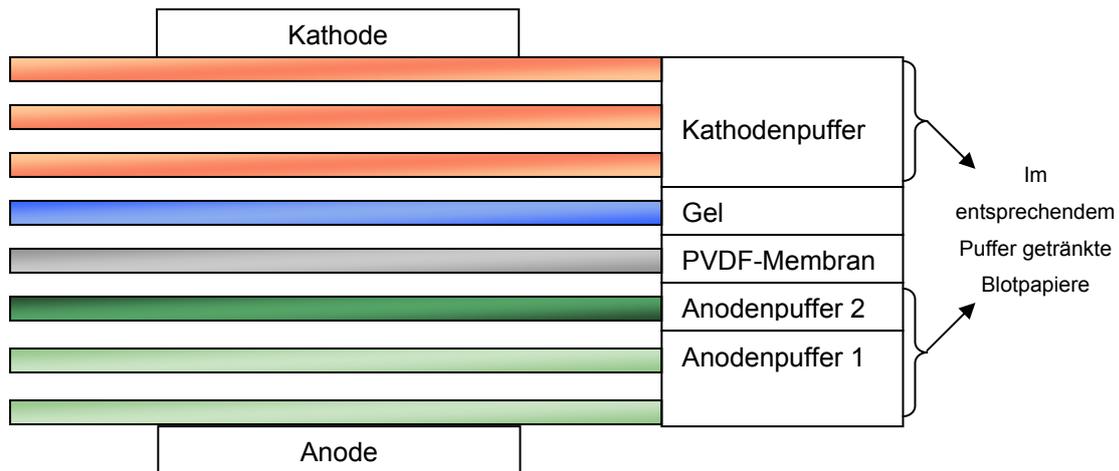


Abb. 4.1: Schema des Semi-Dry-Blots

Es wurde Strom (2 mA/cm^2) angelegt, die Übertragungszeit betrug 1,5 h. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Membran getrocknet und für 5 min zunächst in Methanol inkubiert, dann in Aqua dest. gewaschen.

Proteinfärbung (SALINOVICH AND MONTELARO, 1986):

Für die Anfärbung der Proteine zur Kontrolle des Proteintransfers und zur Markermarkierung wurde die Membran 1 min in Ponceau-S-Lösung gefärbt und 1 min in Aqua dest. gewaschen. Der Marker wurde auf der Membran markiert, wonach die Membran wieder komplett mit 1 M NaOH entfärbt werden konnte. Nach einem weiteren Waschschrift mit Aqua dest. für 1 min konnte die Membran blockiert werden.

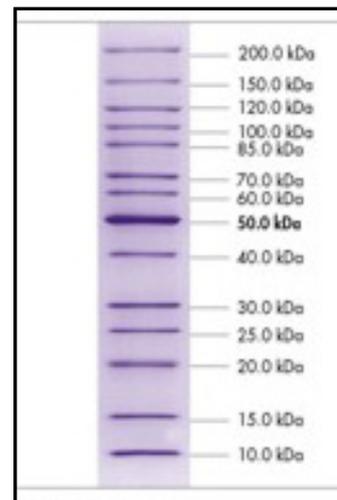


Abb. 4.2: PeqGOLD Proteinmarker II, Quelle: Peq-Lab

Blockierung und Immunreaktion (HEERMANN et al., 1988):

Je nach Wahl des primären Antikörpers erfolgte die Blockierung zum Sättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA (5 % BSA in 0,05%iger PBS/Tween 20 Lösung) oder Magermilch (5 % Magermilch in 0,05%iger PBS/Tween 20 Lösung). Die Inkubationsdauer betrug 1 h.

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen und die Blockierungsart zusammenfassend dargestellt:

Tab. 4.8: primäre Antikörper für die Westernblotuntersuchungen

Nachzuweisendes Protein	Name des primären Antikörpers	Wirt	Hersteller	Verdünnung	Blockierung
HSP70 (70 kDa)	Anti-HSP70 mAb Product code: ab6535	Maus	abcam (ab6535)	1:20000 0,25 µl/5 ml	Magermilch
Phospho-Tyrosin	Anti-Phospho-Tyrosine mAb (P-Tyr-100)	Maus	Cell Signaling (#9411)	1:2000 2,5 µl/5 ml	BSA
p44/42 MAPK (42, 44 kDa)	Anti-p44/42MAP Kinase (L34F12) mAb	Maus	Cell Signaling (#4696)	1:2000 2,5 µl/5 ml	Magermilch
Phospho-p44/42 MAPK (42, 44 kDa)	Anti-Phospho-p44/42MAPK (Thr202/Tyr204) (20G11) mAb	Kaninchen	Cell Signaling (#4376)	1:1000 5 µl/5 ml	BSA
AT1-Rezeptor (40, 45, 60 kDa)	Anti Angiotensin II Type 1 Receptor mAb	Maus	abcam (ab9391)	1:500 10 µl/5 ml	BSA

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in der jeweiligen Blockierungslösung. Für die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde die Membran bis auf eine Seite in Folie eingeschweißt und 5 ml der jeweiligen Antikörperlösung dazugegeben. Nach dem Entfernen aller Luftblasen wurde die Membran komplett verschlossen und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert.

Zum Entfernen des primären Antikörpers wurde die Membran 3 x 10 min mit Waschpuffer (1 x PBS/Tween20 [0,05 %]) unter Schwenken gewaschen. Je nach Wirt des primären Antikörpers erfolgte die Wahl des sekundären Antikörpers (Tabelle 4.9).

Tab. 4.9: sekundäre Antikörper für die Westernblotuntersuchungen

Nachzuweisendes Protein	Name des sekundären Antikörpers	Wirt	Hersteller	Verdünnung	Blockierung
- HSP70 - Phospho-Tyrosin - p44/42 MAPK - AT1-Rezeptor	Anti-Maus IgG Peroxydase-markiert (HRP)	Ziege	KPL (074-1802)	1 : 5000 1 µl/5 ml	siehe primären AK
- Phospho-p44/42 MAPK	Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-markiert (HRP)	Ziege	Cell Signaling (#7074)	1:1000 5 µl/5 ml	siehe primären AK

Die Membran wurde wiederum in Folie eingeschweißt, 5 ml Antikörperlösung (Verdünnung in Blockierungslösung) dazugegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert.

Durch 3 x 10minütiges Waschen (1 x PBS/Tween20 [0,05 %]) wurden die nicht gebundenen Antikörpermoleküle von der Membran entfernt.

Detektion mittels Chemolumineszenz (HAAS 2005):

Die Detektion der Immunkomplexe auf der Membran erfolgte mittels Chemolumineszenz. Durch den Übergang eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in einen energetisch niedriger liegenden Zustand durch den Umsatz von Luminol durch die am sekundären Antikörper gebundenen Meerrettichperoxidase wird Licht emittiert.

Zunächst wurde der restliche Waschpuffer von der Membran entfernt und diese mit der proteinbindenden Seite nach oben in eine Färbeschale gelegt. Daraufhin wurde die ECL-Detektions-Lösung auf die Membran pipettiert und für 2 min inkubiert. Nach dem Abtropfen der auf der Membran befindlichen Flüssigkeit wurde diese zwischen zwei transparente Folien gelegt und die Luftblasen entfernt.

Alle weiteren Arbeiten erfolgten nun in einem Fotolabor unter Rotlichtbeleuchtung. Die sich in Folie befindende Membran wurde mit der proteinbindenden Seite nach oben in eine Filmkassette gelegt und ein auf die Größe zurechtgeschnittener Röntgenfilm (Medical X-Ray Film HT1.000G Plus; Agfa) auf die Membran gegeben. Die Kassette wurde verschlossen und der Röntgenfilm einige Zeit exponiert. Die Expositionsdauersdauer richtete sich nach den verwendeten Antikörpern und konnte einige Sekunden (HSP70, 10 sec) bis mehrere Minuten betragen (1-5 min, trifft für die anderen verwendeten Antikörper zu). Anschließend wurde der Röntgenfilm unter Schwenken in Entwickler (Polymax RT Developer/Replenisher; Kodak: Cat. No: P8432-25L) entwickelt, kurz mit Aqua dest. gewaschen und unter Schwenken in Fixierlösung (Fixer; Kodak: Cat. No: P8307-20L) fixiert. Nachdem der Röntgenfilm ein weiteres Mal in Aqua dest. gewaschen wurde, konnte dieser lufttrocknen. Danach wurden die auf der Membran markierten Markerbanden mit Permanentmarker auf den Röntgenfilm übertragen.

Strippen und weitere Antikörperinkubationen der Westernblots (ELLIS, 2004):

Zum Entfernen der Antikörper wurde die entsprechende Membran 1 h in 100 mM Glycin-Lösung geschwenkt und anschließend 3 x 10 min in Waschpuffer (1 x PBS/Tween20 [0,05 %]) gewaschen. Daraufhin konnte die Membran erneut blockiert und mit einem Antikörper inkubiert werden.

4.3. Kultivierung porciner Carotisabschnitte

Das Ziel der bisherigen Arbeiten bestand in der Suche nach einem geeigneten Konzentrationsbereich der Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein, unter dessen Einfluss die Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen gehemmt, die Vitalität und Proliferation von vaskulären Endothelzellen jedoch begünstigt wurde.

Diese Ergebnisse konnten genutzt werden um geeignete Drug Eluting Stents zu entwickeln, in deren Oberfläche entweder 17 β -Estradiol oder Genistein inkorporiert wurde. Die genaue Herstellung ist in Punkt 4.1. beschrieben. Das Freisetzungsverhalten der Wirkstoffe wurde

zudem in von dieser Arbeit unabhängigen Untersuchungen am Institut für Biomedizinische Technik genau analysiert.

Es musste daraufhin eine experimentelle Methode für die Untersuchung und die Charakterisierung der durch die am IBMT entwickelten Drug-Eluting Stents ausgelösten Gewebereaktionen aufgebaut und erweitert werden.

Für Gewebekulturen ist die Kultivierung in einem statischen Milieu im Gegensatz zur Zellkultur nicht anwendbar. Zellen in einer Zellkultur lagern sich entweder in Form einer Monolayer (adhärente Zellen) oder in Form von Clustern (Suspensionszellen) zusammen. Daher deckt die regelmäßige Versorgung mit frischem Kulturmedium den Nähr- und Sauerstoffbedarf um vitale und proliferierende Zellen zu erhalten. Bei Gewebekulturen würden tiefer liegende Zellschichten nicht ausreichend versorgt und durch Stoffwechselendprodukte geschädigt werden.

Dazu wurde im Rahmen anderer Arbeiten am Institut für Biomedizinische Technik die Kultivierung von porcinen Carotisabschnitten in dem Perfusionsmodell nach Minuth unter Raumluftatmosphäre mit verschiedenen Kultivierungsmedien getestet und etabliert (MINUTH, 2002, JAKOBS, 2004, SELENT, 2005, TÜMMLER, 2006), bei dem durch die ständige Zufuhr von Medium der Nähr- und Sauerstoffgehalt konstant blieb und zelluläre Metabolite abtransportiert werden konnten.

Dazu wurde mit einer Peristaltikpumpe Perfusionsmedium aus einer Vorratsflasche unten in den Container transportiert, wo es sich am Boden verteilte und zwischen dem Gewebe nach oben aufstieg. Auf der anderen Seite des Containers befand sich im oberen Bereich eine weitere Öffnung, aus der das verbrauchte Medium das Kultivierungsgefäß wieder verlassen und in einer Abfallflasche gesammelt werden konnte. Das Gewebe wurde also immer mit dem gleichen Nähr- und Sauerstoffgehalt versorgt.

Problematisch bei der Kultivierung von Blutgefäßabschnitten war jedoch, dass eine Versorgung des Blutgefäßlumens mit Medium nicht gewährleistet war. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Tube Chamber System TCS^{2c} von Provitro etabliert. Prinzipiell ähnelt dieses System dem zuvor verwendeten Perfusionssystem nach Minuth, das Gewebe liegt jedoch nicht in einem Perfusionscontainer, sondern wird zwischen zwei Kolben mit Adaptern für die innere und äußere Mediumversorgung in einem Glaszylinder fixiert um dem Gewebe so ständig frische Nährstoffe zuzuführen. Es konnten so Blutgefäße variabler Längen verwendet, das Lumen und die äußere Oberfläche getrennt mit verschiedenen Medien versorgt und unterschiedliche Flussraten der Medien eingestellt werden.

4.3.1. Kultivierungsbedingungen

Der Kultivierungszeitraum betrug 14 Tage, das Kulturmedium wurde im Rahmen anderer Arbeiten am Institut für Biomedizinische Technik etabliert (siehe Anhang).

Es wurden porcine Carotisabschnitte nach unterschiedlichen Bedingungen kultiviert, dabei zwei verschiedene Medien für die Versorgung des inneren und des äußeren Bereichs der Blutgefäße untersucht sowie Stents in die Blutgefäße implantiert.

Tab. 4.10: Versuchsansätze Perfusionskultur

	innere Versorgung	äußere Versorgung	Stent
1	Perfusionsmedium	Perfusionsmedium	ohne
2	Schweineserum	Perfusionsmedium	ohne
3	Perfusionsmedium	Perfusionsmedium	Metallstent
4	Perfusionsmedium	Perfusionsmedium	17 β -Estradiol-Eluting Stent
5	Perfusionsmedium	Perfusionsmedium	Genistein-Eluting Stent

4.3.2. Gewebekulturaufbau

Die Gewebekultivierung im Perfusionssystem erfolgte mit porcinem Schlachtmaterial, welches genauso wie für die Primärzellisolierung durch das Versuchsschlachthaus des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf zur Verfügung gestellt wurde. Auf Grund der Größe (passend für die untersuchten Stentmaße) und der Verfügbarkeit wurden Blutgefäßabschnitte der *Arteria Carotis communis* sowie der *Arteria carotis interna et externa* von 6 Monate alten, meist weiblichen Schweinen der deutschen Landrasse entnommen und in Transportmedium (DMEM-Medium + 200 μ g/ml Penicillin/Streptomycin + 5×10^{-3} M Amphotericin) bei 4 °C bis zum Gewebekulturaufbau aufbewahrt.

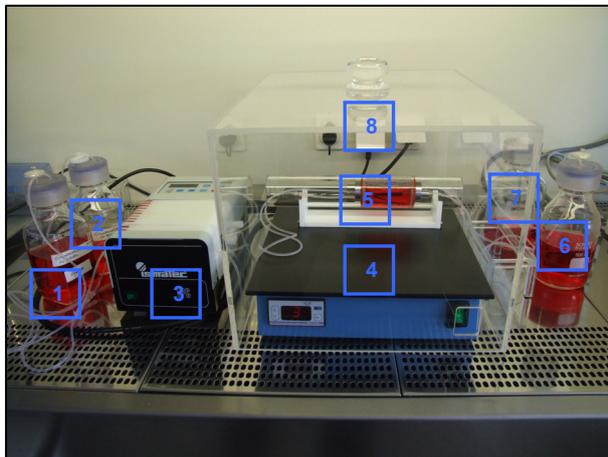


Abb. 4.3a
 1 Vorratsflasche äußere Versorgung
 2 Vorratsflasche innere Versorgung
 3 Peristaltikpumpe
 4 Wärmeplatte
 5 Kultivierungsgefäß
 6 Abfallflasche äußere Versorgung
 7 Abfallflasche innere Versorgung
 8 Wärmeabdeckung

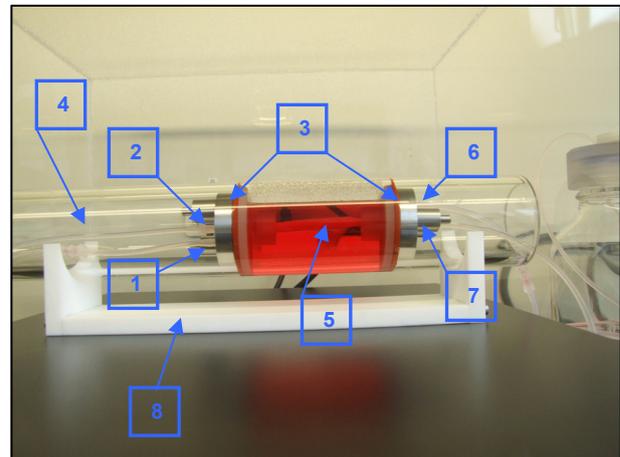


Abb. 4.3b
 1 Eintritt äußere Versorgung
 2 Eintritt innere Versorgung
 3 Kolben mit Adapter
 4 Glaszylinder
 5 Blutgefäß mit implantiertem DES
 6 Austritt äußere Versorgung
 7 Austritt innere Versorgung
 8 Ständer

Abb. 4.3: Gewebekulturaufbau mit dem Tube Chamber System TCS^{2c} von Provitro

Die Einzelteile der Perfusionsapparatur wurden vor dem Aufbau nach Herstellerangaben entweder autoklaviert, mit Heißluft oder mit H₂O₂-Plasma sterilisiert. Der Aufbau erfolgte an einer Sterilwerkbank, alle Hilfsmittel wurden sterilisiert verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde zudem mit sterilen Handschuhen gearbeitet.

Zunächst wurden Gewebereste vom Blutgefäß entfernt und dieses mit PBS gespült. Bis zum Einbau in die Perfusionskammer wurde der Carotisabschnitt in Transportmedium gelagert, um Austrocknung zu verhindern. Bei Versuchsansätzen mit Stentimplantation, wurde ein entsprechender DES-Prototyp auf einen Ballonkatheter gecrimpt und in dem Carotisabschnitt positioniert. Eine mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Handpumpe (ACS) wurde an den Katheter angeschlossen, und der Stent mit einem Druck von 10 bar für 10 sec aufgedehnt und irreversibel dilatiert. Daraufhin wurde zum Stabilisieren des Gewebes ein dünner Draht in das Blutgefäß eingeführt und das Blutgefäß mit Überwurfmuttern an die Adapter der Kolben für die innere Versorgung fixiert. Dichtungsringe gewährleisteten, dass sich die Medien für die innere und äußere Versorgung nicht vermischten. Dieser Komplex wurde nun in den Glaszylinder eingeführt und die Kolben fixiert. Danach erfolgte der Anschluss der Mediumversorgung an die entsprechenden Adapter für die innere und äußere Blutgefäßversorgung. Das Medium wurde nun mit einer Peristaltikpumpe transportiert und die Perfusionskammer geflutet. Die Flussrate für die innere und äußere Versorgung betrug 70,1 µl/min.

4.3.3. Untersuchungen des kultivierten Gewebematerials

Nach 14 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und Gewebe, das mit dem Stent in Kontakt war, für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen fixiert bzw. für histologische Untersuchungen und Immunfluoreszenz aufgeblickt. Der getestete Stentprototyp wurde zudem in weiterführenden Arbeiten am Institut hinsichtlich des Restwirkstoffgehalts mittels HPLC untersucht und die Daten für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.3.3.1. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Der Carotisabschnitt, der gegebenenfalls direkten Stentkontakt hatte, wurde mit einer ophthalmischen Schere längs aufgeschnitten, mit der Gefäßinnenseite nach oben mit Kanülen auf einer Präparationsunterlage befestigt und mit Fixierlösung überschichtet. Nach 30minütiger Inkubation wurde die Gewebeprobe in Fixierlösung bei 4 °C mind. 24 h gelagert. Nach dem Waschen mit 1 x Natrium-Phosphat-Puffer wurde die Gewebeprobe mit 30 % Ethanol gespült und durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert. Dazu erfolgte die Inkubation für 10 min in 50 % Ethanol, 10 min in 75 % Ethanol, 15 min in 90 % Ethanol und 2 x 10 min in 100 % Ethanol. Daraufhin konnte die Probe schonend durch Kritsch-Punkt-Trocknung getrocknet und mit einer ca. 10 nm dünnen Goldschicht im Sputter Coater beschichtet werden.

Die Bedienung des Rasterelektronenmikroskops und die Anfertigung der Aufnahmen erfolgte am Institut für Biomedizinische Technik durch Martina Schröder und Babette Hummel.

4.3.3.2. Histologische Untersuchungen (H+E-, Azan- und Elastika Färbung)

Aufblocken der Gewebeproben:

Zum Anfertigen von Cryostatschnitten war es notwendig, entsprechendes Gewebe (nativ oder kultiviert) aufzublöcken. Für die histologischen Untersuchungen mussten die Carotisabschnitte zuvor fixiert werden, die Immunfluoreszenz wurde mit unfixierten Proben durchgeführt.

Zu fixierende Carotisabschnitte wurden in Fixierlösung gegeben und 30 min inkubiert. Daraufhin konnte die Gewebeprobe aufgeblickt werden. Dazu wurde ein Gefäßabschnitt (fixiert oder unfixiert) von ca. 0,5 cm Länge auf einen Messingblock senkrecht mit etwas Tissue-Tek® fixiert und in flüssigem Stickstoff angefroren. Nachdem das Einbettmittel anfang zu gefrieren, wurde die gesamte Gewebeprobe mit Tissue-Tek überschichtet und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Es wurden Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm in einem Cryomikrotom (Leica) hergestellt und auf einen Objektträger gezogen. Die Aufbewahrung der Gewebeschnitte erfolgte bei -20 °C.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H+E-Färbung):

Bei der H+E-Färbung handelt es sich um eine histologische Übersichtsfärbung, bei der alle Zellkerne und basophile Bestandteile blau und das azidophile Zytoplasma rosa bis rot angefärbt werden.

Nach 10minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton wurden die Gewebeschnitte 4 min in Hämalun nach Mayer (Hämatoxylin-Ersatz; 1:5 verdünnt in Aqua dest.) gefärbt, kurz in Aqua dest. gespült und in lauwarmen Leitungswasser für 10 min gebläut. Daraufhin erfolgte die 50sekündige Färbung in Eosin, das Spülen in Aqua dest. und das Entwässern in einer aufsteigenden Ethanolreihe (10 s in 70 % Ethanol, 10 s in 96 % Ethanol, 4 min in absolutem Ethanol). Nach 3minütiger Inkubation in Xylol wurden die Präparate in Pertex eingedeckt und nach dem Trocknen lichtmikroskopisch dokumentiert.

Azanfärbung nach Heidenreich

Mit der Azanfärbung werden kollagene und retikuläre Bindegewebsfasern nach Beizung intensiv blau gefärbt, Muskelgewebe und Zellkerne rot und elastische Fasern orange. Es ist mit Hilfe dieser Färbemethode somit eine Unterscheidung von Bindegewebe und Muskulatur möglich.

Die Gewebeschnitte wurden nach 10minütiger Fixierung in Aceton kurz in Anilinalkohol (0,1 % [v/v] Anilin in 90 % Ethanol) eingestellt und 15 min bei 56 °C mit einer vorgewärmten Azokarminlösung im Wärmeschrank gefärbt. Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und in Anilinalkohol differenziert, so dass nur die Zellkerne angefärbt waren. Nach 30sekündigem Waschen mit essigsauerm Alkohol (1 % [v/v] Eisessig in 96 % Ethanol)

und kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte 30 min mit 5 % (w/v) Phosphorwolframsäure entfärbt und gebeizt. Daraufhin wurde kurz mit Aqua dest. gespült, 30 min in einem Anilinblau-Orange G-Gemisch gefärbt und wiederum kurz in Aqua dest. gespült. Nach Differenzierung der Gewebebestandteile in 96 % Ethanol wurden die Präparate in absolutem Isopropanol entwässert und in Pertex eingedeckt. Nach Trocknung konnten die Präparate lichtmikroskopisch dokumentiert werden.

Elastikafärbung nach Hart

Die Elastikafärbung ist eine histologische Färbemethode, mit der elastische Fasern hervorgehoben werden können. Diese werden blauschwarz, die Zellkerne rot und das restliche Gewebe schwach violett angefärbt.

Nach 10minütiger Fixierung in Aceton durchliefen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 5 min 100 %, 96 % und 80 % Ethanol). Anschließend erfolgte die 15minütige Färbung mit vorgewärmtem Resorcin-Fuchsin-Salzsäurealkohol im Wärmeschrank bei 70 °C und das Spülen in Aqua dest.. Für jeweils 5 min wurden die Gewebeschnitte daraufhin in 96 % und 80 % Ethanol differenziert, in Aqua dest. gewaschen und zum Anfärben der Zellkerne 15 min in Kernechtrot inkubiert.

Danach erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 min 80 % Ethanol, 10 min 96 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol) das Aufhellen für 2 x 1 min in Xylol und das Einbetten in Pertex. Die Dokumentation erfolgte am Lichtmikroskop.

4.3.3.3. Immunfluoreszenz zur Untersuchung der Wirkstoffverteilung und -anreicherung im Gewebe

Bei einem Teil der Perfusionsansätze wurden Drug-Eluting Stents in einen porcinen Carotisabschnitt implantiert. Die DES waren entweder 17 β -Estradiol- oder Genistein-inkorporiert. Um zu analysieren, ob und wie der jeweilige Wirkstoff im Gewebe angereichert und verteilt wird, sollten Cryostatschnitte der kultivierten Gewebeproben nach Stentkontakt mit einem gegen dem Wirkstoff gerichteten Antikörper untersucht werden. Diese Reaktion war dann mit einem sekundären, mit einem Fluochrom markierten Antikörper visualisierbar.

Tab. 4.11 primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Nachzuweisender Wirkstoff	Name des primären Antikörpers	Wirt	Hersteller	Verdünnung
17 β -Estradiol	anti-17 β -Estradiol (E2) mAb	Maus	Acris (BM959)	1:1000
Genistein	anti-Genistein (4',5,7'-Trihydroisoflavone) mAb	Maus	Biological (G2024-76)	1:1000

Dazu wurden die unfixierten Gewebeschnitte (Cryostatschnitte, Schnittdicke 5 μ m) zunächst mit 1 x PBS gewaschen und für 30 min mit 4 % Formalin fixiert. Daraufhin erfolgte das Permeabilisieren der Zellmembranen mit 0,1 % Triton X 100. Nach 3 x 5minütigem Waschen

mit 1 x PBS wurde mit dem Primärantikörper (verdünnt in Antikörperverdünnungslösung [Antibody Diluent; BD Pharmingen™]) für 2 h inkubiert.

Der Primärantikörper wurde daraufhin nach Ablauf der Inkubationszeit durch 3 x 5minütiges Waschen mit 1 x PBS von der Gewebeprobe entfernt und diese mit dem Sekundärantikörper eine weitere h inkubiert.

Tab. 4.12 sekundärer Antikörper für die Immunfluoreszenz

Nachzuweisender Wirkstoff	Name des primären Antikörpers	Wirt	Hersteller	Verdünnung
17 β -Estradiol	anti-mouse IgG H+L (FITC)	Ziege	Abcam	1:1000
Genistein				

Nach 3 x 5minütigem Waschen wurden für 3 min mit Hoechst 33342 (1:100 verdünnt in 1 x PBS) die Zellkerne angefärbt. Nach weiterem Waschen mit 1 x PBS (3 mal 5 min) konnte die Probe mit PBS eingedeckt werden.

Die Fluoreszenz konnte schließlich mit dem Fluoreszenzmikroskop (FluoView 1000, Olympus; Blaulichtanregung) visualisiert und mit der dazugehörigen Software dokumentiert werden. Zum besseren Vergleich der Wirkstoffe wurde die Fluoreszenz für 17 β -Estradiol rot, für Genistein grün dargestellt.

4.4. Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, beim MTS- und BrdU-Test vier und bei den Migrationsuntersuchungen 2 Parallelen getestet.

Die statistische Beurteilung erfolgte mit Hilfe der Standardabweichung und des homoskedastischen *Students-t*-Tests (Berechnung der Signifikanz) im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft EXCEL.

5. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Phytoöstrogen Genistein im Vergleich zum humanen Östrogen 17 β -Estradiol zunächst hinsichtlich des Einflusses auf vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen untersucht, um erste Aussagen über die biologische Aktivität zu treffen und Konzentrationsbereiche späterer Stentbeschichtungen einzugrenzen.

Zudem wurden Stentprototypen mit 17 β -Estradiol- und Genistein-Inkorporation hergestellt und der Einfluss auf kultivierte porcine Carotisabschnitte untersucht.

Erforderliche Vorversuche, wie das Freisetzungsverhalten der Wirkstoffe aus der Stentbeschichtung und die Etablierung des Perfusionsmediums sowie Untersuchungen an den humanen vaskulären Primärzellen wurden durch die Arbeiten der Nachwuchsgruppe unter der Leitung von Frau Prof. Katrin Sternberg (IBMT, Rostock) bewerkstelligt und konnten für diese Arbeit freundlicherweise genutzt werden.

5.1. Untersuchungen auf Zellebene

Im ersten Teil der Arbeit standen die Untersuchungen zum Einfluss von Genistein und 17 β -Estradiol auf Zellebene im Mittelpunkt. Die Versuche wurden an den Zelllinien BFA und A7r5 sowie an den porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC durchgeführt. Da die Resultate für die Zelllinien BFA und A7r5 für weiterführende Arbeiten nicht relevant waren, sind diese im Anhang dargestellt. Es erfolgten Untersuchungen zum Stoffeinfluss hinsichtlich Vitalität, Proliferation, Migration und der Expression ausgewählter Proteine.

5.1.1. Ergebnisse der Primärzellisolierung

Es konnten in dieser Arbeit erfolgreich porcine vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen nach OPITZ et al. (2004) und LINDL (2002) isoliert werden. Die gewonnenen Zellen wurden als ppEC (primary porcine Endothelial Cells) und ppSMC (primary porcine Smooth Muscle Cells) bezeichnet.

Die Zellkultur ppEC zeigte in der Kultivierung bereits nach wenigen Tagen ein schnelles Zellwachstum mit gut erkennbaren Zellansammlungen. Nach ca. 2 Wochen hatte sich eine konfluente Monolayer ausgebildet und die Zellen konnten mit Trypsin/EDTA passagiert werden, was Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen hatte. Nach der Isolierung wiesen die ppECs eine kleine kompakte Form auf, nach der Passage konnte man lang gestreckte Zellen erkennen, die lückenlose Zellverbände bildeten.

Ergebnisse

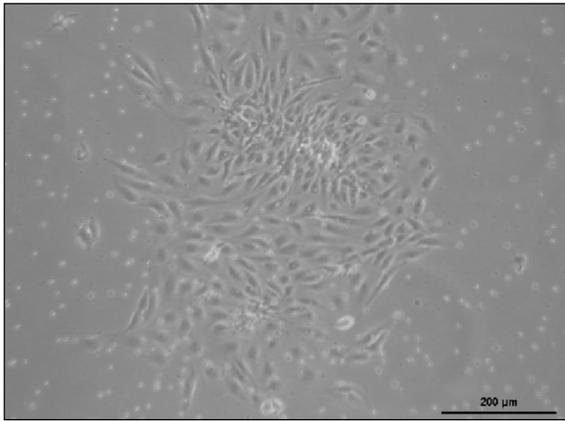


Abb. 5.1a

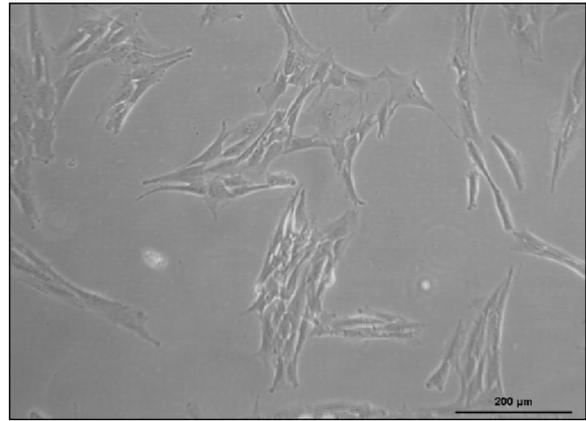


Abb. 5.1b

Abb. 5.1: Entwicklung der primären porcinen Endothelzellen (ppEC)

Abb. 5.1a: ppEC 3 d nach der Isolierung

Abb. 5.1b: ppEC Passage 1

In den immunchemischen Untersuchungen konnte der von Willebrand Faktor nur schwach nachgewiesen werden. Der Antikörper war spezifisch für den humanen von Willebrand Faktor und kreuzreagierte mit dem porcinen Typ nur schwach.

Die gewonnen Endothelzellen wurden in den Passagen 3-10 für Versuche verwendet.

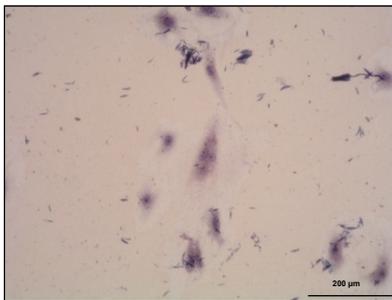


Abb. 5.2a

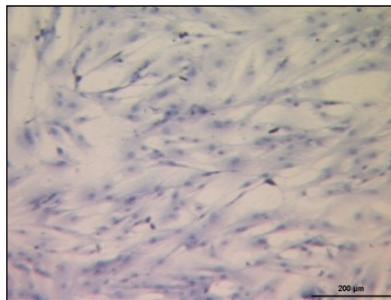


Abb. 5.2b

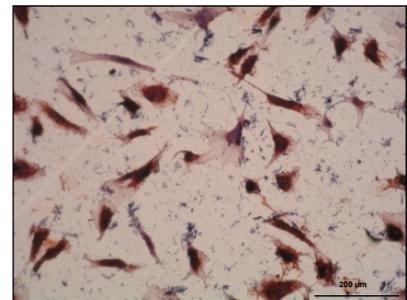


Abb. 5.2c

Abb. 5.2: Immunhistochemischer Nachweis des von Willebrand Faktors in der Primärzellen ppEC

Abb. 5.2a: ppEC, Nachweis des von Willebrandfaktors

Abb. 5.2b: ppEC, Negativkontrolle

Abb. 5.2c: HCAEC, Positivkontrolle, Nachweis des von Willebrandfaktors

Die Isolierung der ppSMC umfasste zunächst das Auswachsen der Fibroblasten für 2 Wochen und die anschließende PDGF-induzierte Migration der Muskelzellen aus der Media des Blutgefäßes. Nach ca. 3 Wochen waren somit die ersten Zellen muskulären Typs nachweisbar. Diese wiesen eine langgestreckte, spindelförmige Morphologie auf und konnten nach ca. 4 Wochen passagiert werden.

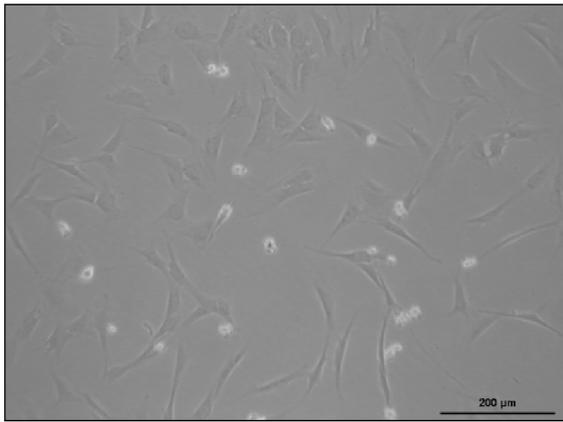


Abb. 5.3a

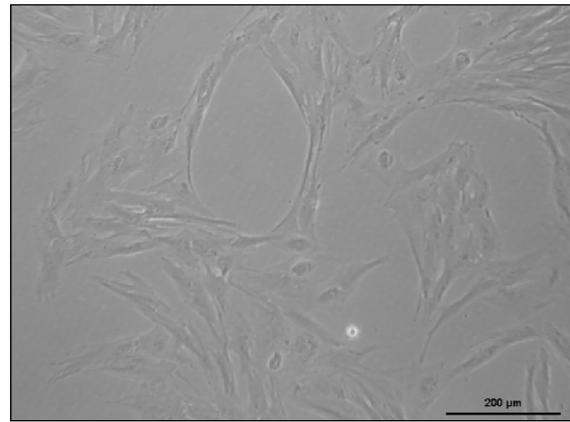


Abb. 5.3b

- Abb. 5.3: Entwicklung der primären porcinen glatten Muskelzellen (ppSMC)
Abb. 5.3a: ppSMC 22 d nach Beginn der Isolierung
Abb. 5.3b: ppSMC Passage 1
-

Im immunhistochemischen Nachweis des muskelspezifischen α -Smooth Muscle Actins konnte eine deutliche Reaktion nachgewiesen werden.

Für Versuche wurden die Muskelzellen ebenso in den Passagen 3-10 verwendet.

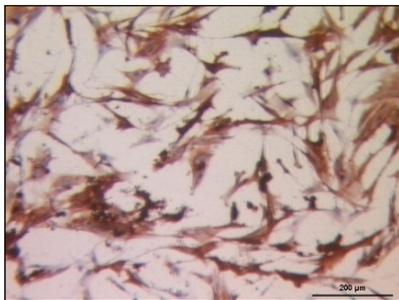


Abb. 5.4a

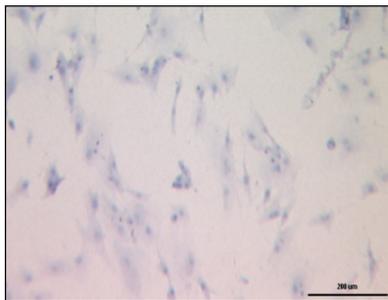


Abb. 5.4b



Abb. 5.4c

- Abb. 5.4: Immunhistochemischer Nachweis des α -Smooth Muscle Actins in den Primärzellen ppSMC
Abb. 5.4a: ppSMC, Nachweis des α -Smooth Muscle Actins
Abb. 5.4b: ppSMC, Negativkontrolle
Abb. 5.4c: A7r5, Positivkontrolle
-

5.1.2. Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf Vitalität und Proliferation von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen

Mit dem MTS-Test zum Vitalitäts- und dem BrdU-Test zum Proliferationsnachweis sollte der Einfluss des Phytoöstrogens Genistein im Vergleich zum Östrogen 17β -Estradiol analysiert werden. Diese Untersuchungen dienen dem Eingrenzen eines interessanten Konzentrationsbereiches, in dem mediale glatte Muskelzellen in der Proliferation gehemmt, Endothelzellen hinsichtlich Vitalität und Proliferation aber nach Wirkstoffbehandlung stimuliert wurden.

Das Vitalitäts- und Proliferationsverhalten der getesteten Zelltypen wurde nach 24 und 48 h Wirkstoffeinfluss untersucht. Da zu den untersuchten Zeitpunkten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt wurden, wurde in den folgenden Abbildungen für eine bessere Übersichtlichkeit lediglich der Einfluss der Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein vergleichend nach 48 h auf verschiedene Endothel- und glatte Muskelzelltypen dargestellt.

5.1.2.1. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden Primärzellen aus porcinem vaskulärem Gewebe isoliert und entsprechende Untersuchungen zum Wirkstoffeinfluss auf Vitalität und Proliferation durchgeführt.

In Abb. 5.5 ist vergleichend der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der vaskulären Primärzellen ppEC in Bezug zur arretierten und restimulierten Negativkontrolle NC3 dargestellt.

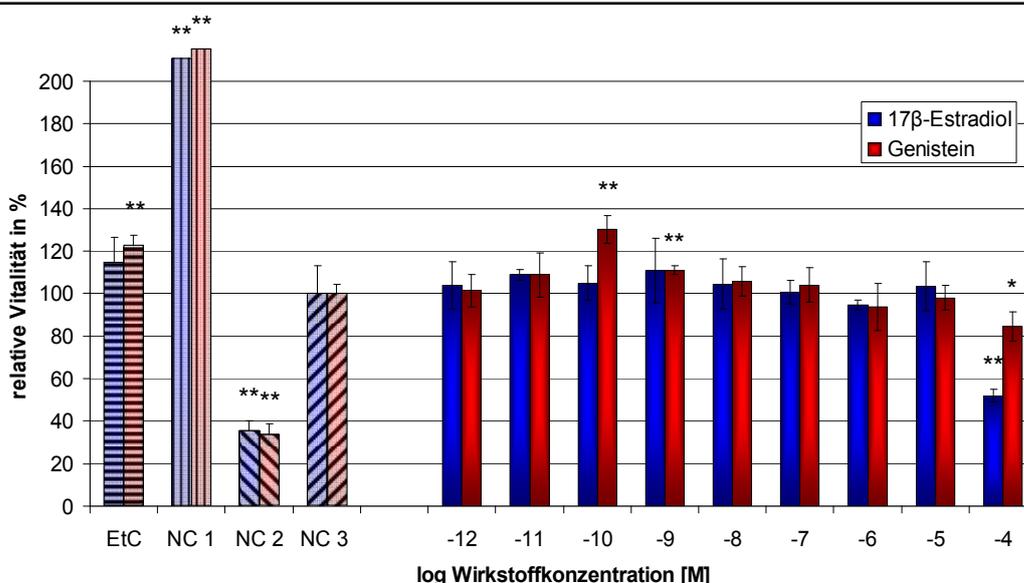


Abb. 5.5: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der porcinen Primärzellen ppEC
 relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Für das Pharmakon 17 β -Estradiol wurde nur bei einer Konzentration von 10^{-4} M eine signifikante Vitalitätshemmung der Primärzellen ppEC im Mittel um 48 % nachgewiesen. In allen anderen untersuchten Konzentrationsbereichen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Vitalität der Zellen gezeigt werden.

Ergebnisse

Der Wirkstoff Genistein reduzierte die Vitalität der primären porcinen Endothelzellkultur ppEC bei einer Konzentration von 10^{-4} M nach 48 h signifikant im Mittel um 15 %. Bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-9} - 10^{-10} M konnte nach 48 h Wirkstoffeinfluss eine signifikante Vitalitätsförderung von 11-30 % nachgewiesen werden. In den anderen getesteten Konzentrationsbereichen wurde kein signifikanter Einfluss von Genistein auf die Vitalität dieses Zelltyps nachgewiesen.

Abb. 5.6 zeigt den Einfluss der Pharmaka 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der vaskulären Primärzellen ppEC in Bezug zur Negativkontrolle NC3.

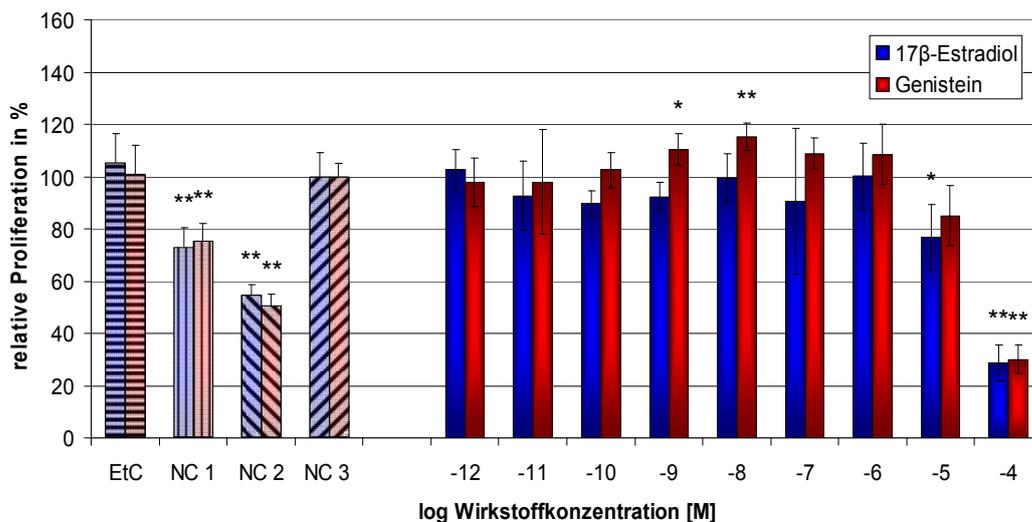


Abb. 5.6: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der porcinen Primärzellen ppEC
relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Die Proliferation der vaskulären Primärzellen ppEC wurde durch den Wirkstoff 17 β -Estradiol insbesondere bei einer Konzentration von 10^{-4} M beeinflusst. Es konnte in diesem Konzentrationsbereich nach 48 h eine signifikante Reduktion der Zellteilungsrate im Mittel um 71 % nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 10^{-5} M wirkte 17 β -Estradiol um 23 % proliferationshemmend.

Das Pharmakon Genistein beeinflusste die Primärzellen ppEC hinsichtlich der Proliferation bei einer Konzentration von 10^{-4} M durch eine signifikante 70%ige Hemmung nach 48 h Wirkstoffeinfluss. Bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-8} und 10^{-9} M konnte nach 48 h Wirkstoffeinfluss eine signifikante Proliferationsförderung im Mittel um 10-15 % gezeigt werden. Die Proliferationsuntersuchungen der Primärzellen ppEC nach Genistein-Einfluss bestätigen somit die ersten in den Vitalitätstests gewonnenen Daten.

Ergebnisse

Für die Negativkontrolle NC1, die während der gesamten Versuchslaufzeit mit Vollmedium (inkl. 10 % FCS) behandelt wurde, wurde für diesen Zelltyp eine Proliferationshemmung nachgewiesen. Die Zellzahl der in den entsprechenden Wells kultivierten ppEC ist während der Versuchsdauer zu hoch geworden, so dass in diesem Fall durch eine mikroskopisch nachweisbare Kontaktinhibition die Zellteilungsrate reduziert wurde.

Der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die primäre vaskuläre glatte Muskelzellkultur ppSMC hinsichtlich Vitalität in Bezug zu Negativkontrolle NC3 ist in Abb. 5.7 dargestellt.

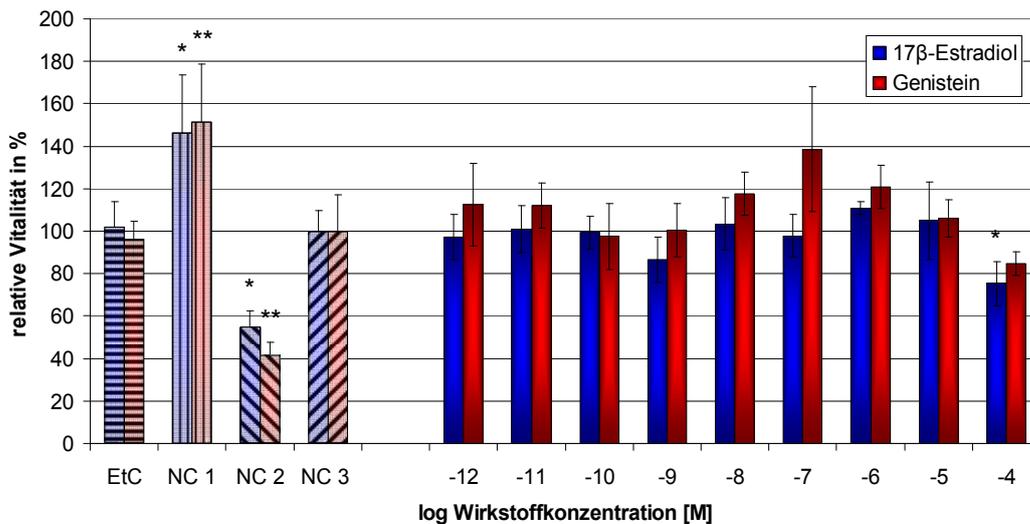


Abb. 5.7: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der porcinen Primärzellen ppSMC relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; $n=4$; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Der Einfluss des Wirkstoffes 17 β -Estradiol auf die Vitalität zeigte sich bei einer Konzentration von 10^{-4} M durch eine signifikante Hemmung im Mittel um 25 % nach 48 h Wirkstoffeinfluss. Diese Reduktion lässt sich jedoch, wie auch zuvor schon mehrmals beobachtet auf die Zytotoxizität des Pharmakons in diesem Konzentrationsbereich zurückführen. Alle weiteren untersuchten Konzentrationsbereiche des Wirkstoffes 17 β -Estradiol übten keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen aus.

Der Wirkstoff Genistein bewirkte in allen getesteten Konzentrationen keine Veränderung hinsichtlich der Vitalität der primären porcinen glatten Muskelzellkultur ppSMC.

Ergebnisse

In Abb. 5.8 ist vergleichend der Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf das Proliferationsverhalten der Primärzellen ppSMC in Bezug zur arretierten und restimulierten Negativkontrolle NC3 dargestellt.

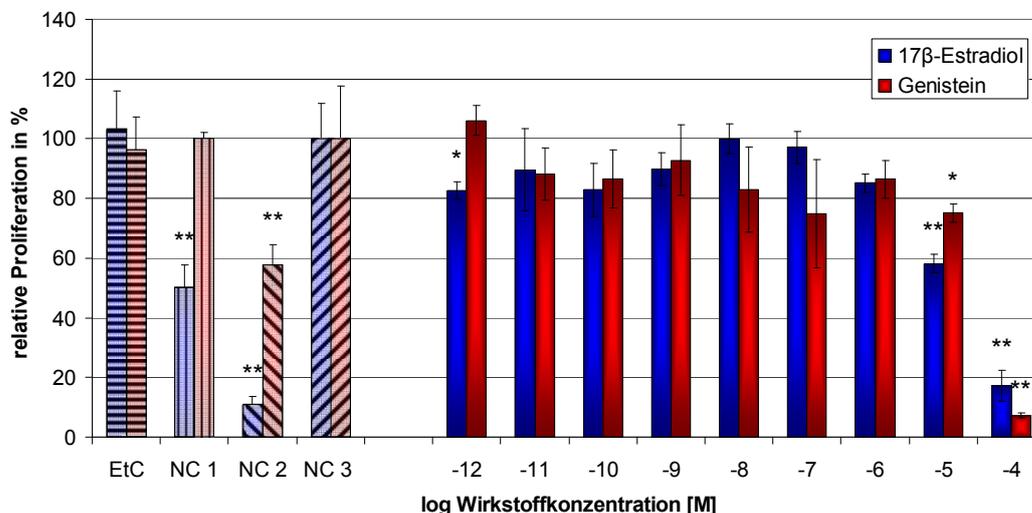


Abb. 5.8: Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der porcinen Primärzellen ppSMC
relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; $n=4$; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Die Proliferation der porcinen vaskulären glatten Muskelzellen ppSMC wurde durch den Wirkstoff 17β -Estradiol bei Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M deutlich gehemmt. Nach 48 h Wirkstoffeinfluss wurde die Proliferation im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 bei 10^{-4} M signifikant im Mittel auf 17 % reduziert, bei 10^{-5} M auf 58 %. Zudem konnte bei einer Konzentration von 10^{-12} M eine geringfügige Proliferationshemmung um 17 % beobachtet werden.

Nach 48 h Genistein-Behandlung wurde die Proliferation bei diesem Zelltyp bei einer Konzentration von 10^{-4} M signifikant im Mittel um 93 % reduziert, bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-5} M um 24 %. In allen weiteren getesteten Konzentrationsbereichen konnte nach Genistein-Behandlung keine Veränderung der Proliferationsrate gezeigt werden.

Sowohl das Pharmakon 17β -Estradiol als auch das Phytoöstrogen Genistein waren nur in hohen Wirkstoffkonzentrationen zu einer Proliferationshemmung bei der Zellkultur ppSMC befähigt. In diesen Konzentrationsbereichen ist die Zytotoxizität der Wirkstoffe ausschlaggebende Ursache für die nachgewiesene Reduktion der Zellteilungsrate. Eine

Proliferationshemmung auch in geringeren Konzentrationsbereichen konnte für die Primärzellen ppSMC nicht nachgewiesen werden.

5.1.2.2. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC

Die Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein wurden im Rahmen anderer Arbeiten am Institut für Biomedizinische Technik unter der Leitung von Frau Prof. Katrin Sternberg an den humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC hinsichtlich Vitalität und Proliferation getestet. Diese Daten wurden freundlicherweise für diese Arbeit bereitgestellt und sollen für Vergleichszwecke nachfolgend gezeigt werden.

Der Einfluss der Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein auf die humane vaskuläre Endothelzellkultur HCAEC hinsichtlich Vitalität in Bezug zur Negativkontrolle NC3 ist in Abb. 5.9 dargestellt.

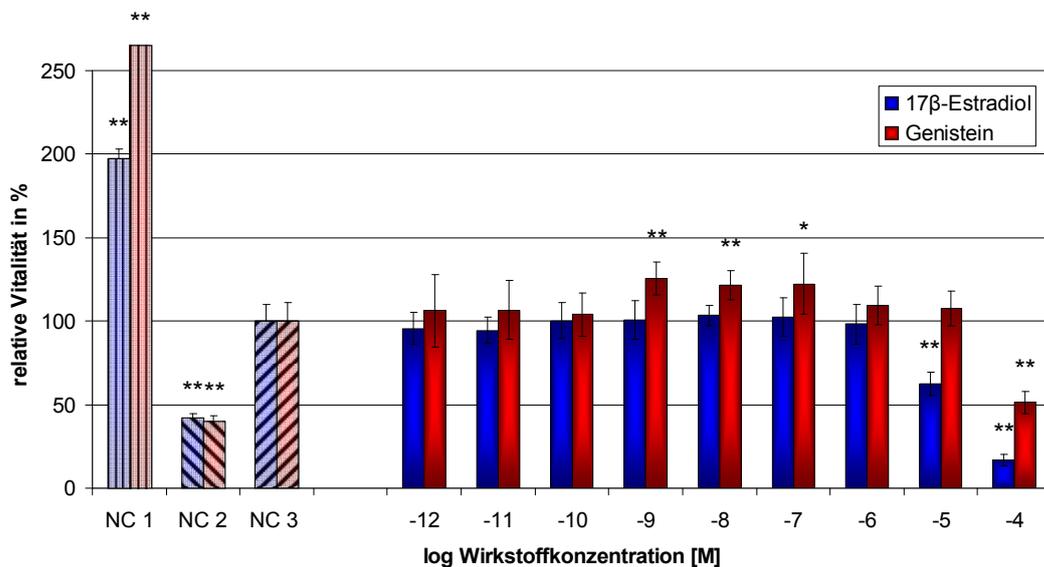


Abb. 5.9: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der humanen Primärzellen HCAEC

relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: Endothelial Cell Growth Medium MV2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Endothelial Cell Growth Medium MV2 + 0,5 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Im Hinblick auf die Vitalität der humanen endothelialen Primärzellen HCAEC bewirkte das Pharmakon 17 β -Estradiol nach 48 h bei einer Konzentration von 10^{-4} M eine signifikante Reduktion um 83 %, bei einer Konzentration von 10^{-5} M um 37 %. Für alle anderen untersuchten Wirkstoffkonzentrationen konnte hinsichtlich der Vitalität kein weiterer Einfluss von 17 β -Estradiol nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Für das Phytoöstrogen Genistein konnte ähnlich wie für das Östrogen 17 β -Estradiol bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M nach 48 h eine Vitalitätshemmung im Mittel um 50 % gezeigt werden, was sich wieder durch die Zytotoxizität der Wirkstoffe in diesem Konzentrationsbereich erklärt. Im Gegensatz dazu erwies sich Genistein jedoch in einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-9} M nach 48 h als vitalitätsstimulierend. Es wurde eine signifikante Vitalitätssteigerung der humanen Primärzellen HCAEC im Mittel um 20 % ermittelt. Diese Resultate bestätigen die in den Vitalitätsuntersuchungen der porcinen Primärzellen ppEC bisher gezeigte endothelzellstimulierende Charakteristik Genisteins. Es konnte aber auch mit diesen Ergebnissen für den Wirkstoff 17 β -Estradiol wiederholt gezeigt werden, dass hier keine Stimulation bewirkt werden konnte.

Der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf das Proliferationsverhalten der humanen endothelialen Primärzellen HCAEC in Bezug zur arretierten und restimulierten Negativkontrolle NC3 ist in Abb. 5.10 dargestellt.

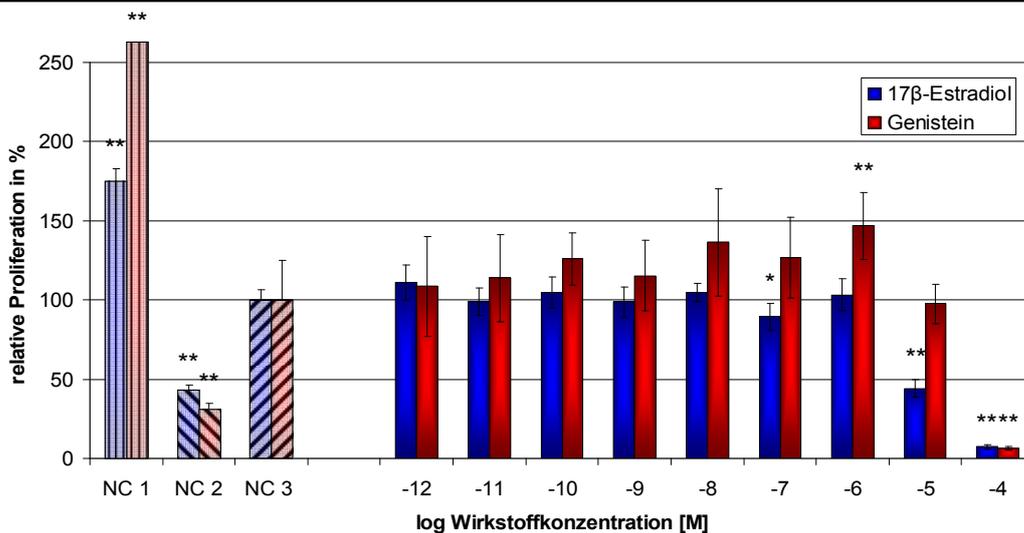


Abb. 5.10: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der humanen Primärzellen HCAEC
relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: Endothelial Cell Growth Medium MV2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Endothelial Cell Growth Medium MV2 + 0,5 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Aus dieser vergleichenden Abbildung ist ein unterschiedliches Wirkverhalten der Pharmaka 17 β -Estradiol und Genistein hinsichtlich des Einflusses auf die Proliferation der humanen endothelialen Primärzellen HCAEC ableitbar. Für den Wirkstoff 17 β -Estradiol war bei einer Konzentration von 10^{-4} M nach 48 h eine signifikante Proliferationsreduktion im Mittel um 90

Ergebnisse

% nachweisbar. Zudem wurden weitere Proliferationshemmungen nach 48 h bei einer Konzentration von 10^{-5} M um 55 % und bei 10^{-7} M um 10 % gezeigt.

Neben einer Proliferationshemmung des Phytoöstrogens Genisteins nach 48 h Wirkstoffeinfluss bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M um 90 %, konnte für eine Genistein-Konzentration von 10^{-6} M eine signifikante Proliferationsinduktion im Mittel um 50 % nachgewiesen werden. Diese proliferationsstimulierenden Eigenschaften Genisteins auf die humanen Endothelzellen HCAEC waren zudem in einem weiteren Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-11} M erkennbar. Da die Untersuchungsergebnisse jedoch mit sehr hohen Standardabweichungen behaftet waren, konnten diese Resultate nicht statistisch untermauert werden.

Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen bestätigen zum einen die Vitalitätstests dieses Zelltyps sowie die Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen an den porcinen Primärzellen ppEC. Es konnten für das Pharmakon Genistein im Gegensatz zum Östrogen 17β -Estradiol endothelstimulierende Eigenschaften nachgewiesen werden.

Der Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf die primären humanen Muskelzellen HCASMC hinsichtlich Vitalität ist in Abb. 5.11 dargestellt.

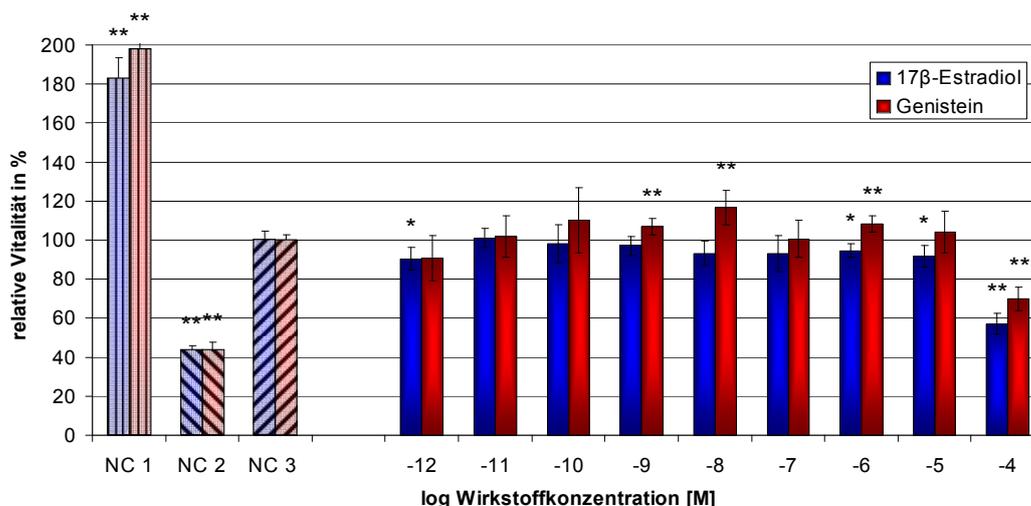


Abb. 5.11: Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der humanen Primärzellen HCASMC

relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; $n=4$; Medium: Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 + 0,1 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Der Wirkstoff 17β -Estradiol hemmte bei einer Konzentration von 10^{-4} M die Vitalität der humanen glatten Muskelzellkultur HCASMC nach 48 h Wirkstoffeinfluss signifikant im Mittel um 43 %. Die Konzentrationen 10^{-5} - 10^{-6} M sowie 10^{-12} M bewirkten eine Vitalitätshemmung

Ergebnisse

um 5-10 %. Alle weiteren getesteten Konzentrationen des Östrogens 17 β -Estradiol nahmen keinen signifikanten Einfluss auf das Vitalitätsverhalten der untersuchten Zellen.

Bei einer Konzentration von 10⁻⁴ M beeinflusste das Phytoöstrogen Genistein das Vitalitätsverhalten der humanen Muskelzellen durch eine signifikante Hemmung um 30 %. Desweiteren konnte bei etwas geringeren Wirkstoffkonzentrationen (10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻⁹ M) eine leichte Vitalitätsförderung von 7-17 % gezeigt werden. In allen anderen untersuchten Konzentrationsbereichen konnte kein Einfluss des Wirkstoffes Genisteins auf die Vitalität der Zellen nachgewiesen werden.

Für beide Pharmaka ist in der Literatur eine deutliche Hemmung glatter Muskelzellen hinsichtlich Vitalität und Proliferation beschrieben worden. Die bei 10⁻⁴ M Wirkstoffkonzentration nachgewiesene Vitalitätsreduktion ist wiederum der Zytotoxizität der Pharmaka in diesem Konzentrationsbereich zuzuschreiben. Bei geringeren Wirkstoffkonzentrationen konnte diese Hemmung nicht nachgewiesen werden, für Genistein wurde sogar eine geringe aber signifikante Vitalitätsstimulation gezeigt. Damit konnten die Resultate aus den Vitalitätsuntersuchungen der porcinen glatten Muskelzellkultur ppSMC bestätigt werden.

In Abb. 5.12 ist der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf das Proliferationsverhalten der humanen glatten Muskelzellkultur HCASMC in Bezug zur Negativkontrolle NC3 dargestellt.

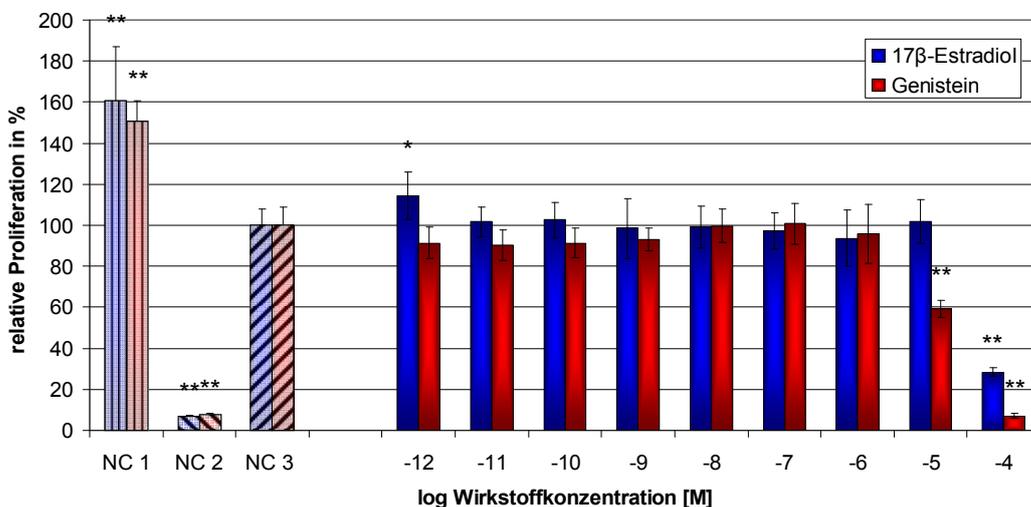


Abb. 5.12: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der humanen Primärzellen HCASMC
relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3 x 10⁴ Zellen/ml; n=4; Medium: Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 + 0,1 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Der hemmende Einfluss des Wirkstoffes 17 β -Estradiol auf das Proliferationsverhalten der Zellkultur HCASMC ist nur bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ M nachweisbar. Nach 48 h 17 β -Estradiol-Behandlung wurde die Zellteilungsrate signifikant im Mittel um 72 % reduziert. Dahingegen konnte bei einer Konzentration von 10⁻¹² M eine signifikante Proliferationsinduktion um 14 % gezeigt werden.

Das Proliferationsverhalten der humanen glatten Muskelzellen nach 48 h Genistein-Behandlung konnte nur bei Genistein-Konzentrationen von 10⁻⁴ und 10⁻⁵ M beeinflusst werden. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ M wurde die Zellteilungsrate um 93 %, bei 10⁻⁵ M um 41 % signifikant reduziert.

Alle weiteren getesteten Genistein-Konzentrationen bewirkten keine Proliferationshemmung. Die in der Literatur beschriebenen proliferationshemmenden Wirkungen von 17 β -Estradiol und Genistein konnten wiederholt nur bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden, die auf die Zytotoxizität der Wirkstoffe zurück zu führen sind. Diese Resultate bestätigen die bisher in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse aus den Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen.

5.1.2.3. Einfluss einer Genistein/Sirolimus-Kombinationslösung auf das Proliferationsverhalten der humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC

Hinsichtlich der Restenoseprävention nach kardiovaskulären Interventionen wurden für den Wirkstoff Sirolimus antiproliferative Auswirkungen auf vaskuläre glatte Muskelzellen durch verschiedene Forschergruppen beschrieben (LÜSCHER et al., 2007). Dieses Pharmakon ist zudem als Inkorporation in einem kommerziellen DES in der Klinik vorzufinden (SES; Cypher®; Cordis Corporation, Miami Lakes, FL, USA; NAKAZAWA et al.; 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für das Phytoöstrogen Genistein nur bedingt antiproliferative Fähigkeiten an glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Interessant ist aber die Stimulation vaskulärer Endothelzellen. Daher war es im Verlauf dieser vorangegangenen Untersuchungen interessant, was eine kombinierte Wirkstofflösung aus Genistein und Sirolimus für Auswirkungen auf vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen hat, da das Ziel der Restenoseforschung darin besteht, ein Präparat zu entwickeln, das die Fähigkeit besitzt vaskuläre Endothelzellen zu stimulieren, vaskuläre glatte Muskelzellen dagegen zu hemmen.

Es wurde dazu das Proliferationsverhalten der humanen primären Endothel- und glatten Muskelzellen (HCAEC und HCASMC) nach 48stündiger Behandlung mit der Wirkstoffkombination mittels des BrdU-Tests ermittelt.

Ergebnisse

Der Einfluss von Genistein und Sirolimus auf das Proliferationsverhalten der humanen endothelialen Primärzellen HCAEC in Bezug zur arretierten und restimulierten Negativkontrolle NC3 ist in Abb. 5.13 dargestellt.

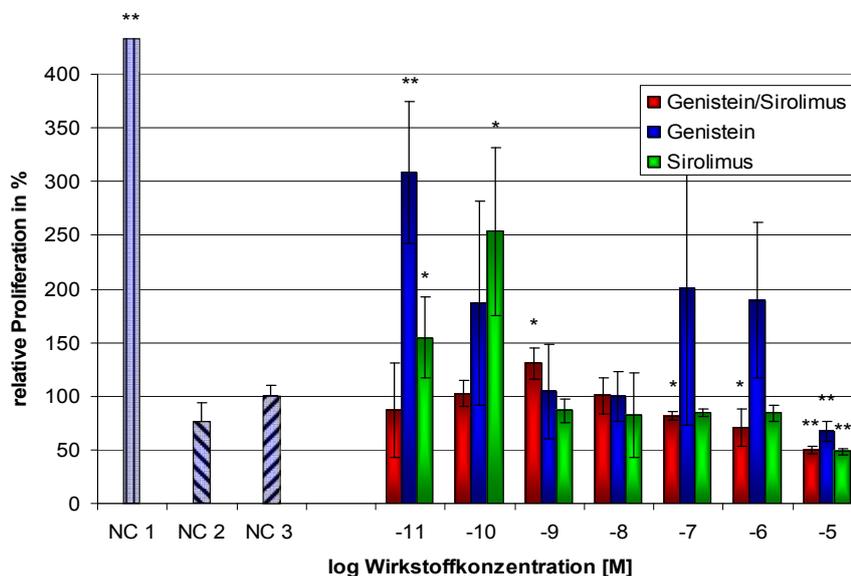


Abb. 5.13: Einfluss von Genistein und Sirolimus auf die Proliferation der humanen Primärzellen HCAEC relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; $n=6$; Medium: Endothelial Cell Growth Medium MV2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Endothelial Cell Growth Medium MV2 + 0,5 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-5} M bewirkten sowohl Genistein, als auch Sirolimus sowie eine Kombination aus beiden Wirkstoffen eine deutliche Proliferationshemmung. Dabei wurde die Zellteilungsrate durch Genistein im Mittel signifikant um 35 %, durch Sirolimus und der Kombinationslösung um 50 % reduziert. Bei dieser hohen Wirkstoffkonzentration liegt die Proliferationshemmung in der Zytotoxizität der Wirkstoffe begründet.

Das Phytoöstrogen Genistein bewirkte bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-6} - 10^{-7} M sowie 10^{-10} M eine deutliche Proliferationssteigerung, die durch die hohen Standardabweichungen jedoch statistisch nicht untermauert werden konnte, was jedoch die Ergebnisse der bisherigen Proliferationsuntersuchungen an diesem Zelltyp bestätigt (Abb. 5.10). Zudem wurde für eine Konzentration von 10^{-12} M eine signifikante Proliferationsinduktion im Mittel um 200 % gezeigt, die aber in den bisherigen Untersuchungen einzigartig war und daher in der Gesamtbetrachtung des Wirkstoffes Genisteins nicht aussagekräftig ist.

Neben der signifikanten Proliferationshemmung bei einer Konzentration von 10^{-5} M, stimulierte das Pharmakon Sirolimus die Zellteilungsrate der primären humanen Endothelzellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-11} M signifikant im Mittel um 50-

Ergebnisse

150 %. In den anderen untersuchten Konzentrationsbereichen konnte kein signifikanter Wirkstoffeinfluss ermittelt werden.

Die Kombinationslösung der Wirkstoffe Genistein und Sirolimus zeigte neben der Proliferationshemmung bei 10^{-5} M Wirkstoffkonzentration, die für alle Wirkstoffansätze nachgewiesen wurde, auch in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} - 10^{-7} M zellteilungsreduzierende Eigenschaften auf die Primärzellen HCAEC. Bei einer Konzentration von 10^{-9} M wurde hingegen eine signifikante Stimulation der Proliferation im Mittel um 35 % gezeigt. Für alle weiteren untersuchten Konzentrationsbereiche, konnte für die Kombinationslösung kein weiterer signifikanter Einfluss nachgewiesen werden.

Es konnte in diesem Versuchsansatz wiederholt für Genistein eine Proliferationsstimulation gezeigt werden, die aber auch bei Untersuchung der Kombinationslösung ersichtlich wurde. Wie aussagekräftig diese Daten nun sind, muss in weiterführenden Versuchen ermittelt werden.

In Abb. 5.14 ist der Einfluss von Genistein und Sirolimus sowie der Kombinationslösung auf das Proliferationsverhalten der humanen glatten Muskelzellen HCASMC in Bezug zur Negativkontrolle NC3 dargestellt.

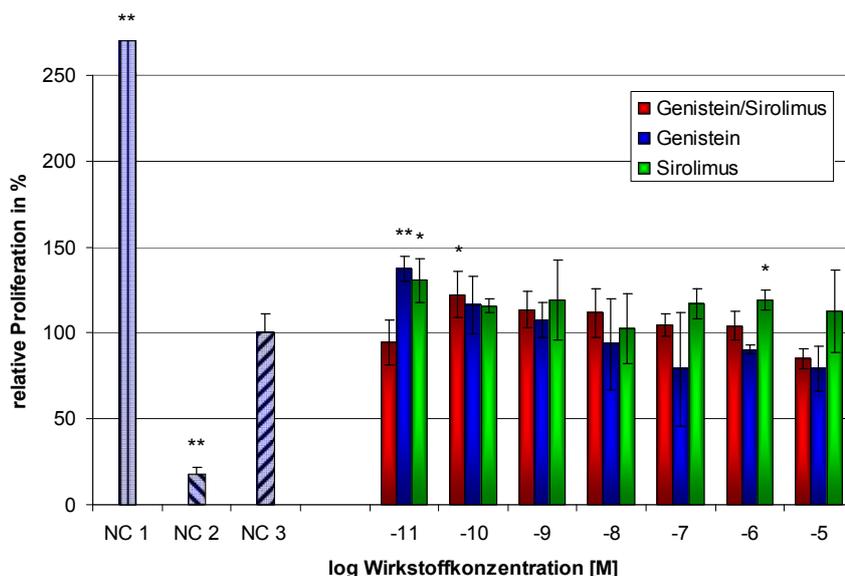


Abb. 5.14: Einfluss von Genistein und Sirolimus auf die Proliferation der humanen Primärzellen HCASMC

relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; $n=6$; Medium: Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 + 0,1 % FCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Es wird in diesem Versuchsansatz deutlich, dass weder Genistein noch Sirolimus, wie auch die Kombination beider Wirkstoffe im gesamten Konzentrationsbereich eine Proliferationshemmung der primären humanen glatten Muskelzellkultur HCASMC bewirkte.

Es konnte lediglich bei einzelnen Wirkstoffkonzentrationen eine signifikante Proliferationssteigerung nachgewiesen werden. Das Phytoöstrogen Genistein stimulierte bei einer Konzentration von 10^{-11} M die Zellteilungsrate im Mittel um 43 %, Sirolimus bei Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-11} M um 23-28 %. Für die Kombinationslösung wurde bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-10} M eine Proliferationsstimulation um 23 % gezeigt.

Für Genistein wurde in vorangegangenen Untersuchungen bereits nachgewiesen, dass die Fähigkeit zur Proliferationshemmung von vaskulären glatten Muskelzellen nur bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen vorliegt. Dieser Sachverhalt konnte mit diesen Untersuchungen bestätigt werden. Das Pharmakon Sirolimus zeigte in diesen Tests zudem ähnliche Wirkungen wie Genistein, eine signifikante Proliferationshemmung konnte nicht nachgewiesen werden.

Mit der Kombination beider Wirkstoffe sollte ein Präparat erzeugt werden, welches vaskuläre Endothelzellen in der Proliferation stimuliert, im gleichen Konzentrationsbereich vaskuläre glatte Muskelzellen jedoch hemmt. Da schon in der Sirolimus-Testung die erwartete Hemmung nicht gezeigt werden konnte, konnte dieser Nachweis auch nicht für die Kombinationslösung erbracht werden. In weiterführenden Untersuchungen muss nun die Aussagekraft dieser Daten ermittelt werden.

5.1.2.4. Zusammenfassung

In Tab. 5.1 sind die Resultate der Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen nach 17β -Estradiol- und Genistein-Einfluss sowie nach dem Einfluss der Genistein/Sirolimus-Kombination zusammenfassend dargestellt. Die Wirkstoffe 17β -Estradiol und Genistein bewirkten bei einer Konzentration von 10^{-4} M und zum Teil auch bei 10^{-5} M eine Reduktion der Vitalität und der Proliferation bei fast allen Zelltypen. Es ist also davon auszugehen, dass 17β -Estradiol und Genistein in diesem Konzentrationsbereich zytotoxisch wirkten.

Im Gegensatz zu 17β -Estradiol konnte durch Genistein Vitalität bzw. Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen gehemmt werden (insb. bei A7r5, Abb. IV [Anhang]). Zudem konnte aber auch eine Proliferationsförderung vaskulärer Endothelzellen (ppEC bei 10^{-8} - 10^{-9} M, Abb. 5.6; HCAEC bei 10^{-6} M Wirkstoffkonzentration, Abb. 5.10) gezeigt werden.

Die Wirkstoffkombination aus Genistein und Sirolimus bewirkte im getesteten Konzentrationsbereich lediglich auf die Endothelzellkultur HCAEC eine Proliferationshemmung in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} - 10^{-7} M (Abb. 5.13). Die Muskelzellkultur HCASMC wies nach Genistein/Sirolimus-Behandlung keine Proliferationshemmung auf.

Ergebnisse

Tab. 5.1: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein sowie Sirolimus/Genistein auf die Vitalität und Proliferation vaskulärer Endothel- und glatter Muskelzellen

	17 β -Estradiol		Genistein		Sirolimus/ Genistein
	Vitalität	Proliferation	Vitalität	Proliferation	Proliferation
BFA*	↓10 ⁻⁴ M	↓10 ⁻⁴ , 10 ⁻¹⁰ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶ , 10 ⁻¹⁰ -10 ⁻¹¹ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁸ -10 ⁻⁹ M	-
A7r5*	↓10 ⁻⁴ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶ , 10 ⁻¹⁰ -10 ⁻¹¹ M	kein signifikanter Einfluss	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻¹² M	-
ppEC	↓10 ⁻⁴ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	↓10 ⁻⁴ M, ↑10 ⁻⁹ -10 ⁻¹⁰ M	↓10 ⁻⁴ ↑10 ⁻⁸ -10 ⁻⁹ M	-
ppSMC	↓10 ⁻⁴ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ M, 10 ⁻¹² M	kein signifikanter Einfluss	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ M	-
HCAEC	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁷ M	↓10 ⁻⁴ M, ↑10 ⁻⁷ -10 ⁻⁹ M	↓10 ⁻⁴ M, ↑10 ⁻⁶ M	↓10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷ M ↑10 ⁻⁹ M
HCASMC	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶ M, 10 ⁻¹² M	↓10 ⁻⁴ M ↑10 ⁻¹² M	↓10 ⁻⁴ M, ↑10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁹ M	↓10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	↑10 ⁻¹⁰ M

↓ = Hemmung

↑ = Stimulation

*: Ausführliche Darstellung siehe Anhang

5.1.3. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Migration primärer vaskulärer glatter Muskelzellen

In restenotischen Prozessen wurde neben einer Induktion der Proliferation auch eine vermehrte Migration vaskulärer glatter Muskelzellen beschrieben. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neben Vitalitäts- und Proliferationstestungen auch Untersuchungen zum Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen durchgeführt werden. Zunächst wurden die Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein an den porcinen Primärzellen ppSMC hinsichtlich des Einflusses auf die Migration getestet. In weiterführenden Arbeiten am Institut für Biomedizinische Technik wurden unter der Leitung von Frau Prof. Sternberg Migrationsuntersuchungen an den humanen Primärzellen HCASMC durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden für diese Arbeit zu Vergleichszwecken freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.1.3.1. Wirkung auf die porcinen Primärzellen ppSMC

In Abb. 5.15 ist das Migrationsverhalten der Primärzellen ppSMC nach 17 β -Estradiol- und Genistein-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle K_P dargestellt.

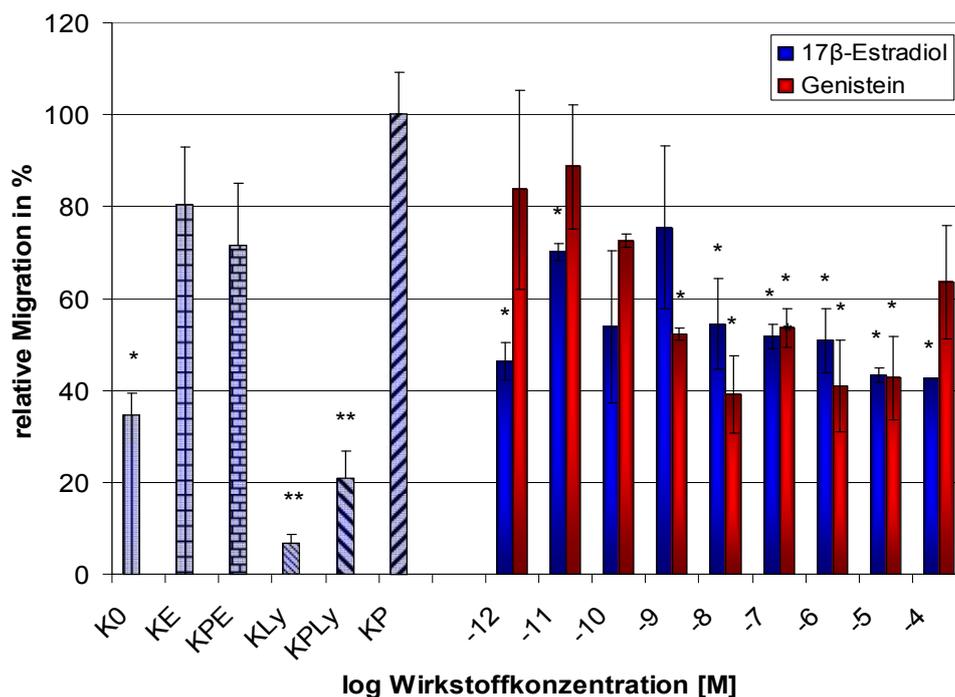


Abb. 5.15: Einfluss von Genistein und 17β-Estradiol auf die Migration der Primärzellen ppSMC; relative Migration in Bezug zu K_P
 Lösungsmittel der Wirkstoffe: Ethanol; Zellzahl: 1 x 10⁵ Zellen/ml; n=2; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep. ; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (10 ng/ml; außer bei K₀, K_E und K_{LY});
 K₀: ppSMC unbehandelt
 K_E: ppSMC + 0,2 % EtOH
 K_{PE}: ppSMC + 0,2 % EtOH+10 ng PDGF
 K_{LY}: ppSMC + 1 mM Ly294002 (Migrationshemmer)
 K_{Ply}: ppSMC+ 1 mM Ly294002+ 10 ng PDGF
 K_P: ppSMC + 10 ng PDGF
 Färbung und Zählung nach 24 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu K_P (p ≤ 0,05); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu K_P (p ≤ 0,01)

Das Pharmakon Genistein bewirkte in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁵-10⁻⁹ M eine signifikante Hemmung der Zellmigration im Mittel um ca. 50-60 %. In den anderen untersuchten Konzentrationsbereichen konnte kein Einfluss auf das Migrationsverhalten nach Genistein-Einfluss gezeigt werden.

Für den Wirkstoff 17β-Estradiol konnte eine migrationshemmende Wirkung in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁴-10⁻⁸ M im Mittel um 45-57 % nachgewiesen werden. Zudem zeigte 17β-Estradiol auch bei sehr geringen Wirkstoffkonzentrationen von 10⁻¹¹ und 10⁻¹² M einen migrationshemmenden Einfluss um ca. 30 bzw. 50 %.

Die mitgeführten Kontrollen entsprachen zudem den Erwartungen. Im Vergleich zur Bezugskontrolle K_P zeigten die Zellen der Kontrolle K₀ eine deutlich verringerte Migration. Daraus kann man schließen, dass der Wachstumsfaktor PDGF als Migrationslockstoff für die Primärzellen ppSMC unter diesen Versuchsbedingungen geeignet ist. Zudem lässt sich aus den Kontrollen K_E und K_{PE} schließen, dass das Lösungsmittel Ethanol in der höchsten

wirkstoffrelevanten Konzentration das Migrationsverhalten der Zellen nicht signifikant beeinflusst. Zusätzlich lässt sich aus den Kontrollen K_{Ly} und K_{PLy} die migrationshemmende Wirkweise von Ly294002 ableiten.

5.1.3.2. Vergleich zu den humanen Primärzellen HCASMC

In der Abb. 5.16 ist das Migrationsverhalten der humanen Primärzellen HCASMC nach Genistein- und 17β -Estradiol-Einfluss dargestellt.

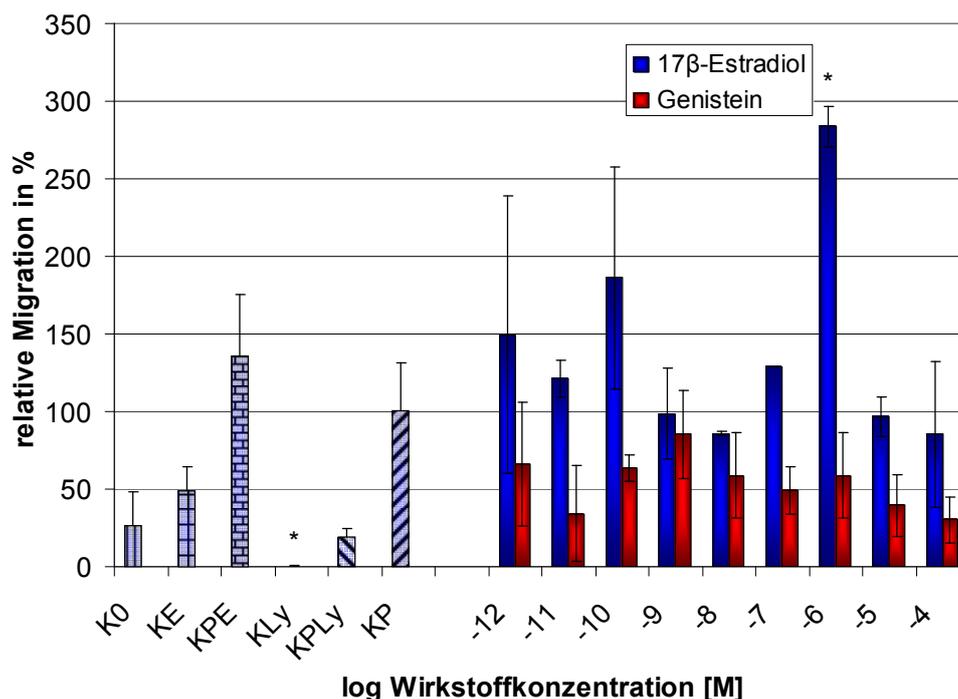


Abb. 5.16: Der Einfluss von Genistein und 17β -Estradiol auf die Migration der Primärzellen HCASMC; relative Migration in Bezug zu K_P
 Lösungsmittel der Wirkstoffe: Ethanol; Zellzahl: 1×10^5 Zellen/ml; $n=2$; Medium: Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit Supplement; 48 h Arretierung (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 + 0,1 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (10 ng/ml; außer bei K_0 , K_E und K_{Ly});
 K_0 : ppSMC unbehandelt
 K_E : ppSMC + 0,2 % EtOH
 K_{PE} : ppSMC + 0,2 % EtOH+10 ng PDGF
 K_{Ly} : ppSMC + 1 mM Ly294002 (Migrationshemmer)
 K_{PLy} : ppSMC+ 1 mM Ly294002+ 10 ng PDGF
 K_P : ppSMC + 10 ng PDGF
 Färbung und Zählung nach 24 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu K_P ($p \leq 5$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu K_P ($p \leq 1$)

Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich konnte lediglich bei einer 17β -Estradiol-Konzentration von 10^{-6} M eine signifikante Migrationsstimulation gezeigt werden. Alle weiteren getesteten Wirkstoffkonzentrationen, sowohl von 17β -Estradiol als auch Genistein, bewirkten keinen signifikanten Einfluss auf die Migration der primären humanen glatten Muskelzellkultur HCASMC.

Aus der Abbildung kann man jedoch ableiten, dass das Phytoöstrogen Genistein im Vergleich zum getesteten 17β -Estradiol migrationshemmende Eigenschaften besitzen könnte. Die Daten konnten jedoch auf Grund der sehr hohen Standardabweichung statistisch nicht untermauert werden. Mit diesem Versuch konnte somit das in dem vorangegangenen Migrationstest der Primärzellen ppSMC nachgewiesene migrationshemmende Potential beider Wirkstoffe nicht bestätigt werden.

5.1.4. Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf den Status ausgewählter Proteine in primären porcinen Endothel- und glatten Muskelzellen

Zunächst wurden die Effekte von 17β -Estradiol und Genistein auf Vitalität, Proliferation und Migration vaskulärer Endothel- und glatter Muskelzellen untersucht. Daher sollten neben der Untersuchung des Hitzeschockproteins HSP70, dessen Expressionsmuster Aussagen über den Zellstress der untersuchten Zellkulturen nach Wirkstoffeinfluss ermöglicht, einige in mitotischen Vorgängen involvierte Proteine hinsichtlich der Expression und auch des Aktivierungszustandes untersucht werden, die als Targets für die Wirkstoffe 17β -Estradiol und Genistein bekannt sind. Es soll untersucht werden, ob sich diese Zusammenhänge auf die porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC übertragen und verifizieren lassen.

5.1.4.1. Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus von ppEC

In der folgenden Abbildung ist der Einfluss des Wirkstoffes 17β -Estradiol sowohl nach 24 als auch nach 48 h auf das Muster ausgewählter Proteine der vaskulären Endothelzellkultur ppEC zusammenfassend dargestellt.

Es wurde bei diesen Untersuchungen zunächst der Gesamtgehalt des Proteinkomplexes p44/42 MAPK näher betrachtet. Der hier im Westernblot gegen p44/42 MAPK verwendete Antikörper detektiert laut Herstellerangaben eine Doppelbande zum einen bei einer Größe von 44 zum anderen bei 42 kDa. Aus Abb. 5.17 geht hervor, dass für alle untersuchten Proben nach 17β -Estradiol-Einfluss sowie für die Kontrollen ein positiver Proteinnachweis erfolgen konnte. Das Östrogen 17β -Estradiol bewirkte nahezu im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich nach 24 wie auch 48 h im Vergleich zur 48 h arretierten und mit 5 % FCS, 1 $\mu\text{g/ml}$ Ang II und 25 ng/ml EGF restimulierten Kontrolle NC3 keinen Unterschied in der Signalstärke der Banden. Eine Ausnahme stellte die mit 10^{-4} M 17β -Estradiol versetzte Probe nach 48 h Wirkstoffeinfluss dar. Im Hinblick auf die vorangegangenen Vitalitäts-, Proliferations- und Migrationsuntersuchungen wurde, bedingt durch eine geringe Anzahl lebender Zellen durch die hohe Wirkstoffkonzentration und der damit verbundenen

Ergebnisse

Zytotoxizität, nur eine geringe p44/42 MAPK Gesamtexpression bei dieser 17 β -Estradiol-Konzentration nachgewiesen.

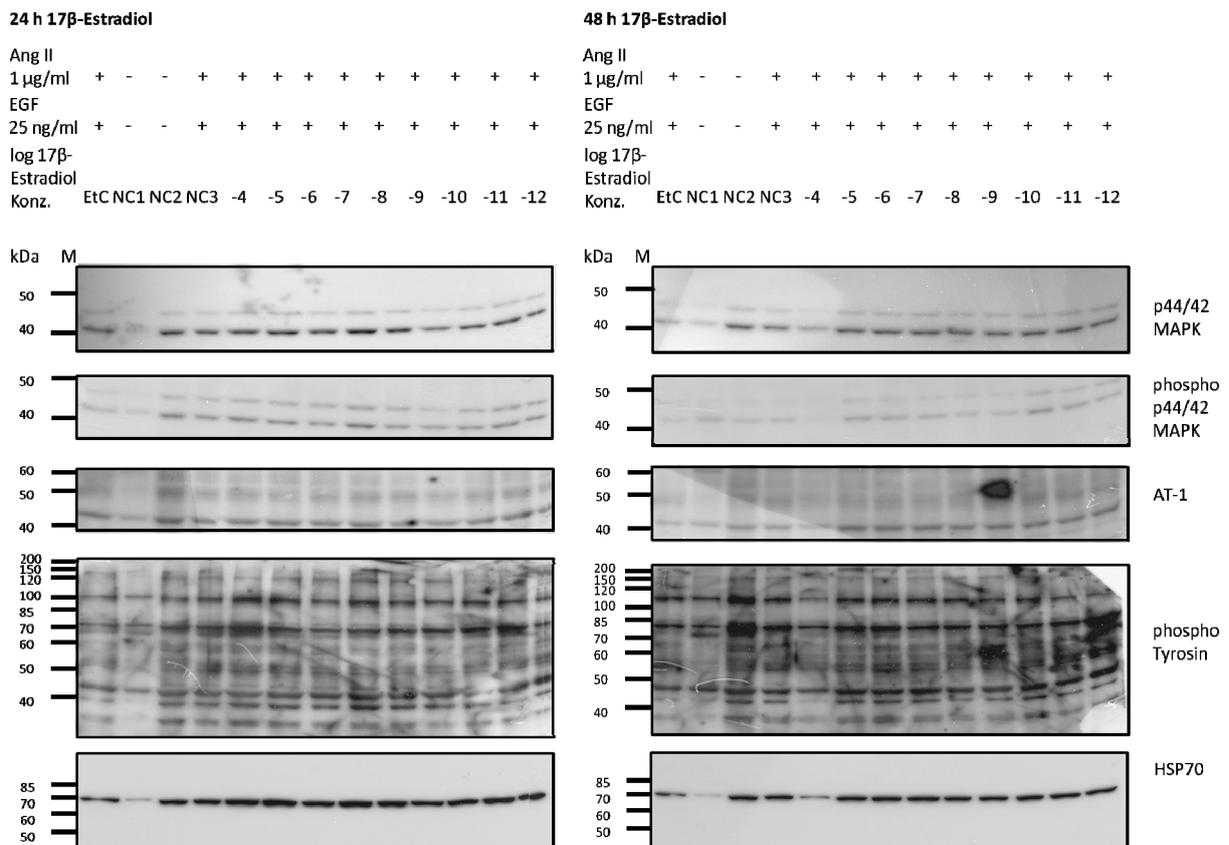


Abb. 5.17: Einfluss von 17 β -Estradiol auf das Proteinmuster in primären porcinen Endothelzellen. Lösungsmittel des Wirkstoffs: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); Ang II: 1 μ g/ μ l; NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH)

Die Aktivierung von p44/42 MAPK erfolgt über Phosphorylierung und führt zur Aktivierung von Nuclear Transcription Factors und anderen, im Zytoplasma lokalisierten Kinasen und somit unter anderem zur Stimulation zellulärer Proliferation und Migration. Daher wurde in dieser Arbeit neben dem Gesamt p44/42 MAPK Gehalt die phosphorylierte und somit aktive Form von p44/42 MAPK nachgewiesen, um mögliche Auswirkungen des Wirkstoffes 17 β -Estradiol auf das Proliferationsverhalten der primären porcinen vaskulären Zellkulturen ppEC und ppSMC zu analysieren.

Dazu erfolgte der Nachweis mit einem, gegen phosphorylierte p44/42 MAPK gerichteten Antikörper, der laut Herstellerangaben eine Doppelbande bei 42 und 44 kDa detektiert. Nach 24stündiger 17 β -Estradiol-Exposition waren die Intensitäten der Doppelbanden aller untersuchter Konzentrationsbereiche vergleichbar mit der 48 h arretierten und mit 5 % FCS, 1 μ g/ml Ang II und 25 ng/ml EGF restimulierten Bezugskontrolle NC3. Nach 48 h Wirkstoffeinfluss schien 17 β -Estradiol jedoch die Menge phosphorylierter p44/42 MAPK im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 zu erhöhen, denn alle getesteten Konzentrationen (mit

Ausnahme von 10^{-4} M Wirkstoffkonzentration) zeigten eine stärkere Bandenintensität als die der Kontrolle NC3. Es ist daher anzunehmen, dass 17β -Estradiol ein geringes Potential zu Aktivierung, sprich Phosphorylierung von p44/42 MAPK in den primären porcinen Endothelzellen ppEC aufweist.

Desweiteren wurde der Einfluss von 17β -Estradiol auf das Expressionsmuster des AT1-Rezeptors der porcinen vaskulären Primärzellen ppEC untersucht. Der in diesen Westernblotuntersuchungen verwendete, gegen den AT1-Rezeptor gerichtete Antikörper weist bis zu 3 Banden in den Proben bei Größen von 60, 45 und 40 kDa je nach Glykosylierung des Rezeptors nach, das Molekulargewicht des Rezeptors beträgt 41 kDa.

Es konnten in allen untersuchten Proben dieses Zelltyps die in den Herstellerangaben des Antikörpers angegebenen Banden nachgewiesen werden, die 60 kDa Bande war aber nur schwach nachweisbar. Nach 24- wie auch nach 48stündiger 17β -Estradiol-Applikation waren kaum Veränderungen im Bandenmuster nachweisbar. Dieser Wirkstoff scheint das Proteinexpressionsmuster des AT1-Rezeptors in den primären porcinen Endothelzellen nachweislich nicht zu beeinflussen.

Weiterhin sollte in diesen Untersuchungen geprüft werden, ob 17β -Estradiol bzw. Genistein Einfluss auf den Tyrosin-Phosphorylierungsstatus haben, und somit Rückschlüsse auf das zelluläre Proliferationsverhalten der porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC geschlossen werden können. Dazu wurde zunächst der Phospho-Tyrosin-Status nach 17β -Estradiol-Applikation der primären porcinen Endothelzellkultur ppEC untersucht. 17β -Estradiol beeinflusste sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Wirkstoffexposition den Status phosphorylierter Proteine nur wenig. Die Proben aller untersuchten Konzentrationsbereiche zeigten ein vergleichbares Bandenmuster hinsichtlich Struktur und Intensität. Eine Ausnahme ist wiederum nach 48 h 17β -Estradioleinfluss bei einer Konzentration von 10^{-4} M erkennbar. Hier ist die Stärke der nachgewiesenen Banden etwas schwächer, vermutlich auf Grund der Zytotoxizität von 17β -Estradiol bei dieser Konzentration.

Mit dem Nachweis des Hitzeschockproteins 70 (HSP70), welches zur Familie der 70 kDa großen, ubiquitär exprimierten HSPs gehört, sollten Aussagen über den zellulären Stress nach Wirkstoffexposition getroffen werden. Es handelt sich dabei um hochkonservierte Proteine, deren Aufgabe in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase besteht. Das unter normalen Umständen konstitutiv exprimierte HSP70 arbeitet während der Proteinsynthese als Chaperon und ist in Prozessen des intrazellulären Transports und der Degradation beteiligt. Unter Stress-Bedingungen wird durch die Beteiligung von HSP70 die zelluläre Struktur durch die Reparatur beschädigter Proteine im Zytoplasma und durch die Blockade der Apoptose geschützt. Daher wird HSP70 auch als Stressprotein bezeichnet und eine Hochregulierung dieses Proteins als eine Reaktion auf zellulären Stress angesehen (BEERE et al., 2000; BEERE, 2004).

Ergebnisse

Eine 24stündige 17 β -Estradiol-Exposition mit Wirkstoffkonzentrationen von 10⁻⁴ bis 10⁻¹² M nach 48stündiger Arretierung und Restimulierung mit 5 % FCS, 1 μ g/ml Ang II und 25 ng/ml EGF in Bezug zur arretierten und restimulierten Kontrolle NC3 zeigte keinen ersichtlichen Einfluss auf die HSP70-Expression. Es konnte für jede Probe eine Proteinbande mit einer Größe von 70 kDa nachgewiesen werden, wonach es sich nach Herstellerangaben des Antikörpers um das nachzuweisende Protein HSP70 handelt. Nach 48stündigem 17 β -Estradioleinfluss wurde ein ähnliches Resultat ermittelt. Lediglich bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ M wurde eine deutlich schwächere Bande im gesuchten Größenbereich nachgewiesen.

In Abb. 5.18 ist der Einfluss von Genistein auf das Muster ausgewählter Proteine der vaskulären Endothelzellkultur ppEC dargestellt.

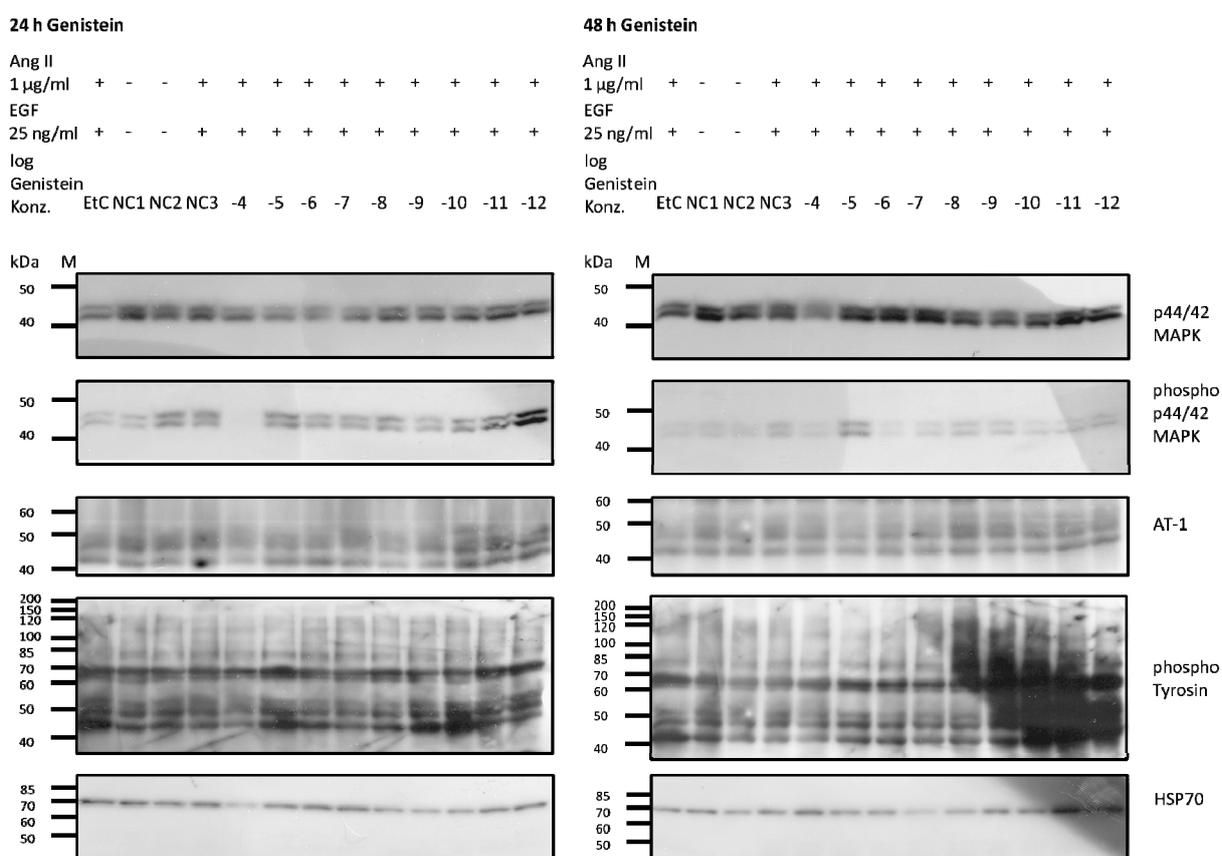


Abb. 5.18: Einfluss von Genistein auf das Proteinmuster in primären porcinen Endothelzellen. Lösungsmittel des Wirkstoffs: Ethanol; Zellzahl: 3 x 10⁴ Zellen/ml; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); Ang II: 1 μ g/ μ l; NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,2 % EtOH)

Der p44/42 MAPK Proteinkomplex konnte nach Genistein-Applikation im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich in Form einer Doppelbande bei Größen von 44 und 42 kDa nachgewiesen werden. Nach 24 h Wirkstoffeinfluss war die Bandenintensität von 10⁻⁴-10⁻⁷ M etwas geringer als die der arretierten und restimulierten Bezugskontrolle NC3. Die

Expression wurde in diesem Konzentrationsbereich nach 24 h Wirkstoffeinfluss durch Genistein folglich etwas reduziert.

Nach 48 h Genistein-Einfluss wurde außer bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M eine mit der der Bezugskontrolle NC3 vergleichbare Bandenintensität im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich nachgewiesen. Durch die Applikation von 10^{-4} M Genistein wurde die Menge von p44/42 MAPK deutlich reduziert.

Nach Prüfung des p44/42 MAPK Gesamtprotein-Status der Endothelzellkultur ppEC, sollte in weiteren Untersuchungen der Aktivierungsstatus dieser Proteingruppe ermittelt werden. Nach 24 h Genistein-Behandlung wurde ein ähnliches Resultat wie nach 24 h 17β -Estradiol-Einfluss ermittelt. Alle untersuchten Konzentrationen außer 10^{-4} M wiesen eine vergleichbare Bandenintensität mit der der Referenzkontrolle NC3 auf. Bei 10^{-4} M Wirkstoffkonzentration wurde phosphorylierte p44/42 MAPK nur schwach exprimiert.

Eine 48stündige Genistein-Behandlung bewirkte ein anderes Resultat: Die Proben, die mit Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-7} - 10^{-12} M behandelt wurden lieferten eine vergleichbare Bandenstärke wie die Bezugskontrolle NC3. Primäre porcine Endothelzellen, die mit 10^{-4} und 10^{-6} M Genistein exponiert wurden, zeigten nach Westernblot hinsichtlich des Nachweises von phosphorylierter p44/42 MAPK eine etwas geringere Bandenintensität. Bei einer Genistein-Konzentration von 10^{-5} M war dagegen der Gehalt dieses phosphorylierten Proteinkomplexes deutlich höher.

Es konnten also für beide Wirkstoffe nach 48 h bei einzelnen Konzentrationen eine erhöhte Menge der aktivierten, also phosphorylierten Form von p44/42 MAPK nachgewiesen werden. Für das Phytoöstrogen Genistein wurde vergleichend zu 17β -Estradiol der Einfluss auf die AT1 Proteinexpression untersucht. Es konnten auch für Genistein nur sehr geringe Unterschiede in der Bandenintensität nachgewiesen werden. Nach 24 h Wirkstoffinkubation war bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-9} M die Signalstärke der Banden etwas geringer im Vergleich zur arretierten und restimulierten Bezugskontrolle NC3, nach 48 h konnte dieser Aspekt in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-7} M nachgewiesen werden. Da es sich nur um geringe Unterschiede in der Bandenintensität handelt, sind diese schwer zu beurteilen.

Die Resultate der Westernblotuntersuchungen nach Genistein-Einfluss hinsichtlich des Phospho-Tyrosin-Status unterscheiden sich von denen nach 17β -Estradiol-Behandlung. Nach 24stündiger Genistein-Applikation konnte im Vergleich zur Bezugskontrolle eine verstärkte Phosphorylierung von Tyrosinen bei Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-8} - 10^{-9} M nachgewiesen werden, nach 48 h Wirkstoffexposition erweiterte sich der Konzentrationsbereich auf 10^{-5} - 10^{-12} M. Diese Resultate untermauern die Proliferationsuntersuchungen. Neben der Aktivierung von p44/42 MAPK werden auch Phosphotyrosinkinasen aktiviert, was sich in der Erhöhung des Phospho-Tyrosin-Status nach

Genistein-Applikation widerspiegelt. Diese Aktivität begünstigt die Proliferation und die Differenzierung von Zellen.

Der Einfluss von Genistein auf die endotheliale Primärzellen ppEC hatte, wie zuvor für das Pharmakon 17β-Estradiol nachgewiesen, im gesamten Konzentrationsbereich kaum Auswirkungen auf den HSP70-Status.

Es ist also davon auszugehen, dass beide Wirkstoffe nahezu im gesamten Konzentrationsbereich (Ausnahme 10⁻⁴ M) den zellulären Stress im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 nicht erhöhen.

5.1.4.2. Einfluss von 17β-Estradiol und Genistein auf den Proteinstatus von ppSMC

Der Einfluss von 17β-Estradiol auf das Proteinmuster der porcinen vaskulären glatten Muskelzellkultur ist in der folgenden Abbildung zusammenfassend dargestellt.

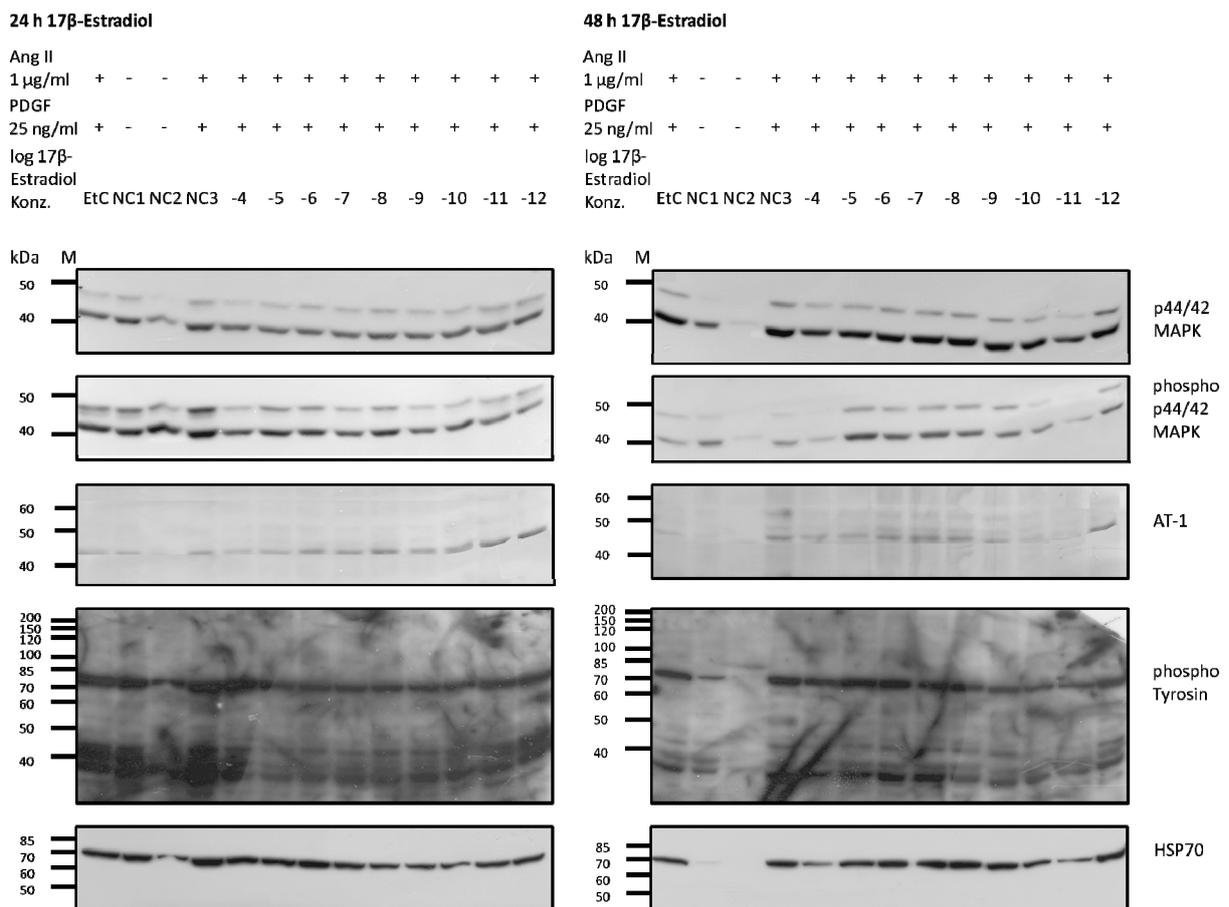


Abb. 5.19: Einfluss von 17β-Estradiol auf das Proteinmuster in primären porcinen glatten Muskelzellen.
 Lösungsmittel des Wirkstoffs: Ethanol; Zellzahl: 3 x 10⁴ Zellen/ml; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); Ang II: 1 µg/µl; NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH)

Zunächst wurde auch für dieses Zellkultursystem der Einfluss des Östrogens 17 β -Estradiol auf die p44/42 MAPK Gesamtexpression beurteilt.

Nach 17 β -Estradiol-Applikation konnte sowohl nach 24 als auch nach 48 h Wirkstoffbehandlung kein Unterschied in der Bandenintensität im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 gezeigt werden. 17 β -Estradiol zeigte somit keinen Einfluss auf die p44/42 MAPK Gesamtexpression der Zellkultur ppSMC.

Für die Kontrolle NC2, die während der gesamten Versuchsdauer arretiert wurde, konnte nur ein schwacher Nachweis erfolgen. Durch den fortwährenden Serumentzug zum Zeitpunkt der Probenaufarbeitung, wies dieser Ansatz eine deutlich geringere Zelldichte als in den anderen Proben auf. Zudem wurde die p44/42 MAPK Expression vermutlich durch den Serummangel eingeschränkt.

Um Aussagen über die Aktivität der p44/42 MAPK treffen zu können war auch in diesem Fall die Untersuchung der phosphorylierten Form dieses Proteinkomplexes notwendig. Nach 24stündiger 17 β -Estradiol-Applikation ist die Bandenintensität nach dem phospho p44/42 MAPK-Nachweis im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich etwas schwächer als die der Referenzkontrolle NC3, die 48 arretiert und mit 5 % FCS, 1 μ g/ml Ang II und 25 ng/ml PDGF restimuliert wurde. Die Menge aktivierter p44/42 MAPK wurde durch das Östrogen 17 β -Estradiol also geringfügig reduziert.

Ein 48stündiger 17 β -Estradiol-Einfluss lieferte ein gänzlich anderes Bild: Bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-9} M wurde im Vergleich zur Doppelbande der Referenzkontrolle NC3 eine deutlich stärkere Bandenintensität und somit auch eine höhere Menge phosphorylierter p44/42 MAPK nachgewiesen. Für alle Proben, die mit niedrigeren 17 β -Estradiol-Konzentrationen behandelt wurden, zeigten mit der Bezugskontrolle NC3 vergleichbare Resultate.

Für 17 β -Estradiol wurden somit die Ergebnisse aus den vorangegangenen Vitalitäts- und Proliferationstests bestätigt in denen sich dieses Pharmakon als nicht oder nur gering proliferationshemmend auf die porcine Primärzellen ppSMC auswirkte. Die Westernblotuntersuchungen zeigten, dass der in Signalkaskaden der Proliferation beteiligte Proteinkomplex p44/42 MAPK in seiner aktiven Form zwar nach 24h 17 β -Estradioleinfluss verringert wird, diese Reduktion aber nicht ausreichend ist, um eine Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen zu bewirken. Nach 48 h Wirkstoffexposition wurde sogar eine etwas höhere Menge phosphorylierter p44/42 MAPK als in der Kontrolle NC3 nachgewiesen, was bedeutet, dass 17 β -Estradiol nach 48 h eine Proliferationsstimulation bewirken könnte.

Für das Östrogen 17 β -Estradiol wurde beschrieben, dass der AT1 Rezeptor nach Applikation gehemmt und AT1-vermittelte Signalkaskaden inhibiert werden (NICKENIG et al., 1998). Dieser Sachverhalt sollte nun auch für die primäre porcine glatte Muskelzellkultur ppSMC

analysiert werden. Nach 17 β -Estradiol-Expositionen war bei 40 kDa ein positiver Nachweis sowohl nach 24 als auch nach 48 h Wirkstoffinkubation ersichtlich. Es konnte nach 24 h eine leichte Reduktion der AT1 Rezeptor Expression bei Konzentrationen von 10⁻⁴-10⁻⁵ M im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 gezeigt werden. In diesem Konzentrationsbereich reduzierte das Östrogen auch nach 48 h Wirkstoffinkubation die Proteinexpression des AT1 Rezeptors. Zusätzlich bewirkten 17 β -Estradiol-Konzentrationen von 10⁻⁹-10⁻¹¹ M eine verminderte AT1 Rezeptor Expression.

Der Phospho-Tyrosin-Status wurde durch 17 β -Estradiol-Behandlung der primären porcinen Muskelzellkultur ppSMC nur nach 24stündiger Wirkstoffinkubation beeinflusst. In einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁵-10⁻¹¹ M ist die Intensität der Banden deutlich geringer als die der arretierten und restimulierten Bezugskontrolle NC3 bei gleichbleibendem Bandenmuster. Nach 48 h konnte kein Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Aktivität der Phosphotyrosinkinase (PTK) und somit dem Phospho-Tyrosin-Status im untersuchten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Diese Resultate stützen vorangegangene Untersuchungen. Die Reduktion der MAPK-Aktivität konnte ebenso wie die Hemmung der Aktivität der PTK nur nach 24 h gezeigt werden.

Das Östrogen 17 β -Estradiol wirkte sich zudem sowohl nach 24 als auch nach 48 h nur leicht auf den HSP70-Status der primären porcinen glatten Muskelzellkultur ppSMC aus. Die bei einer Größe von 70 kDa nachgewiesenen Banden waren bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ M nach 24 h Wirkstoffeinfluss von gleicher Intensität wie die der Bezugskontrolle NC3. 17 β -Estradiol-Konzentrationen ab 10⁻⁸ M und geringer bewirkten sogar eine geringere HSP70 Expression, was auf einen geringeren Zellstress als bei der Negativkontrolle NC3 nach 24stündiger 17 β -Estradiol-Exposition schließen lässt.

Die Signalstärke der nachgewiesenen Banden bei einer Größe von 70 kDa war nach einer 48stündigen 17 β -Estradiol-Inkubation bei verschiedenen Konzentrationen vergleichbar mit der Intensität der arretierten und restimulierten Referenzkontrolle NC3. Ausnahme bildeten dabei die Proben, die mit Wirkstoffkonzentrationen von 10⁻⁴ und 10⁻¹¹ M behandelt wurden. Die geringere HSP70 Expression im Vergleich zur Negativkontrolle NC3 bei einer 17 β -Estradiol-Konzentration von 10⁻⁴ M lässt im Hinblick auf vorangegangene Untersuchungen auf Zytotoxizitäts-bedingte Effekte schließen, die geringere HSP70-Menge bei einer Konzentration von 10⁻¹¹ M im Vergleich zu den anderen untersuchten Konzentrationen und der Bezugskontrolle NC3 ist einmalig in der gesamten Versuchsreihe und scheint versuchsbedingt zu sein.

Für die Kontrolle NC1 wurde nur eine sehr schwache Bande nachgewiesen, was darauf hinweist, dass das Protokoll zur Stammhaltung der primären porcinen glatten Muskelzellen ppSMC nur eine geringe HSP70 Expression bewirkt und im Vergleich zur NC3 mit

Ergebnisse

48stündiger Arretierung und Restimulierung mit 5 % FCS, 1 µg/ml Ang II und 25 ng/ml PDGF ein deutlich geringerer Zellstress abzuwehren ist.

Da für die durchgängig arretierte Kontrolle NC2 keine Bande nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Menge von HSP70 durch den andauernden Serumentzug deutlich reduziert wurde.

In Abb. 5.20 ist der Einfluss des Phytoöstrogens Genistein auf das Muster ausgewählter Proteine der primären vaskulären glatten Muskelzellkultur ppSMC dargestellt.

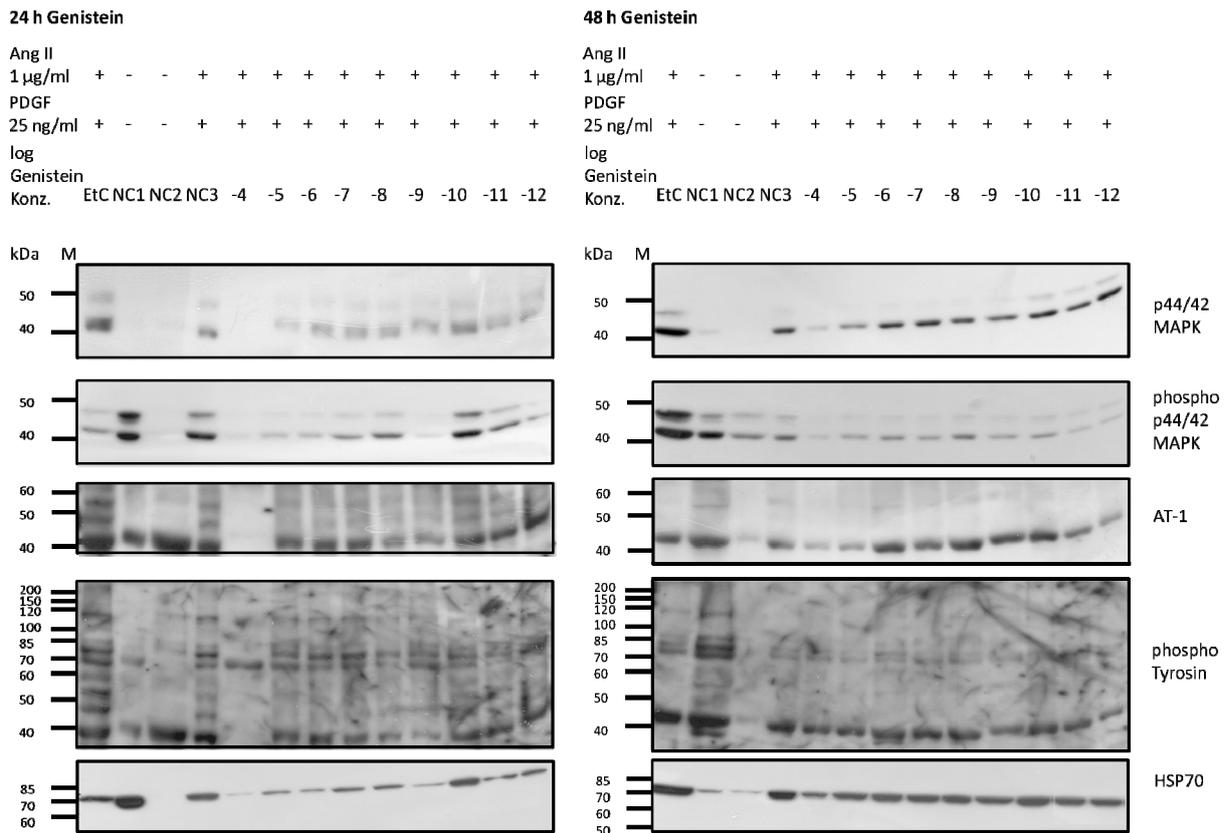


Abb. 5.20: Einfluss von Genistein auf das Proteinmuster in primären porcinen glatten Muskelzellen. Lösungsmittel des Wirkstoffs: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 0,2 % FCS + 100 µg/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); Ang II: 1 µg/µl; NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,2 % EtOH)

Die p44/42 MAPK Gesamtexpression wurde nach 24 h Genistein-Behandlung in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-9} M leicht reduziert, nach 48 h bei Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-5} M. Alle weiteren untersuchten Genistein-Konzentrationen zeigten keine Auswirkungen auf die Expression von p44/42 MAPK Gesamtprotein, die nachgewiesenen Doppelbanden waren in ihrer Intensität vergleichbar mit der der arretierten und restimulierten Bezugskontrolle NC3. Die unbehandelte Kontrolle NC1 lieferte zu beiden Zeitpunkten hingegen ein unerwartetes Resultat. Es konnte nur eine schwache p44/42 MAPK Gesamtexpression nachgewiesen werden, die eventuell durch eine Proliferationshemmung

durch Kontaktinhibition der Zellen mit Erreichen einer zu hohen Zelldichte erklärbar ist (auch in Proliferationsuntersuchungen wurde dieses Phänomen nachgewiesen [Abb. 5.8]).

Der Aktivierungsstatus von p44/42 MAPK nach Genistein-Applikation wurde im Gegensatz zur 17 β -Estradiol-Behandlung sowohl nach 24 als auch nach 48 h deutlich verändert. Ein 24stündiger Genistein Einfluss bewirkte in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁴ bis 10⁻⁹ M eine Reduktion der aktiven, also phosphorylierten Form des p44/42 MAPK Proteinkomplexes, nach 48 h war dieser Aspekt im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich zu beobachten.

Für das Phytoöstrogen Genistein wurde beschrieben, dass nach Applikation die Hemmung des AT1 Rezeptors erfolgt (YU et al., 2008). Im Hinblick auf die Resultate zur p44/42 MAPK Aktivität ist es sehr interessant, wie sich das Isoflavon auf die AT1 Rezeptorexpression der porcinen Primärzellen ppSMC auswirkt. Es konnten nach Genistein-Applikation alle 3, mit diesem Antikörper nachweisbaren Banden des Rezeptors im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden, was auf Unterschiede in der Glykosylierung des Rezeptors hinweist. In Konzentrationsbereichen von 10⁻⁴-10⁻⁵ M sowie 10⁻⁸-10⁻⁹ M konnte nach 24 h eine leichte Reduktion der AT1 Rezeptorexpression im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3 gezeigt werden. Der Effekt bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ M liegt aber in der Zytotoxizität von Genistein bei dieser Konzentration begründet.

Eine 48stündige Genistein-Exposition lieferte ebenso einen konzentrationsabhängigen Unterschied in der Bandenstärke einiger Proben im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3. Wirkstoffkonzentrationen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ M sowie 10⁻¹¹-10⁻¹² M bewirkten eine Reduktion der AT1-Rezeptor Menge in den primären porcinen glatten Muskelzellen im Vergleich zur arretierten und restimulierten Kontrolle NC3. Die Reduktion der AT1- Menge bei 10⁻⁴ M liegt dabei wiederum in der Zytotoxizität von Genistein bei dieser Konzentration begründet.

Der Einfluss des Phytoöstrogens Genistein wurde ebenso sowohl nach 24 als auch nach 48 h hinsichtlich des Status phosphorylierter Tyrosine untersucht. Es konnten lediglich nach 24 h Wirkstoffbehandlung leichte Unterschiede im Bandenmuster zwischen der Bezugskontrolle NC3 und den mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen getesteten Proben festgestellt werden. Zudem ist auch eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Bandenintensität erkennbar. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10⁻⁴ M konnte nur eine Bande bei 70 kDa deutlich nachgewiesen werden, Wirkstoffkonzentrationen in einem Bereich von 10⁻⁸-10⁻⁹ M bewirkten einen schwächeren Nachweis phosphorylierter Tyrosine.

Abschließend wurde für das Phytoöstrogen Genistein untersucht, in wie fern es sich auf den Zellstress der glatten Muskelzellkultur nach Applikation auswirkt. Nach 24 h Genistein-Exposition hatten alle nachgewiesenen Banden bei 70 kDa eine geringere Intensität als die der Bezugskontrolle NC3. Eine Ausnahme bildete dabei die Probe mit einer untersuchten Wirkstoffkonzentration von 10⁻¹⁰ M, die vergleichbar zur Kontrolle NC3 war. Zudem wurde

eine geringe HSP70 Expression bei 10^{-4} M festgestellt. Im Vergleich zu den vorangegangenen Vitalitäts-, Proliferations- und Migrationsuntersuchungen ist von einer Zytotoxizität des Wirkstoffes bei dieser Konzentration auszugehen.

Nach 48 h Genistein-Behandlung zeigte sich ein ähnliches Bild. Die nachgewiesenen Banden bei 70 kDa wiesen eine etwas geringere Stärke als die der Referenzkontrolle NC3 auf. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M zeigte sich auch nach 48 h aufgrund zytotoxischer Eigenschaften von Genistein eine deutlich geringere HSP70 Expression im Vergleich zur Kontrolle NC3.

Zusammenfassend können genauso wie für 17β -Estradiol auch für Genistein nahezu im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine Stressanzeichen durch erhöhte HSP70 Expression abgeleitet werden. Beide Wirkstoffe bewirken keinen erhöhten Zellstress in den relevanten Konzentrationsbereichen.

5.2. Kultivierung porciner Carotisabschnitte

Im Anschluss an die *in vitro* Testungen der Wirkstoffe 17β -Estradiol und Genistein musste ein experimentelles Modell herangezogen werden um die entsprechenden, am IBMT hergestellten und auf das Freisetzungsverhalten untersuchten Stentprototypen hinsichtlich der ausgelösten Gewebereaktionen zu charakterisieren. Basierend auf vorangegangene Untersuchungen wurde ein Perfusionsmodell weiterentwickelt, in dem Blutgefäßabschnitte mit den zu testenden DES kultiviert werden konnten. Auf Grund der Verfügbarkeit des biologischen Materials und der Größe der zu applizierenden DES wurden porcine Carotisabschnitte in dem Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) 14 Tage nach unterschiedlichen Bedingungen kultiviert (Punkt 4.3.1.) und nachfolgend morphologisch und histologisch untersucht.

5.2.1. Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung

Bevor Gewebereaktionen nach Stentkontakt in diesem Kultivierungsmodell genauer untersucht werden konnten, musste geklärt werden, ob mit diesem System porcine Carotisabschnitte über einen Zeitraum von 14 d mit dem zuvor am IBMT etablierten Perfusionsmedium vital erhalten werden konnten. Daher erfolgte die Kultivierung zunächst unter Verwendung des Perfusionsmediums sowohl für die innere als auch die äußere Blutgefäßversorgung. Die Darstellung der Resultate erfolgte mit bildgebenden Verfahren. Die rasterelektronenmikroskopischen und histologischen Ergebnisse sind in Abb. 5.21 zusammenfassend dargestellt.

Nativ

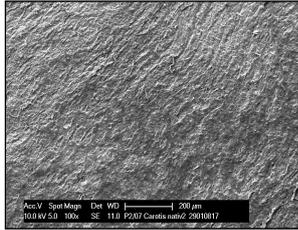


Abb. 5.21a

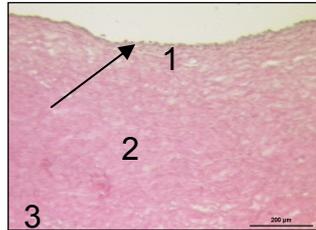


Abb. 5.21b

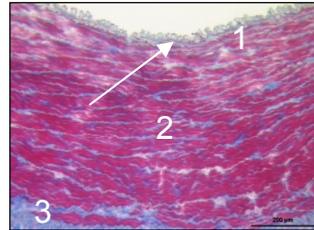


Abb. 5.21c

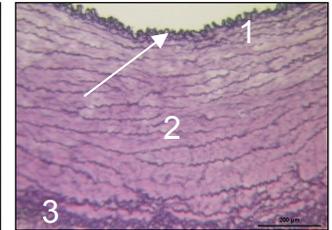


Abb. 5.21d

14 d kultiviert

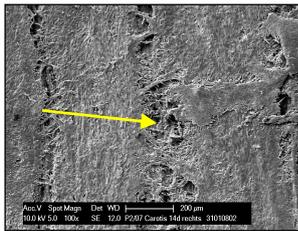


Abb. 5.21e

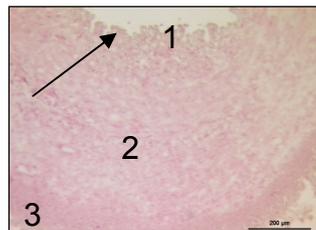


Abb. 5.21f

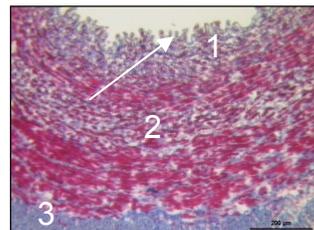


Abb. 5.21g

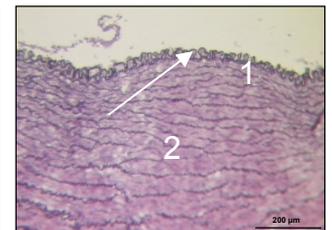


Abb. 5.21h

- Abb. 5.21: Rasterelektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines kultivierten Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung
- Abb. 5.21a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines nativen Carotisabschnittes
- Abb. 5.21b: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.21c: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.21d: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- Abb. 5.21e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes
- Abb. 5.21f: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.21g: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.21h: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- 1: Intima, 2: Media, 3: Adventitia, Pfeil gelb: geschädigter Intimabereich, Pfeil weiß+schwarz: Endothel

Zur Untersuchung der Intimamorphologie wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Blutgefäßinnenseiten von nativem und 14 d kultiviertem Gewebe angefertigt. Das Endothel der Intima eines nativen Carotisabschnittes (Abb. 5.21a) wurde dem eines 14 d mit innerer und äußerer Mediumversorgung kultivierten Carotisabschnittes vergleichend gegenübergestellt (Abb. 5.21e).

Arterielle Blutgefäße sind aus drei konzentrischen Schichten aufgebaut. Nach innen wird das Blutgefäß von der Intima abgegrenzt, die mittlere Schicht stellt die Media und die äußere Schicht die Adventitia dar. Die mit dieser Methode dargestellte Intima besteht aus einem dünnen Plattenepithel, dem sogenannten Endothel. Die Zellen eines Epithels sind sehr dicht gelagert und besitzen nur sehr schmale Interzellularräume. Epithelien besitzen eine Barrierefunktion und bedecken innere und äußere Oberflächen oder kleiden Hohlorgane aus. Die Intima des nativen Untersuchungsmaterials erwies sich als intakt, es ist ein lückenloser Endothelzellverband erkennbar.

Nach 14tägiger Kultivierung sind einige Lücken im Plattenepithel (gelber Pfeil) der sonst weitestgehend intakten Intima erkennbar. Die Ursache des Fehlens einiger Endothelzellen aus diesem Verband liegt jedoch in der Methode begründet. Während des Aufbaus der Gewebekultur im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) musste das Blutgefäß mehrmals mit Waschpuffer gespült werden, um ein Verkleben des Lumens des Carotisabschnittes zu vermeiden und damit die Durchgängigkeit des Mediums bei dem verwendeten Pumpendruck zu gewährleisten. Die Scherkräfte könnten beim Spülen des Gefäßabschnittes zu groß gewesen sein, so dass sich einige Zellen aus dem Endothelzellverband lösten und mit dem Waschpuffer aus dem Carotisabschnitt entfernt wurden.

Neben der morphologischen Begutachtung der Intimastruktur mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden auch Querschnitte von nativem und kultiviertem Probenmaterial angefertigt und diese drei unterschiedlichen etablierten histologischen Färbungen unterzogen. Dazu diente die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung, die Azanfärbung wurde zum Darstellen von Muskel- und Bindegewebe sowie der Kollagenfasern herangezogen, mit der Elastikafärbung wurden die elastischen Fasern der entsprechenden Blutgefäßquerschnitte angefärbt.

In Abb. 5.21b und f sind Hämatoxylin-Eosin (H+E) gefärbte Querschnitte von nativen (b) und 14 d kultivierten Carotisquerschnitten (f) vergleichend dargestellt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die die Zellkerne blauviolett, das Zytoplasma und Kollagenfasern rot und die elastischen Fasern ungefärbt bis rosa erscheinen lässt. Zunächst ist mit der H+E-Färbung die hohe Varianz im biologischen Material erkennbar, was die Beurteilung der Gewebeschnitte verkompliziert. Es sind jedoch sowohl im nativen als auch im kultivierten Carotisabschnitt die charakteristischen drei, konzentrisch angeordneten Schichten, die Intima (1), die das Blutgefäß innen auskleidet, die Media (2), die den mittleren aber auch größten Teil des arteriellen Blutgefäßes umfasst, sowie die das Blutgefäß nach außen abgrenzende Adventitia (3) gut darstellbar. Die mit dieser Färbung gezeigte Zellstruktur wies kaum Unterschiede zwischen nativen und kultiviertem Gewebematerial auf. Die Kultivierung in diesem Perfusionssystem nimmt somit nur geringen Einfluss auf die mit dieser Färbung darstellbare Gewebeintegrität, die Zellen der verschiedenen Blutgefäßbestandteile bilden einen einheitlichen Verband, der mit dem des nativen Materials vergleichbar ist.

Es sind lediglich Differenzen in der Beschaffenheit des Endothels (Pfeil) erkennbar. Im nativen Carotisquerschnitt ist eine zusammenhängende Endothelschicht erkennbar, die Zellen sind lückenlos nebeneinander angeordnet und grenzen das Blutgefäß zum Lumen hin ab. Der Gewebequerschnitt des kultivierten Carotisabschnittes wies keine lückenlose Anordnung der Endothelzellen auf. Es ist zu vermuten, dass der Querschnitt aus einem

Bereich des Blutgefäßes stammt, der methodisch bedingt Störungen der Intimastruktur aufwies, die in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bereits erkennbar waren.

Für weitere detailliertere Aussagen wurden diese Gewebeteile zusätzlich spezifischen Färbungen unterzogen. Für Blutgefäße ist die Azanfärbung eine geeignete histologische Methode. Es werden die Farbstoffe Azokarmin, Anilinblau und Orange G verwendet, die retikuläre und kollagene Fasern blau und Zellkerne und Muskelgewebe leuchtend rot anfärben. Es ist daher mit dieser Methode eine Differenzierung zwischen Muskel- und Bindegewebe möglich. Sowohl aus der Abbildung der nativen (Abb. 5.21c) wie auch der kultivierten Probe (Abb. 5.21g) ist der typische Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes muskulären Typs erkennbar, die einzelnen Schichten sind mit Hilfe dieser Färbung gut voneinander abgrenzbar. Insbesondere die Struktur der Media (2) und der Adventitia (3) sind gut darstellbar. Die Media besteht zu einem großen Teil aus ringförmig angeordneten, dichtgepackten glatten Muskelzellen, die von zarten Kollagenfasern umgeben sind. Für die Adventitia sind hauptsächlich Bindegewebsfasern erkennbar. Zudem ist die für diesen Arterientyp typische Intima sehr dünn, die Media umfasst jedoch eine Vielzahl konzentrisch angeordneter Schichten.

Auch mit der Azan-Färbung ist die hohe Varianz des biologischen Materials erkennbar, aber eine Umverteilung der Gewebebestandteile sowie ein Verlust der Gewebeintegrität nach der Kultivierung des Carotisabschnittes im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) ist nicht erkennbar. Lediglich die nur noch lockere Anordnung der epithelialen Zellen des Endothels (siehe Pfeil) ist auch mit der Azan-Färbung in dem 14 d kultivierten Präparat darstellbar.

Die Elastika-Färbung ist eine weitere gewebsspezifische Färbung, die für die Struktur arterieller Blutgefäße geeignet ist. Mit Hilfe der Farbstoffe Resorcin-Fuchsin und Kernechtrot werden elastische Fasern schwarzviolett dargestellt.

Es sind genauso wie für die H+E- und die Azan-Färbung die 3 charakteristischen Schichten des arteriellen Blutgefäßes muskulären Typs darstellbar. Die Intima (1) wird durch die kräftige *Elastica interna* (Pfeil) klar abgesetzt. Sie hat in diesen histologischen Präparaten einen gewellten Verlauf, da die Arterien in einem kontrahierten Zustand fixiert wurden.

Die Struktur der längs verlaufenden elastischen Fasern der Media (2) ist nach 14tägiger Kultivierung mit innerer und äußerer Mediumversorgung vergleichbar mit dem nativen Präparat. Die *Elastica externa*, die die Media von der Adventitia abgrenzt ist weniger klar darstellbar und insbesondere in der nativen Probe als mehrlamellige Schicht erkennbar. Diese Struktur ist für die Arterien muskulären Typs aber vollkommen typisch.

Mit Hinblick auf die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie der histologischen Beurteilung scheint dieses Protokoll, sprich die Kultivierung von Carotisabschnitten im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) und das bereits am IBMT etablierte Perfusionsmedium den Anforderungen zur Blutgefäßkultivierung und späteren DES-Testung zu genügen.

5.2.2. Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer Serum- und äußerer Mediumversorgung

Dieser Versuchsansatz, sprich die separate Versorgung des inneren und äußeren Blutgefäßbereichs mit verschiedenen Medien wurde im Rahmen dieser Arbeit verfolgt, da in der nativen Umgebung, also in einem Organismus, das Blutgefäßlumen in ständigem Kontakt mit Vollblut ist. Blut besteht aus Zellen (Erythrozyten und Leukozyten) sowie Thrombozyten und der Blutflüssigkeit (Blutplasma), in der die Zellen suspendiert sind. Entfernt man dem Blutplasma durch Gerinnung das Fibrin, spricht man von Blutserum.

Blutserum enthält einen organismusspezifischen Gehalt an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, und soll für diesen Kultivierungsansatz herangezogen werden.

Das Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) bot die Möglichkeit der getrennten Mediumversorgung, weshalb im Rahmen dieser Arbeit das Lumen des kultivierten Blutgefäßabschnittes mit käuflich erworbenem porcinem Schweineserum (PAA), der äußere Bereich mit dem bereits am IBMT etablierten Perfusionsmedium versorgt werden sollte.

Nativ

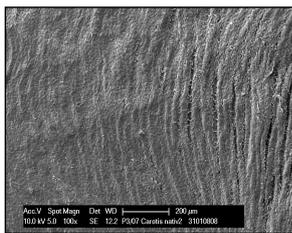


Abb. 5.22a

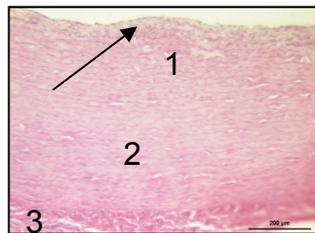


Abb. 5.22b

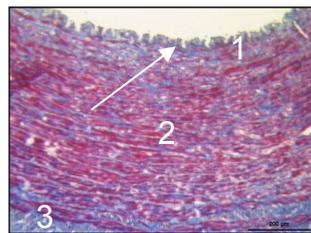


Abb. 5.22c

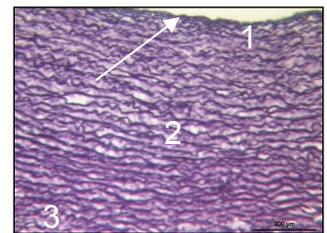


Abb. 5.22d

12 d kultiviert

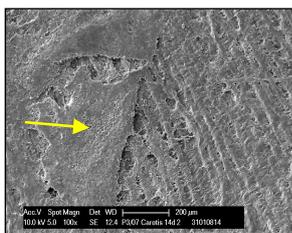


Abb. 5.22e

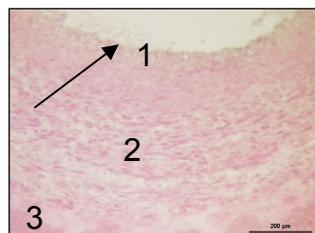


Abb. 5.22f

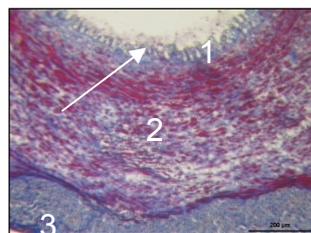


Abb. 5.22g

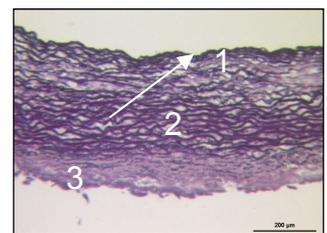


Abb. 5.22h

Abb. 5.22: Rasterelektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines kultivierten Carotisabschnittes mit innerer Serum- und äußerer Mediumversorgung

Abb. 5.22a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines nativen Carotisabschnittes

Abb. 5.22b: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, H+E-Färbung

Abb. 5.22c: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Azan-Färbung

Abb. 5.22d: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Elastika-Färbung

Abb. 5.22e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines 12 d kultivierten Carotisabschnittes

Abb. 5.22f: Querschnitt eines 12 d kultivierten Carotisabschnittes, H+E-Färbung

Abb. 5.22g: Querschnitt eines 12 d kultivierten Carotisabschnittes, Azan-Färbung

Abb. 5.22h: Querschnitt eines 12 d kultivierten Carotisabschnittes, Elastika-Färbung

1: Intima, 2: Media, 3: Adventitia, Pfeil gelb: intakter Intimabereich, Pfeil weiß+schwarz: Endothel

Es erfolgte eine vergleichende Gegenüberstellung von nativem und 12 d kultiviertem Gewebematerial mittels Rasterelektronenmikroskopie und histologischen Färbungen von Carotisquerschnitten.

Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Intima einschließlich Endothel gehen eindeutige Differenzen zwischen nativem (Abb. 5.22a) und kultiviertem Blutgefäßabschnitt (Abb. 5.22e) hervor. Wies der native Carotisabschnitt eine intakte Intima mit einem geschlossenem Zellverband des Endothels auf, so war diese nach einer 12tägigen Kultivierung im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) bis auf einen kleinen Abschnitt (gelber Pfeil) größtenteils nicht mehr nachweisbar. Es traten hingegen die Kollagenfasern der an die Intima grenzenden Media hervor.

Diese Aufnahmen geben ein erstes Bild darüber, dass die innere Blutgefäßversorgung mit Schweineserum methodisch nur begrenzt möglich ist. Im Laufe des angestrebten Kultivierungszeitraumes von 14 Tagen verstopften sowohl die serumführenden Schlauchverbindungen als auch vermutlich das Blutgefäßlumen, wodurch ein regulärer Transport des entsprechenden Mediums bei einer Pumpleistung von 70,1 µl/min nicht gewährleistet war. Um die Durchgängigkeit aufrecht zu erhalten, musste mehrmals täglich für einige Minuten das Schweineserum mit maximaler Pumpleistung transportiert werden. Die bei dieser Fließgeschwindigkeit verursachten Scherkräfte resultierten dadurch, neben den durch den Aufbau verursachten Irritationen der Intima, in einer nahezu vollständigen Zerstörung der Endothelzellstruktur der Intima des kultivierten Carotisabschnittes. Zudem konnte der angestrebte Kultivierungszeitraum von 14 d auf Grund nicht zu behebbender Verstopfungen des Schlauchsystems nicht erreicht werden, und die Auswertung dieses Versuchsansatzes musste nach 12 d erfolgen.

Die histologischen Untersuchungen an nativen und 12 d kultivierten Carotisabschnitten erfolgten auch mit der H+E-, der Azan- und der Elastika-Färbung.

Die H+E gefärbten Querschnitte zur Übersichtsdarstellung des nativen (Abb. 5.22b) und kultivierten Gewebes (Abb. 5.22f) zeigten außer der zu erwartenden biologischen Differenz des Materials keine kultivierungsbedingten Unterschiede in der mit dieser Färbung darstellbaren Gewebeintegrität. Es konnte der typische Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes mit Intima (1), Media (2) und Adventitia (3) mit diesem Kultivierungsprotokoll erhalten und nachgewiesen werden. Es ist lediglich die in der zuvor gezeigten morphologischen Begutachtung nachgewiesene Endothelzellschädigung nachweisbar. Im nativen Präparat ist eine zusammenhängende epitheliale Zellschicht erkennbar, im kultivierten Gefäßabschnitt ist diese nahezu nicht vorhanden. Die Aussage über die Endothelintegrität an Hand der histologischen Querschnitte ist jedoch auf Grund der begrenzten Auflösung und präparativer Artefakte in der Lichtmikroskopie nur eingeschränkt möglich, wurde durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen jedoch schon eindeutig beurteilt.

Mit der gewebsspezifischen Azan-Färbung, die eine Differenzierung zwischen Muskel- und Bindegewebe ermöglicht, konnte ähnlich, wie bei dem zuvor gezeigten Versuchsansatz der inneren und äußeren Mediumversorgung, keine kultivierungsbedingten Differenzen in der Gewebeintegrität sowie der -struktur nach der Kultivierung mit innerer Serum- und äußerer Mediumversorgung gezeigt. Der kultivierte Carotisabschnitt ist nach 12tägiger Kultivierung im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) vergleichbar mit dem Querschnitt des nativen Carotisabschnittes. Es konnten die typischen Schichten des arteriellen Blutgefäßes gezeigt werden, die relativ schmale Intima (1), die aus sehr vielen Schichten ringförmig angeordneter glatter Muskelzellen und dünnen Kollagenfasern bestehende Media (2) und die bindegewebsreiche, das Blutgefäß nach außen abgrenzende Adventitia (3). Es konnte auch in diesem Fall keine Umverteilung von Binde- und Muskelgewebe gezeigt werden.

Mit der Elastika-Färbung wird die hohe Varianz des verwendeten biologischen Materials sehr deutlich. Insbesondere die Wanddicke der gezeigten Carotisabschnitte ist sehr unterschiedlich, auch im Hinblick auf die H+E- und Azan-gefärbten Querschnitte des kultivierten Blutgefäßabschnitts. Die Querschnitte wurden von unterschiedlichen Abschnitten desselben Blutgefäßes angefertigt, trotzdem sind in einigen Fällen diese Unterschiede in der Struktur und der Gefäßwandstärke aufgetreten.

Ein Einfluss der Kultivierung auf die Struktur der längs verlaufenden elastischen Fasern konnte jedoch nicht gezeigt werden. Zudem ist die kräftige Elastica interna (Pfeil) sowohl im nativen als auch im kultivierten Präparat deutlich erkennbar.

Insgesamt betrachtet scheint die Kultivierung mit innerer Serum- und äußerer Mediumversorgung im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) im Hinblick auf die Nährstoffversorgung und die gezeigte Gewebeintegrität ebenso geeignet zu sein wie die Kultivierung mit innerer und äußerer Mediumversorgung in diesem Perfusionssystem. Es konnten die Blutgefäßabschnitte vital erhalten werden.

Da es aber zu methodisch bedingten Strukturauffälligkeiten der Endothelzellschicht der Intima kam, wurde der Versuch der differenzierten inneren und äußeren Blutgefäßversorgung mit porcinem Schweineserum und Perfusionsmedium im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt und der Kultivierungsansatz mit innerer und äußerer Mediumversorgung auf Grund der besseren, wenn auch nicht kompletten Erhaltung der Intima bevorzugt.

5.2.3. Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und implantiertem Metallstent

Nachdem nun die Kultivierungsbedingungen für die Vitalerhaltung porciner Carotisabschnitte genau ermittelt wurden, konnte dieses Perfusionssystem für die Stenttestung herangezogen werden. Bevor jedoch wirkstofffreisetzende Stents mit dieser Methode auf ihre Auswirkungen hinsichtlich Gewebestruktur und -integrität untersucht werden konnten, wurde als Referenz

Ergebnisse

ein unbeschichteter Metallstent in den zu kultivierenden Carotisabschnitt implantiert um Auswirkungen des Implantats auf das Gewebe unabhängig von einer Beschichtung beurteilen zu können.

Nach Kultivierung wurden Proben des 14 d kultivierten Carotisabschnittes morphologischen und histologischen Untersuchungen unterzogen.

Nativ

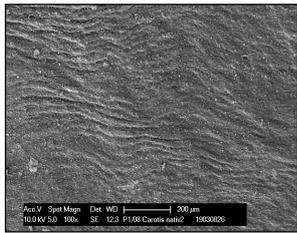


Abb. 5.23a

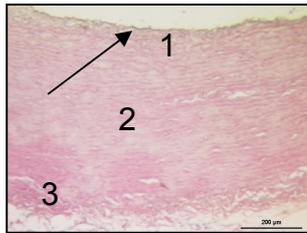


Abb. 5.23b

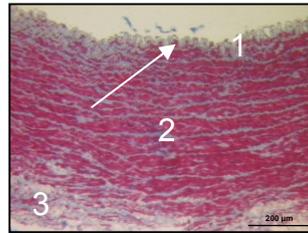


Abb. 5.23c

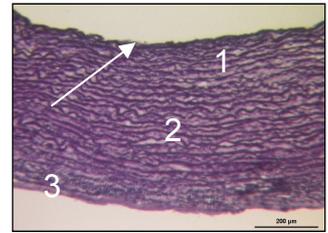


Abb. 5.23d

14 d kultiviert

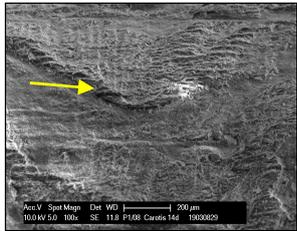


Abb. 5.23e

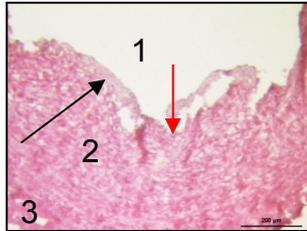


Abb. 5.23f

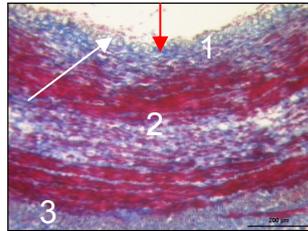


Abb. 5.23g

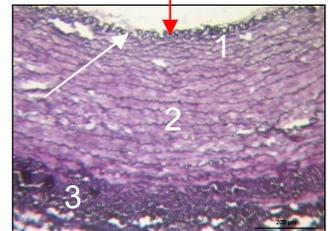


Abb. 5.23h

Abb. 5.23: Rasterelektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines kultivierten Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und Metallstent-Kontakt

Abb. 5.23a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines nativen Carotisabschnittes

Abb. 5.23b: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, H+E-Färbung

Abb. 5.23c: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Azan-Färbung

Abb. 5.23d: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Elastika-Färbung

Abb. 5.23e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes

Abb. 5.23f: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, H+E-Färbung

Abb. 5.23g: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Azan-Färbung

Abb. 5.23h: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Elastika-Färbung

1: Intima, 2: Media, 3: Adventitia, Pfeil gelb: Stentabdruck, Pfeil weiß+schwarz: Endothel, Pfeil rot: Verformung durch Stentdilataion

Der Einfluss des Metallstents auf die Endothelzellstruktur der zum Blutgefäßlumen angrenzenden Intima wurde mittels rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen betrachtet.

Die in Abb. 5.23a gezeigte Intima des nativen Carotisabschnittes besitzt eine zusammenhängende Endothelschicht. Diese Zellen weisen den typischen epithelialen Charakter auf, da sie einen lückenlosen Zellverband bilden. Nach der Kultivierung im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung und Metallstentkontakt konnte ein deutlicher Stentabdruck nachgewiesen werden (Abb. 5.23e).

Die Bereiche der Intima, die im direkten Stentkontakt waren, zeigten eine deutliche

Schädigung der Endothelzellschicht. Die angrenzenden Intimabereiche wurden jedoch weder durch die Kultivierung noch durch die Applikation des Metallstents negativ beeinflusst.

Weiterhin wurden Querschnitte von nativen und 14 d kultivierten Carotisabschnitten mit Metallstentkontakt histologisch mit der H+E-, der Azan- und der Elastikafärbung begutachtet. Die nativen Querschnitte weisen den charakteristische Aufbau des arteriellen Blutgefäßes mit den konzentrisch angeordneten Schichten Intima (1) mit zusammenhängender Endothelzellschicht (Pfeil), Media (2) und Adventitia (3) auf (Abb. 5.23b-d). Nach 14tägiger Kultivierung mit Metallstentkontakt sind diese typischen Schichten mit der H+E-Färbung nur begrenzt nachweisbar (Abb. 5.23f), bei den Azan- und Elastika-gefärbten Präparaten konnte der klassische Blutgefäßaufbau jedoch nachgewiesen werden (Abb. 5.23g und h). Es wird zudem eine deutliche Verformung des Gewebes ersichtlich, insbesondere im Bereich der Intima (1, Pfeil rot) die sich zum Teil bis in die Media fortsetzt. Der Zellverband des gesamten Gewebes scheint bis auf die plastische Verformung nach 14tägiger Kultivierung und Metallstent Kontakt noch intakt zu sein.

Was mit der Azan-Färbung im Vergleich zum nativen Präparat jedoch auffällt, ist eine Umverteilung und Anreicherung von Bindegewebe. Insbesondere im Bereich der Intima sowie im oberen und mittleren Bereich der Media ist in der kultivierten Probe mit Metallstentkontakt eine deutliche Blaufärbung zu erkennen (Abb. 5.23g). Normalerweise sind im Bereich der Media viele Schichten längs angeordneter und dicht gepackter glatter Muskelzellen vorzufinden, die von dünnen Kollagenfasern umgeben sind, was aus der Abbildung des nativen Carotisabschnittes auch hervorgeht (Abb. 5.23c). Nach dem Kontakt mit dem Metallstent wird eine deutliche Ansammlung von Kollagenfasern und Bindegewebe deutlich, was auf eine erhöhte Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) schließen lässt.

Unter nativen Bedingungen sind die Degeneration und die Neubildung der ECM, gesteuert von den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), von großer Bedeutung für die Gefäßintegrität (KUZUYA und IGUCHI, 2003). Sowohl in atherosklerotischen als auch in restenotischen Prozessen ist eine erhöhte Aktivität von MMPs mit gesteigerter ECM-Produktion beschrieben worden (NEWBY, 2005). Durch den mechanischen Reiz mit der Dilatation des Metallstents in dem Carotisabschnitt mit anschließender 14tägiger Kultivierung konnte selbst in diesem Laborversuch dieser Aspekt gezeigt werden.

Mit der Elastika-Färbung wird wiederholt die hohe Varianz des biologischen Materials deutlich, was insbesondere den Unterschied der Gefäßwanddicke betrifft. Es ist jedoch eine vergleichbare Struktur der elastischen Fasern im nativen (Abb. 5.23d) als auch 14 d kultivierten Präparat mit Metallstentkontakt (Abb. 5.23h) sowie eine deutliche Abgrenzung der kräftigen *Elastica interna* (Pfeil) erkennbar. In der kultivierten Probe erscheint diese jedoch etwas stärker gewellt als in der nativen Aufnahme.

Insgesamt betrachtet nimmt der Metallstent durch dessen Implantation in einen porcinen Carotisabschnitt Einfluss auf die Gesamtstruktur des Gewebes durch eine plastische Verformung der Intima und Teilen der Media sowie durch eine Zerstörung der Endothelschicht in den Bereichen, die in direktem Stentkontakt standen. Zudem konnte neben der mechanischen Beeinflussung ein Einfluss auf die gewebspezifische Struktur des Blutgefäßes beobachtet werden. Es wurden ein Rückgang von Muskelgewebe und eine verstärkte Produktion von kollagenen Fasern und Bindegewebe in Bereichen der Intima und Media nachgewiesen.

5.2.4. Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und implantiertem 17 β -Estradiol-Eluting Stent

Der Wirkstoff 17 β -Estradiol wurde im Rahmen der Arteriosklerose- und Restenoseforschungen verschiedensten Untersuchungen auf Zellkulturebene bis hin zum Tierversuch und als Stentbeschichtung in klinischen Studien näher betrachtet. Für dieses Östrogen konnte eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie und die Reendothelialisierung im Tiermodell Schwein (CHANDRASEKAR et al., 2005; CHANDRASEKAR et al., 2001; NEW et al., 2002, KYRIAKIDES et al., 2006, GERALDES et al., 2008) sowie im Kaninchen (HAN et al., 2007) nachgewiesen werden. Zudem wurden 17 β -Estradiol-Eluting Stents im Vergleich zu Metallstents in einer klinischen Studie vielversprechend am Menschen getestet (EASTER-Trial; ABIZAID et al., 2004). Da somit viele Resultate für diesen Wirkstoff bekannt sind, soll dieser im Rahmen dieser Arbeit als Referenz herangezogen werden.

Es wurden am IBMT 17 β -Estradiol-Eluting Stents hergestellt, diese in porcine Carotisabschnitte implantiert und 14 Tage im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung kultiviert.

Die entsprechenden Blutgefäßanschnitte wurden daraufhin mit morphologischen und histologischen Untersuchungen sowie Immunfluoreszenz beurteilt. In Abbildung 5.24a und e sind die mit Rasterelektronenmikroskopie dargestellten Intimastrukturen eines nativen (a) sowie eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes (e) nach 17 β -Estradiol-Eluting Stent Kontakt vergleichend dargestellt. Das Endothel des nativen Präparats (Abb. 5.24a) weist einen lückenlosen Zellverband auf. In Abb. 5.24e sind sowohl kultivierungsbedingte als auch durch das Implantat verursachte Schädigungen an der Intima erkennbar. Im Hinblick auf den Versuchsansatz mit Metallstent- Implantation scheint der Einfluss dieses DES stärker zu sein. Es ist nicht nur ein Abdruck erkennbar, sondern auch Schädigungen an der Zellstruktur. Das Gewebe reagiert also nicht nur auf den mechanischen Reiz durch die Stentdilataion, sondern auch auf den in das Gewebe freigesetzten Wirkstoff.

Nativ

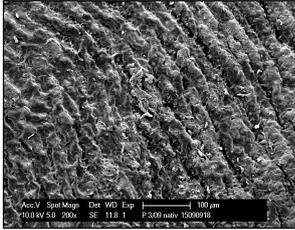


Abb. 5.24a

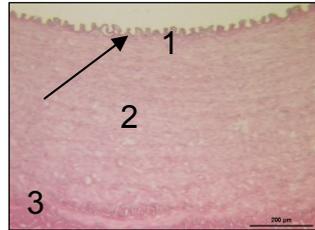


Abb. 5.24b

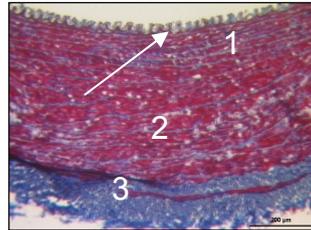


Abb. 5.24c

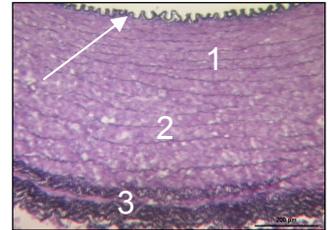


Abb. 5.24d

14 d kultiviert

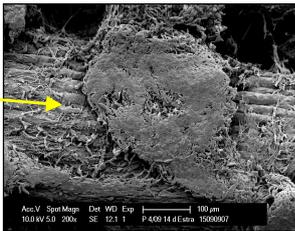


Abb. 5.24e

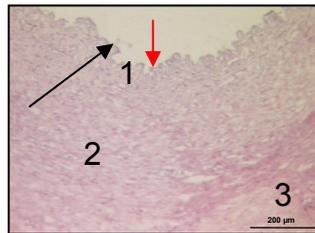


Abb. 5.24f

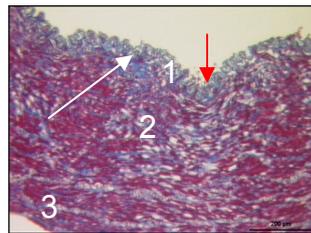


Abb. 5.24g

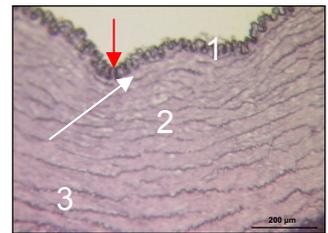


Abb. 5.24h

- Abb. 5.24: Rasterelektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines kultivierten Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und 17 β -Estradiol-Stent-Kontakt
- Abb. 5.24a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines nativen Carotisabschnittes
- Abb. 5.24b: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.24c: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.24d: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- Abb. 5.24e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes
- Abb. 5.24f: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.24g: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.24h: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- 1: Intima, 2: Media, 3: Adventitia, Pfeil gelb: Stentabdruck, Pfeil weiß+schwarz: Endothel, Pfeil rot: Verformung durch Stentdilataion

Die Charakterisierung der Gewebeintegrität eines Blutgefäßabschnitts nach 17 β -Estradiol-Eluting Stent-Kontakt erfolgte histologisch mit der H+E-, der Azan- und der Elastika-Färbung. Die Resultate sind im Vergleich zu entsprechend gefärbten nativen Präparaten dargestellt, bei welchen die typischen Schichten des arteriellen Blutgefäßes (Intima (1), Media (2) und Adventitia (3)) gezeigt werden konnten. Bei den nativen Präparaten ist zudem das Endothel (Pfeil weiß bzw. schwarz) gut erkennbar (Abb. 5.24b-d).

Nach 14tägiger Kultivierung und Stentimplantation weist dieses jedoch Schäden auf. Intima, Media und Adventitia lassen sich zudem nicht mehr deutlich voneinander abgrenzen (Abb. 5.24f-h). Insbesondere bei den Azan- (Abb. 5.24g) und Elastika-gefärbten Proben (Abb. 5.24h) ist die typische Verformung des Gewebes nach Stentimplantation bis in tiefere Bereiche der Media (2) erkennbar, die Elastica Interna war nach Kultivierung und DES Kontakt stärker gewellt (Abb. 5.24h; Pfeil rot) als im nativen Präparat (Abb. 5.24d). Zudem

wirkt die Intima deutlich verdickt und das Endothel wurde durch Stent Implantation und Dilatation geschädigt (Pfeil weiß).

Bei den Azan-gefärbten Querschnitten wird im Bereich der Intima und der Media eine stärkere Blaufärbung deutlich als in der nativen Probe. Bei dieser ist der hohe Anteil der rot gefärbten glatten Gefäßmuskelzellen im Bereich der Media gut erkennbar. Die Reaktion der Zellen des Gewebeverbands nach Implantation und Dilatation eines 17 β -Estradiol-Eluting Stents ist vergleichbar zur Reaktion nach Metallstent Kontakt. Der Anteil kontraktiler glatter Muskelzellen ist im Vergleich zum nativen Carotisabschnitt verringert, Bindegewebestrukturen sind verstärkt nachweisbar.

Bei Betrachtung der morphologischen und histologischen Untersuchungen nach der Kultivierung eines Carotisabschnittes mit Implantation eines Metall- oder eines 17 β -Estradiol-Eluting Stents scheinen die Auswirkungen des in das Gewebe freigesetzten Östrogens nur minimal sein. Gewebeintegrität und Verteilung erscheinen nach Kontakt mit beiden Implantaten vergleichbar zu sein. Nur die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen einen zytotoxischen Effekt von 17 β -Estradiol auf die Intimazellen vermuten.

Mit Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob und wie sich das aus der Stentoberfläche eluierte Östrogen 17 β -Estradiol im kultivierten Carotisabschnitt anreichert. In von dieser Arbeit unabhängigen Analysen wurde das Freisetzungverhalten des eingesetzten 17 β -Estradiol-Eluting Stents, in dem eine Gesamtwirkstoffmenge von 210 μ g inkorporiert wurde, bereits ermittelt. Es ist also bekannt, dass über einen definierten Zeitraum der Wirkstoff in das Elutionsmedium freigesetzt wird.

Zudem wurde nach 14tägiger Kultivierung im Perfusionssystem der DES aus dem Gewebe explantiert und mittels HPLC die restliche 17 β -Estradiol Beladung bestimmt. Es wurden in diesem Zeitraum 167 μ g Wirkstoff freigesetzt, es wurde eine Restbeladung von 43 μ g 17 β -Estradiol bestimmt. Fast die gesamte Wirkstoffmenge wurde in diesem Zeitraum aus dem Implantat eluiert, es ist aber nicht bekannt, ob sich der freigesetzte Wirkstoff nun im Gewebe anreichert oder mit dem Medium abtransportiert wurde.

In Abb. 5.25 sind die Resultate der Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellt. Es erfolgte dazu der Vergleich zwischen nativen und 14 d kultivierten Präparaten mit 17 β -Estradiol-Eluting Stent Kontakt und den dazugehörigen Färbekontrollen.

Im nativen Carotisabschnitt konnte kein positiver 17 β -Estradiol Nachweis erfolgen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da dieses Gewebe keinen Kontakt zum DES hatte. Nach 14tägiger Kultivierung im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung und 17 β -Estradiol-Eluting Stent Implantation wurde im entsprechenden Carotisabschnitt 17 β -Estradiol nachgewiesen. Das Östrogen wird im gesamten Querschnitt des Blutgefäßabschnittes angereichert.

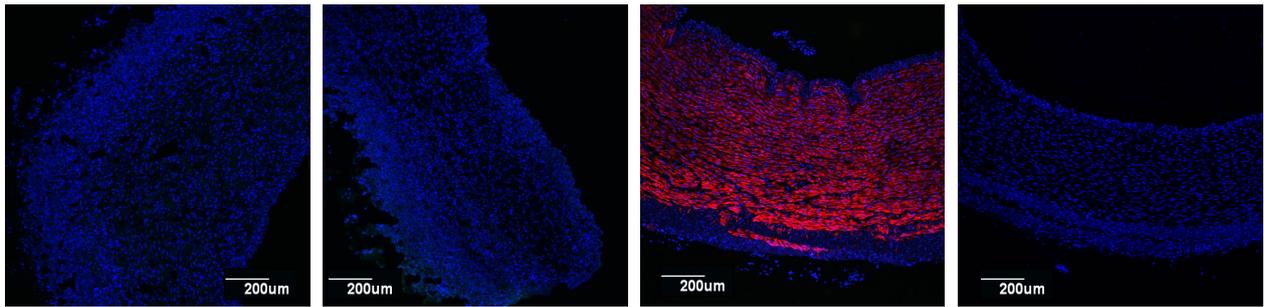


Abb. 5.25a

Abb. 5.25b

Abb. 5.25c

Abb. 5.25d

- Abb. 25: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis des Wirkstoffes 17β-Estradiol in Querschnitten porciner Carotis-Abschnitte:
- Abb. 25a: nativer Carotisabschnitt + anti-17β-Estradiol-AK + Hoechst-Färbung
- Abb. 25b: nativer Carotisabschnitt + Antikörperverdünnungslösung + Hoechst-Färbung
- Abb. 25c: Carotis-Abschnitt nach 14 d Kultur mit innerer und äußerer Mediumversorgung mit DES-Stent-Kontakt (PLLA/17β-Estradiol 70/30 % w/w) + anti-17β-Estradiol-AK + Hoechst-Färbung
- Abb. 25d: Carotis-Abschnitt nach 14 d Kultur mit innerer und äußerer Mediumversorgung mit DES-Stent-Kontakt (PLLA/17β-Estradiol 70/30 % w/w) + Antikörperverdünnungslösung + sek. AK + Hoechst-Färbung
-

5.2.5. Kultivierung eines Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und implantiertem Genistein-Eluting Stent

In der Literatur wurde für Genistein die Proliferations- und Migrationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen (YU et al., 2008; XU et al., 2004; PAN et al., 2001) bei gleichzeitiger Induktion von vaskulären Endothelzellen beschrieben (Xiang et al., 2010).

Diese für die Stenttechnologie sehr interessante Wirkweise macht dieses Phytoöstrogen in der Weiterentwicklung von Drug-Eluting Stents sehr attraktiv. Am Institut für Biomedizinische Technik wurde ein entsprechender Stentprototyp hergestellt, der in porcine Blutgefäßabschnitte implantiert und dessen Auswirkungen auf das Gewebe nach 14tägiger Kultur im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung beurteilt wurden.

Der Einfluss des Genistein-Eluting Stents auf die Intima des Carotisabschnittes wurde mittels rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen begutachtet (Abb. 5.26e). Die Ergebnisse sind im Vergleich zu einem nativen Carotisabschnitt (Abb. 5.26a) dargestellt.

Die Intima des nativen Präparats weist einen lückenlosen Zellverband des Endothels auf. Im Vergleich dazu ist im kultivierten Carotisabschnitt nach Genistein-Eluting Stent Implantation ein deutlicher Abdruck mit einhergehender Schädigung des Endothels erkennbar. Diese Schäden können zum einen in dem mechanischen Reiz nach Stentdilataion oder der Freisetzung des in die Stentoberfläche inkorporierten Genisteins begründet liegen.

Nativ

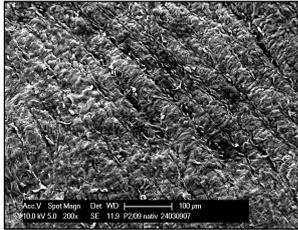


Abb. 5.26a

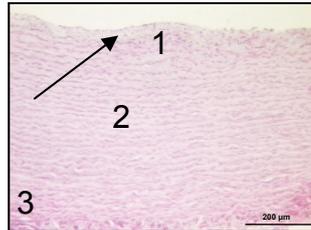


Abb. 5.26b

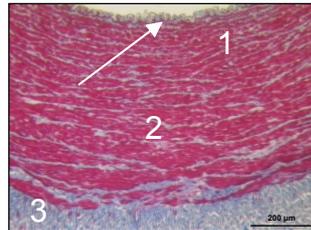


Abb. 5.26c

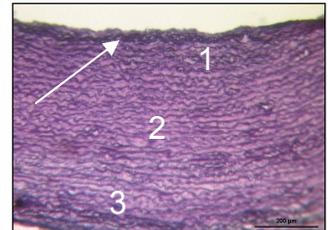


Abb. 5.26d

14 d kultiviert

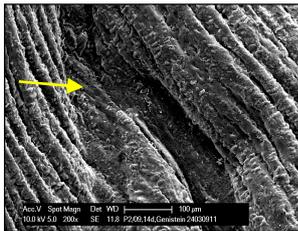


Abb. 5.26e

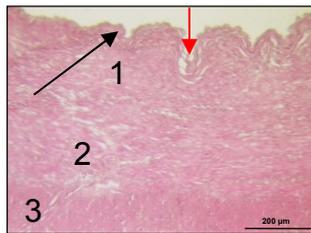


Abb. 5.26f

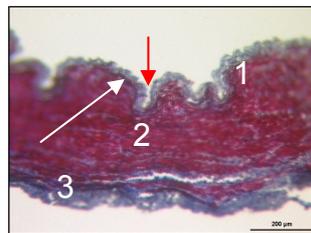


Abb. 5.26g

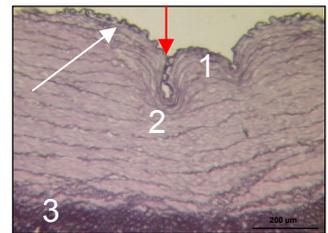


Abb. 5.26h

- Abb. 5.26: Rasterelektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines kultivierten Carotisabschnittes mit innerer und äußerer Mediumversorgung und Genistein-Stent-Kontakt
- Abb. 5.26a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines nativen Carotisabschnittes
- Abb. 5.26b: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.26c: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.26d: Querschnitt eines nativen Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- Abb. 5.26e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Intima eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes
- Abb. 5.26f: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, H+E-Färbung
- Abb. 5.26g: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Azan-Färbung
- Abb. 5.26h: Querschnitt eines 14 d kultivierten Carotisabschnittes, Elastika-Färbung
- 1: Intima, 2: Media, 3: Adventitia, Pfeil gelb: Stentabdruck, Pfeil weiß+schwarz: Endothel, Pfeil rot: Verformung durch Stentdilataion

Mit der H+E-, der Azan- und der Elastikafärbung sollte der Einfluss eines implantiertem und dilatiertem Genistein-Eluting Stents auf die Gewebeintegrität eines Carotisabschnittes untersucht werden.

Das Gewebe der Gefäßwand wies noch nach Kultivierung einen einheitlichen Zellverband und somit eine vergleichbare Integrität zum nativen Carotisabschnitt auf. Der typische arterielle Blutgefäßaufbau mit den drei konzentrisch angeordneten Schichten Intima (1), Media (2) und Adventitia (3) ist sowohl im nativen (Abb. 5.26b-d) als auch im kultivierten Blutgefäßabschnitt (Abb. 5.26f-h) mit allen Färbemethoden darstellbar. Insbesondere mit der Azanfärbung (Abb. 5.26 c und g) konnte gezeigt werden, dass sowohl im nativen (c) als auch im kultivierten Blutgefäßabschnitt nach Genistein-Eluting Stent-Kontakt die Media weiterhin von den rot gefärbten, konzentrisch angeordneten glatten Muskelzellen dominiert wurde. Es erfolgte keine Umstrukturierung des Gewebes sowie keine Anreicherung von Kollagen und

Bindegewebe in Intima und Media wie nach Metall- (Abb. 5.23g) oder 17 β -Estradiol-Eluting Stent Implantation (Abb. 5.24g) gezeigt werden konnte.

Mit der Elastika-Färbung konnte zudem gezeigt werden, dass die Elastika Interna sowohl im nativen als auch im kultivierten Blutgefäßabschnitt erkennbar ist, die Anzahl der elastischen Fasern scheint nach Kultivierung und Genistein-Eluting-Stent-Kontakt (Abb. 5.26h) etwas geringer zu sein als im nativen Objekt (Abb. 5.26d).

Mit allen Färbemethoden fällt auf, dass im Vergleich zum nativen Objekt, das Endothel durch die Kultivierung und Stentimplantation geschädigt wurde (Abb. 5.26f-h; Pfeil weiß und schwarz). Zudem scheint durch den Genistein-Eluting Stent-Kontakt die Intima verdickt zu sein und es ist eine plastische Verformung des Gewebes durch die Dilatation des Implantats bis in Bereiche der Media zu erkennen.

Zusammenfassend scheint nach Begutachtung der morphologischen und histologischen Untersuchungen von kultiviertem Gewebe nach Implantation eines Metall-, eines 17 β -Estradiol-Eluting oder eines Genistein-Eluting Stents die Variante der Genistein-Inkorporation vielversprechend zu sein.

Für den Genistein-Eluting Stent sollte weiterhin ermittelt werden, ob und wie sich das aus der Stentoberfläche eluierte Phytoöstrogen im kultivierten Carotisabschnitt anreichert. Das Freisetzungverhalten des eingesetzten Genistein-Eluting Stents, mit einer Gesamtwirkstoffmenge von 210 μ g, wurde in von dieser Arbeit unabhängigen Analysen am Institut für Biomedizinische Technik ermittelt. Es wurde nachgewiesen, dass über einen definierten Zeitraum der Wirkstoff in das Elutionsmedium freigesetzt wird.

Der DES wurde zusätzlich nach 14tägiger Kultivierung im Perfusionssystem aus dem Gewebe explantiert und mittels HPLC die restliche Genistein Beladung bestimmt. Es wurde eine Restbeladung von 106 μ g Genistein ermittelt. 104 μ g Wirkstoff wurden in diesem Zeitraum also freigesetzt, etwas weniger als beim 17 β -Estradiol-Eluting Stent. Es ist nun von Interesse, ob sich der in diesem Zeitraum aus dem Implantat eluierte Wirkstoff im Gewebe angereichert hat oder mit dem Medium abtransportiert wurde.

In Abb. 5.27 sind die Resultate der Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellt. Es erfolgte dazu der Vergleich zwischen nativen und 14 d kultivierten Präparaten mit Genistein-Eluting Stent Kontakt und den dazugehörigen Färbekontrollen.

Im Vergleich zum nativen Gewebe erfolgt eine Genistein Anreicherung in der Blutgefäßwand nach DES-Implantation in einem Zeitraum von 14 Tagen. Die Anreicherung scheint im Bereich der Intima am stärksten zu sein.

Die Effekte, die für den Genistein-Eluting Stent in diesem Kapitel beschrieben wurden, könnten also vom inkorporierten Phytoöstrogen resultieren.

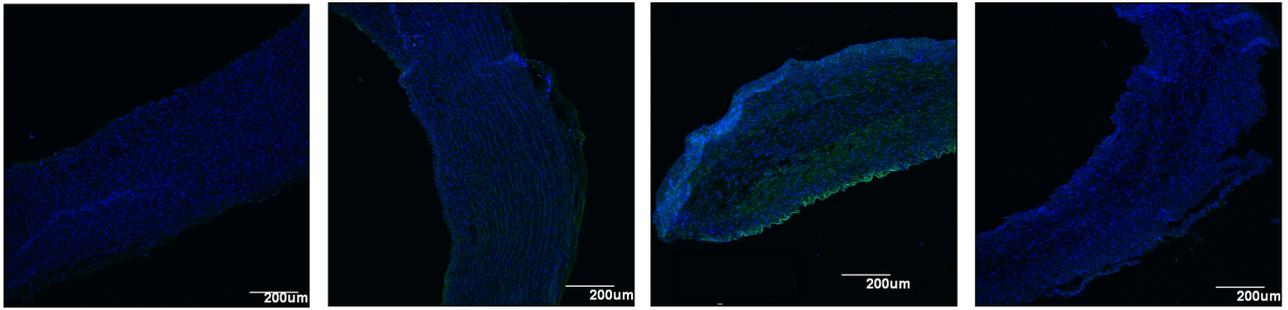


Abb. 5.27a

Abb. 5.27b

Abb.5.27c

Abb. 5.27d

- Abb. 27: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis des Wirkstoffes Genistein in Querschnitten porciner Carotis-Abschnitte:
- Abb. 27a: nativer Carotisabschnitt + anti-Genistein-AK + Hoechst-Färbung
- Abb. 27b: nativer Carotisabschnitt + Antikörperverdünnungslösung + Hoechst-Färbung
- Abb. 27c: Carotis-Abschnitt nach 14 d Kultur mit innerer und äußerer Mediumversorgung mit DES-Stent-Kontakt (PLLA/Genistein 70/30 % w/w) + anti-Genistein-AK + Hoechst-Färbung
- Abb. 27d: Carotis-Abschnitt nach 14 d Kultur mit innerer und äußerer Mediumversorgung mit DES-Stent-Kontakt (PLLA/Genistein 70/30 % w/w) + Antikörperverdünnungslösung + sek. AK + Hoechst-Färbung
-

6. Diskussion

Weltweit haben Stentdesigner sich das Ziel gesetzt, neuartige Drug-Eluting Stents zu entwickeln, um Restenoseraten weiter zu senken und die Langzeitprognose nach perkutanen transluminalen Interventionen zu verbessern. Es sollten ein oder mehrere Wirkstoffe in entsprechende Implantate inkorporierbar sein, welche die Regeneration eines funktionalen Endothels begünstigen und die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen inhibieren. Inkorporierte Wirkstoffe sollten über eine kontrollierbare Freisetzungskinetik aus dem Implantat verfügen, um die optimale therapeutische Dosis mit der temporalen Heilungsreaktion synchronisieren zu können. Es sind bis jetzt keine Daten über ein Therapeutikum publiziert, welches unter den geforderten Bedingungen simultan die Endothelialisierung begünstigt und die SMC-Proliferation signifikant inhibiert.

Für das Östrogen 17β -Estradiol wurde durch verschiedene Autoren beschrieben, dass auf Zellkulturebene die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei gleichzeitiger Stimulation von Endothelzellen gehemmt wird (DUBEY et al., 2000; DAI-DO et al., 1996; GERALDES et al., 2003). Die Untersuchungsdaten dieser Arbeit sollen diese Literaturdaten bestätigen und als Referenz herangezogen werden.

Im Mittelpunkt in dieser Arbeit steht das Phytoöstrogen Genistein, welches strukturell 17β -Estradiol ähnelt und für das ein vergleichbarer Einfluss auf vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen beschrieben wurde. Die Untersuchungsdaten sollten vergleichend zusammengestellt und Vor- und Nachteile beider Wirkstoffe für eine Inkorporation in DES gezeigt werden.

Die Herstellung eines Stent-Prototyps mit Medikamenten-Inkorporation setzt zudem voraus, dass der Wirkmechanismus entsprechender Pharmaka verstanden und Konzentrationsbereiche eingegrenzt werden. Daher wurden die Wirkstoffe 17β -Estradiol und Genistein in verschiedenen Konzentrationen auf Zellkulturebene hinsichtlich ihres Einflusses auf Vitalität, Proliferation, Migration und die Expression ausgewählter Proteine untersucht. Es sollten dabei relevante Konzentrationsbereiche eingegrenzt und Wirkstoffeigenschaften bestimmt werden, um Rückschlüsse auf spätere Stentbeschichtungen ziehen zu können.

Vitalitäts- und Proliferationstests erfolgten an Permanentzelllinien sowie porcinen und humanen Primärzellen, Untersuchungen zum Migrationsverhalten und der Auswirkung auf die Biochemie ausgewählter Proteine erfolgten an porcinen Primärzellen.

Zudem wurden Stentprototypen mit 17β -Estradiol- und Genistein-Inkorporation hergestellt und der Einfluss auf kultivierte porcine Carotisabschnitte untersucht.

6.1. 17 β -Estradiol und Genistein als potentielle Wirkstoffe in der interventionellen Kardiologie

6.1.1. Der Einfluss von 17 β -Estradiol auf ausgewählte zelluläre Funktionen

DUBEY et al., 2000, DAI-DO et al., 1996 und GERALDES et al., 2003 zeigten, dass das Östrogen 17 β -Estradiol die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} – 10^{-10} M hemmt, GERALDES et al., 2002 und CONCINA et al., 2000 konnten zudem nachweisen, dass Migration und Proliferation von Endothelzellen bei einer Konzentration von 10^{-10} – 10^{-11} M begünstigt werden.

Für das Östrogen 17 β -Estradiol wurde bei den getesteten Endothelzellkulturen BFA (bovine Zelllinie) und ppEC (porcine Primärzellen) eine Vitalitätshemmung bei einer Konzentration von 10^{-4} M (Abb. I Anhang) und bei HCAEC (kommerzielle humane Primärzellen) in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-5} M mit dem MTS-Test (Promega; Abb. 5.9) ermittelt. Es ist davon auszugehen, dass 17 β -Estradiol in diesem Konzentrationsbereich zytotoxisch wirkte und die Vitalität der Zellen reduziert wurde. In dem vitalitätsreduzierenden Konzentrationsbereich von 17 β -Estradiol konnte zudem auch die Proliferationshemmung der Endothelzellen mit dem BrdU-Test (Roche; Abb. II Anhang; Abb. 5.6, 5.10) gezeigt werden. Zusätzlich erwies sich 17 β -Estradiol bei der Zelllinie BFA bei 10^{-10} M als proliferationshemmend (Abb. II Anhang), die porcine Endothelzellkultur ppEC reagierte weiterhin bei einer Konzentration von 10^{-5} M mit einer Reduktion der Proliferation (Abb. 5.6), bei den humanen Primärzellen HCAEC erweiterte sich der Konzentrationsbereich auf 10^{-5} und 10^{-7} M (Abb.5.10).

→ 17 β -Estradiol bewirkte keine Induktion der Proliferation der Endothelzellen BFA, ppEC und HCAEC. Es konnte somit an keinem der getesteten Zellkultursysteme die von CONCINA und et al. sowie GERALDES et al. gezeigte Proliferationsinduktion von Endothelzellen ermittelt und diese Daten verifiziert werden.

Die Vitalität von glatten Gefäßmuskelzellen nach 17 β -Estradiol-Applikation wurde bei der Zelllinie A7r5 (Ratte) und der primären porcinen Zellkultur ppSMC nur bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M reduziert (Abb. III Anhang). Das Östrogen wirkte auf diese glatte Muskelzellkulturen also vergleichbar zytotoxisch wie auf die untersuchten Endothelzellen. Die humane glatte Muskelzellkultur HCASMC reagierte etwas empfindlicher, die Vitalität wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-6} M sowie bei einer Konzentration von 10^{-12} M gehemmt (Abb. 5.11), wobei alle Konzentrationen geringer als 10^{-4} M zwar eine signifikante Hemmung bewirkten, die mit durchschnittlich 10 % Vitalitätsreduktion aber eher gering ausfiel. Hinsichtlich der Proliferation von vaskulären

glatten Muskelzellen nach 17β -Estradioleinfluss waren die Resultate der A7r5-Testung zunächst vielversprechend. In Konzentrationsbereichen von 10^{-4} - 10^{-6} und 10^{-10} - 10^{-11} M bewirkte das Östrogen eine signifikante Reduktion der Proliferation. Diese Hemmung war bei Wirkstoffkonzentration von weniger als 10^{-5} M mit durchschnittlich 15 % aber nicht sehr stark (Abb. IV Anhang). Da es sich bei A7r5 um eine Zelllinie handelt, war für die folgenden Testungen an den porcinen und humanen Primärzellen ein stärkerer Einfluss von 17β -Estradiol erwartet worden. Diese Vermutung wurde aber nicht bestätigt. Auf die primäre Zellkultur ppSMC wirkte das Östrogen nur bei Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-5} M deutlich proliferationsreduzierend (Abb. 5.8) und auf die humane Primärzellen HCASMC nur bei einer Konzentration von 10^{-4} M (Abb. 5.12). Bei einer 17β -Estradiolkonzentration von 10^{-12} M konnte hierbei sogar eine Proliferationsinduktion von glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden. Verschiedene Autoren haben eine Proliferationshemmung von glatten Gefäßmuskelzellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-10} M beschrieben. Diese Resultate konnten anhand der untersuchten Zellkulturen nicht verifiziert werden.

→ 17β -Estradiol inhibierte die Proliferation von den vaskulären glatten Muskelzellen A7r5, ppSMC und HCASMC lediglich in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-5} M deutlich. Im Hinblick auf die Vitalitätstests liegt dieser Effekt in der Zytotoxizität des Östrogens in diesem Konzentrationsbereich begründet. Die von DUBEY et al., DAI-DO et al. und GERALDES et al. gezeigte Proliferationshemmung von 17β -Estradiol in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} - 10^{-10} M konnte nicht annähernd bestätigt werden.

Für 17β -Estradiol konnte bei den porcinen Primärzellen ppSMC eine migrationshemmende Wirkung in Konzentrationsbereichen von 10^{-4} - 10^{-8} M und 10^{-11} - 10^{-12} M nachgewiesen werden (Abb. 5.15). Die Resultate der Migrationsuntersuchungen an den Primärzellen HCASMC untermauerten die Ergebnisse der Zellkultur ppSMC aber nicht. Es konnte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich für das Östrogen an der Zellkultur HCASMC keine Migrationshemmung nachgewiesen werden. Lediglich bei einer Konzentration von 10^{-6} M 17β -Estradiol wurde hingegen eine signifikante Migrationsstimulation gezeigt (Abb. 5.16).

→ 17β -Estradiol inhibierte die Migration von den porcinen Primärzellen ppSMC, was die Daten von Dai-Do et al. von 1996 bestätigt. Es scheint sich jedoch um ein zell- und organismusspezifisches Phänomen zu handeln, denn bei den primären humanen Muskelzellen HCASMC konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.

Die in-vitro Untersuchungen hinsichtlich Proliferation, Vitalität und Migration konnten für 17β -Estradiol die in der Literatur beschriebenen Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen und vaskuläre Endothelzellen nicht zeigen. Die Daten suggerieren, dass die durch die

verschiedenen Autoren beschriebenen, hier mehrfach erläuterten Effekte nicht auf alle Zellkultursysteme übertragbar sind. Nach erster Einschätzung ist dieser Wirkstoff als Inkorporation in DES hinsichtlich der Wirkung auf das Proliferationsverhalten von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen ungeeignet.

6.1.2. Der Einfluss von Genistein auf ausgewählte zelluläre Funktionen

Für das Phytoöstrogen Genistein wurden von vielen Autoren kardioprotektive Effekte (CLARKSON, 2002) wie proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften auf glatte Gefäßmuskelzellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-6} M (XIANG et al., 2010; YU et al., 2008; PAN et al., 2001) und eine Induktion der Endothelzellproliferation bei einer Konzentration von 10^{-4} M (XIANG et al., 2010) beschrieben.

Das Phytoöstrogen Genistein bewirkte bei der Zelllinie BFA eine Reduktion der Vitalität in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-6} M. Außerdem erwies sich das Phytoöstrogen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-11} M als vitalitätshemmend (Abb. I Anhang). Die endothelialen Primärzellen ppEC und HCAEC reagierten deutlich weniger empfindlich, Genistein wirkte sich nur bei einer Konzentration von 10^{-4} M reduzierend auf die Vitalität der Zellen aus. In Konzentrationsbereichen von 10^{-9} - 10^{-10} M für ppEC bzw. 10^{-7} - 10^{-9} M für HCAEC wurde mit dem MTS-Test eine erhöhte Vitalität ermittelt (Abb. 5.5 und 5.9). Mit diesem Test wird die Gesamtheit aller lebenden und proliferierenden Zellen berücksichtigt, diese Resultate liefern also ein erstes Indiz zur Stimulation von Endothelzellen durch das Phytoöstrogen Genistein und bestätigen die durch XIANG et al. beschriebenen Daten.

Die Proliferation der Zelllinie BFA wurde durch Genistein in Konzentrationsbereichen von 10^{-4} - 10^{-5} M und 10^{-10} - 10^{-11} M im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. II Anhang). Die Primärzellen ppEC und HCAEC zeigten als Reaktion auf eine Genisteinkonzentration von 10^{-4} M eine deutliche Proliferationshemmung, aber in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} - 10^{-9} M für ppEC bzw. einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-6} M für HCAEC erwies sich das Isoflavon als proliferationsstimulierend (Abb. 5.6 und 5.10).

→ Genistein wirkte bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} M zytotoxisch, die Proliferation der vaskulären Endothelzellen BFA, ppEC und HCAEC wird deutlich gehemmt. Die durch XIANG et al. beschriebene Proliferationsinduktion bei dieser Wirkstoffkonzentration konnte so nicht bestätigt werden. Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-8} - 10^{-9} M bewirkten bei den Endothelzellen HCAEC bzw. ppEC eine signifikante Stimulation der Proliferation.

Die in dieser Arbeit untersuchten glatten Muskelzellen reagierten weitaus weniger empfindlich auf die Genistein-Behandlung als die Endothelzellen. Sowohl die Zelllinie A7r5 (Abb. III Anhang) als auch die primäre Zellkultur ppSMC (Abb. 5.7) zeigten im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine Auswirkungen auf die Vitalität. Lediglich die

Vitalität der humanen Primärzellen HCASMC wurde bei einer Konzentration von 10^{-4} M reduziert. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-6} und im Bereich von 10^{-8} - 10^{-9} M wurde eine erhöhte Vitalität im Vergleich zur Bezugskontrolle ermittelt (Abb. 5.11).

Die Proliferation glatter Muskelzellen wurde im Vergleich zur Vitalität jedoch stärker durch Genistein beeinflusst. Die Zelllinie A7r5 reagierte nach Genistein-Applikation im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich signifikant mit einer Reduktion der Proliferation. Genesteinkonzentrationen von 10^{-5} M und niedriger bewirkten jedoch nur eine Hemmung von 20-30 % (Abb. IV Anhang).

Für die Primärzellen ppSMC und HCASMC wurde eine Proliferationshemmung in einem Bereich von 10^{-4} - 10^{-5} ermittelt (Abb. 5.8 und 5.12). Niedrigere Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Zellteilungsrate, was die Resultate der A7r5-Testung nicht bestätigte.

➔ **Genistein hemmte die Proliferation der glatten Muskelzellkultur A7r5 in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-12} M, was die in der Literatur durch XIANG et al., YU et al., und PAN et al. beschriebene Proliferationsinhibierung von 10^{-4} - 10^{-6} M von glatten Gefäßmuskelzellen bestätigt. Für die vaskulären Muskelzellen ppSMC und HCASMC konnte ebenso eine Hemmung der Proliferation gezeigt werden, jedoch nur bei Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M. Geringere Wirkstoffkonzentrationen nahmen keinen Einfluss auf die Proliferation von ppSMC und HCASMC.**

Untersuchungen zur Migration zeigten, dass das Phytoöstrogen bei den porcinen Primärzellen ppSMC in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} - 10^{-9} M eine signifikante Hemmung bewirkte (Abb. 5.15). Untersuchungen an der humanen Zellkultur HCASMC konnten migrationshemmende Eigenschaften vermuten lassen, die Ergebnisse konnten auf Grund hoher Standardabweichungen jedoch statistisch nicht untermauert werden (Abb. 5.16).

➔ **Genistein hemmte die Migration der porcinen Muskelzellen ppSMC, was die Arbeit von Dubey et al. von 1999 bestätigt, jedoch nicht die der humanen Muskelzellen HCASMC. Genauso wie 17β -Estradiol scheint auch Genistein nur die Migration porciner Muskelzellen zu inhibieren, nicht jedoch die der humanen. Genistein wirkt also auch zell- und organismusspezifisch auf die Migration von Zellen.**

Im Vergleich zu 17β -Estradiol wurde für das Phytoöstrogen Genistein genauso eine Proliferations- und z. T. eine Migrationshemmung von glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt, zusätzlich wirkte das Isoflavon jedoch stimulierend auf die Endothelzellvitalität und -proliferation. Bezugnehmend auf Anforderungen an ein zu inkorporierendes Medikament in der Stenttechnologie, müssen weiterführende Untersuchungen jedoch klären, ob die durch

Genistein hervorgerufenen Effekte auf vaskuläre glatte Muskelzellen ausreichend sind und sich auf ein Implantat übertragen lassen.

Die endothelstimulierenden Eigenschaften von Genistein könnten im Rahmen dieser Betrachtungen jedoch von Nutzen sein, in dem das Phytoöstrogen mit einem bekannten Medikament, beispielsweise Sirolimus, kombiniert wird. Seit Anfang dieses Jahrtausends ist Sirolimus als Inkorporation in einen Drug-Eluting Stent im Einsatz (Sirolimus-Eluting Stent: SES; Cypher®; Cordis Corporation, Miami Lakes, FL, USA), Late Stent Thrombosen stellen dabei eine zentrale Komplikation bei der Anwendung dar. Für Sirolimus ist beschrieben worden, dass die SMC-Proliferation, bekannt als zentraler Mechanismus der neointimalen Hyperplasie bei restenotischen Prozessen, gehemmt werden kann und so die Restenoseraten signifikant senkt (LÜSCHER et al., 2007). Durch eine verzögerte Endothelialisierung ist das Risiko von Stent Thrombosen jedoch erhöht. In Kombination mit einem endothelstimulierenden Wirkstoff kann diesem Effekt vermutlich entgegengewirkt werden.

Am Institut für Biomedizinische Technik wurde eine entsprechende Kombinationslösung mit den Wirkstoffen Genistein und Sirolimus hergestellt und vergleichend zu den jeweiligen Wirkstofflösungen an den humanen Primärzellen HCAEC und HCASMC getestet.

Die Proliferation der Endothelzellkultur HCAEC wurde sowohl von Genistein, als auch von Sirolimus sowie der Kombination beider Wirkstoffe bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-5} M signifikant gehemmt. Genistein bewirkte bei Wirkstoffkonzentrationen von 10^{-6} - 10^{-7} M sowie 10^{-10} M eine deutliche Proliferationssteigerung, welche durch die hohen Standardabweichungen jedoch statistisch nicht gesichert werden konnte. Zusätzlich wurde für eine Konzentration von 10^{-12} M eine signifikante Proliferationsinduktion gezeigt, die aber in der Gesamtheit aller Untersuchungen einzigartig war und daher in der Gesamtbetrachtung des Wirkstoffes Genistein nicht berücksichtigt wurde.

Für Sirolimus konnte in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-11} M eine signifikante Stimulation der humanen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die Kombination beider Wirkstoffe erwies sich neben der Proliferationshemmung der Primärzellen HCAEC bei 10^{-5} M in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} - 10^{-7} M als proliferationshemmend. Bei einer Konzentration von 10^{-9} M wurde hingegen eine signifikante Stimulation der Proliferation gezeigt (Abb. 5.13).

Die Untersuchungen der Kombinationslösung aus Genistein und Sirolimus auf die humane Muskelzellkultur HCASMC lieferte unerwartete Resultate. Es konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Reduktion der Proliferation nach Stoffeinfluss nachgewiesen werden. Sirolimus wirkte in diesen Tests vergleichbar wie Genistein, was nicht mit den in der Literatur beschriebenen Daten konform geht (Abb. 5.14). Dort wurde für

Sirolimus u. a. durch MORRIS et al. 1995 eine signifikante Proliferationshemmung nach Wirkstoffeinfluss beschrieben.

→ **Die Kombination von Sirolimus und Genistein bewirkte bei hohen Wirkstoffkonzentrationen eine Proliferationsinhibierung der Endothelzellen HCAEC. Eine Konzentration von 10^{-9} M erwies sich jedoch als proliferationsstimulierend. Es konnte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich aber keine signifikante Proliferationshemmung der vaskulären glatten Muskelzellen HCASMC gezeigt werden.**

Insgesamt konnten für den Wirkstoff Genistein vielversprechende Resultate gezeigt werden. In einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} - 10^{-9} M wurden vaskuläre glatte Muskelzellen in der Proliferation gehemmt, vaskuläre Endothelzellen jedoch stimuliert. In weiterführenden Untersuchungen muss nun geklärt werden, ob der Wirkstoff Genistein als DES-Inkorporation geeignet ist.

6.1.3. Der Einfluss von 17β -Estradiol und Genistein auf Proteine von proliferations-, migrations- und inflammationsregulierenden Signalwegen

Es wurde beschrieben, dass die kardioprotektive Wirkweise des Östrogens 17β -Estradiol sowie des Phytoöstrogens Genistein in dem Einfluss auf bestimmte Proteine, die zentral in der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, begründet liegt (GERALDES et al., 2002; XIANG et al., 2010). Es ist im Hinblick auf die Vitalitäts-, Proliferations- und Migrationsuntersuchungen sehr interessant, wie sich das Muster dieser ausgewählten Proteine in den primären porcinen Endothel- und glatten Muskelzellen nach Angiotensin II Stimulation verändert. Dazu wurde der Einfluss dieser Wirkstoffe hinsichtlich der p44/42 MAPK Expression und Aktivität sowie der Aktivität von Phosphotyrosinkinasen (PTK) untersucht. Die hochkonservierten Mitogen-Activated-Protein-Kinasen (MAPKs) gehören zu einer der wichtigsten Kinase-Familien in inflammatorischen Zellen, eine der bekannten Subfamilien der Säuger sind die Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK1/2; bekannt auch als p44/42 MAPK (LUO und REIDY, 2002). Die p44/42 MAPK sind hauptsächlich in Pathways des Zellwachstums und -differenzierung involviert (KOISTINAHO und KOISTINAHO, 2002).

Im vaskulären Gewebe wird über den AT1 Rezeptor die p44/42 MAPK-Aktivität induziert und die Proliferation von glatten Muskelzellen reguliert (MEIJERING et al., 2009; DUBEY et al., 2000; GERALDES et al., 2003). Es wurde zudem beschrieben, dass durch 17β -Estradiol und Genistein die Expression des Rezeptors und somit die Expression aller durch den AT1 Rezeptor hochregulierten Proteine gehemmt wird (NICKENIG et al., 1998; WU et al., 2003; DUBEY et al., 2000; GERALDES et al., 2003) Es ist im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, ob sich dieser Zusammenhang auf die porcinen Primärzellen übertragen lässt.

Das p44/42 Pathway-vermittelte Zellwachstum und die Migration in vaskulären glatten Muskelzellen wird durch das, in atherosklerotischen und restenotischen Prozessen verstärkt exprimierte, Hormon Angiotensin II stimuliert (MEIJERING et al., 2009). Durch die Applikation von 17 β -Estradiol und Genistein soll zum einen die Angiotensin II-Bildung durch Einfluss auf den Renin-Angiotensin-Pathway und zum anderen die Expression des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors gehemmt werden, über den sämtliche kardiovaskuläre Auswirkungen des Hormons reguliert werden. Daher soll durch 17 β -Estradiol und Genistein die p44/42-MAPK-Expression und Aktivierung in SMCs inhibiert und damit die SMC-Proliferation reduziert werden (DUBEY et al., 2000; GERALDES et al., 2003).

Zudem ist für 17 β -Estradiol und Genistein bekannt, eine Endothelzellstimulation zu bewirken (ODENLUND et al., 2008), was sich durch eine erhöhte Expression und Aktivierung des p44/42 MAPK-Pathways in vaskulären ECs widerspiegelt (GERALDES et al., 2003).

Die p44/42 MAPK Proteinexpression der porcinen endothelialen Primärzellen ppEC wurde durch 17 β -Estradiol und Genistein nur bei einer zytotoxischen Konzentration von 10⁻⁴ M (Abb. 5.17 und 5.18) reduziert. Die Zytotoxizität der Pharmaka in diesem Konzentrationsbereich wurde durch die Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen an ppEC in dieser Arbeit mehrfach gezeigt. Die Gesamtproteinmenge von p44/42 MAPK wurde im weiteren untersuchten Konzentrationsbereich durch beide Wirkstoffe nicht beeinflusst.

Auf die primäre porcine glatte Muskelzellkultur ppSMC hatte 17 β -Estradiol sowohl nach 24 als auch nach 48 h im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss hinsichtlich der Expression von p44/42 MAPK (Abb. 5.19 und 5.20). Durch das Phytoöstrogen Genistein wurde die Menge von p44/42 MAPK leicht reduziert.

→ 17 β -Estradiol und Genistein bewirkten sowohl bei den Endothelzellen ppEC als auch bei den glatten Muskelzellen ppSMC nur einen geringen Einfluss auf die Expression von p44/42 MAPK.

Über Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung von p44/42 MAPK was zur Aktivierung von Nuclear Transcription Factors und anderen, im Zytoplasma lokalisierten Kinasen und somit unter anderem zur Stimulation zellulärer Proliferation und Migration führt.

Für 17 β -Estradiol konnte im nicht zytotoxischen Konzentrationsbereich eine erhöhte Expression von phosphorylierter p44/42 MAPK in den primären Endothelzellen ppEC nachgewiesen werden (Abb. 5.17), was die Resultate von GERALDES et al. von 2003 bestätigt, die an porcinen Endothelzellen aus der Aorta zeigen konnten, dass 17 β -Estradiol die p44/42 MAPK Phosphorylierung sowie die Proliferation der Zellen induziert.

Für das Isoflavon Genistein konnte genauso wie für 17 β -Estradiol eine Induktion der p44/42 MAPK Phosphorylierung in den primären porcinen Endothelzellen ppEC gezeigt werden (Abb. 5.18), was die Resultate von XIANG et al. bestätigt (XIANG et al., 2010). Zudem wurde

für die endotheliale Primärzellen ppEC eine Stimulation der Proliferation im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen (Abb. 5.6).

→ **Durch 17 β -Estradiol und Genistein wurde die Menge von phosphorylierter p44/42 MAPK in den porcinen Endothelzellen bei gleichbleibendem p44/42 MAPK Gesamtprotein erhöht.**

Die Aktivierung der p44/42 MAPK in der in dieser Arbeit verwendeten porcinen Endothelzellkultur ppEC müsste nun eine erhöhte Proliferation dieser Zellen zur Folge haben. In vorangegangenen Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen konnte eine Stimulation der primären porcinen Endothelzellen ppEC nach Genistein-Applikation beobachtet werden, das Östrogen 17 β -Estradiol erwies sich hinsichtlich des Einflusses auf die Proliferation in den nicht-zytotoxischen Konzentrationen als wirkneutral (Abb. 5.5 und 5.6). Vermutlich war die Stimulation der Proliferation durch die Aktivierung des p44/42 MAPK Proteinkomplexes nach 17 β -Estradiol-Applikation zu gering, um mit der hier verwendeten Methode zum Proliferationsnachweis messbar zu sein.

Im Gegensatz dazu wurde sowohl für 17 β -Estradiol, als auch für Genistein beschrieben, dass simultan neben der Aktivierung von p44/42 MAPK in vaskulären Endothelzellen die Aktivierung dieses Proteinkomplexes in glatten Muskelzellen inhibiert wird, was schließlich zur Proliferationshemmung dieses Zelltyps führt (GERALDES et al., 2002). Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchungen wurde nach 17 β -Estradiol-Applikation lediglich nach 24 h Wirkstoffinkubation eine Verringerung des phosphorylierten p44/42 MAPK-Komplexes der glatten Muskelzellen ppSMC nachgewiesen. 48 h Wirkstoffinkubation führte hingegen zu einer erhöhten Phosphorylierung von p44/42 MAPK (Abb. 5.19). In Kontrast zu der von LIU et al., 2002 gezeigten Inhibierung der Aktivierung von p44/42 MAPK in C57BL/6J Mäusen bzw. der von GERALDES et al., 2002 demonstrierten Reduktion der p44/42 MAPK-Aktivität in porcinen, aus der Aorta isolierten, glatten Muskelzellen nach 17 β -Estradiol-Behandlung, konnte dieser Effekt in den ppSMC nur bedingt nachgewiesen werden, was die Resultate aus den vorangegangenen Vitalitäts- und Proliferationstests untermauert. Dieses Östrogen wirkte sich als nicht oder nur gering proliferationshemmend auf die porcine Primärzellen ppSMC aus.

Für das Phytoöstrogen Genistein wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Proliferation von glatten Muskelzellen konzentrationsabhängig gehemmt wird (Abb. 5.8 und 5.12). Damit konnten die in der Literatur u. a. durch YU et al., 2008 beschriebenen Resultate bestätigt werden. Es ist nun von Interesse, ob der Einfluss auf die Proliferation der Primärzellen ppSMC über die Inhibierung der Aktivität von p44/42 MAPK reguliert wird. YU et al. hatten 2008 gezeigt, dass die Applikation von Genistein die Expression und Aktivierung u. a. von p44/42 MAPK nicht beeinflusst und postulierten, dass der antiproliferative Effekt von Genistein nicht im Einfluss in der frühen Signaltransduktion begründet liegt. Genistein soll

vielmehr die Expression des Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors (CDI) p27^{kip1} induzieren, der alle CDKs (Cyclin-Dependent Kinase), wichtige Regulatoren des Zellzyklus inhibiert (COQUERET, 2003, YU et al., 2008). XIANG et al. zeigten 2010 hingegen, dass Genistein genauso, wie zuvor für das Östrogen 17 β -Estradiol beschrieben, die Aktivierung von p44/42 MAPK in vaskulären glatten Muskelzellen hemmt, simultan in vaskulären Endothelzellen aber induziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die porcinen glatten Muskelzellen ppSMC sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine deutlich Reduktion der Aktivität von p44/42 MAPK nach Genistein-Applikation gezeigt werden (Abb. 5.20). Diese Daten weisen darauf hin, dass die durch Genistein vermittelte Reduktion der Proliferation der glatten Muskelzellen durch die Inhibierung der p44/42 MAPK Aktivität reguliert wird. Die von YU et al. beschriebene Induktion von p27^{kip1} und die damit verbundene Hemmung der den Zellzyklus regulierenden CDKs könnte zusätzlich zur p44/42 MAPK Hemmung die Wirkweise von Genistein erklären.

→ 17 β -Estradiol reduzierte die Menge von phosphorylierter p44/42 MAPK in den primären porcinen glatten Muskelzellen ppSMC nur gering. Im Gegensatz dazu konnte für Genistein eine deutliche Reduktion der p44/42 MAPK-Aktivität nachgewiesen werden.

Somit werden die Resultate der Proliferationsuntersuchungen gestützt. Genistein scheint also, neben der Begünstigung der Endothelzellproliferation, die sowohl in den Untersuchungen zur Proliferation als auch durch die Induktion der p44/42 MAPK Aktivität gezeigt wurde, die glatten Muskelzellen gleichzeitig zu hemmen.

Ob die Regulation des p44/42 MAPK-Komplexes in den porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC über den Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf den AT1 Rezeptor erfolgt, sollte durch den Expressionsnachweis des AT1 Rezeptors analysiert werden (Abb. 5.17, 5.18, 5.19 und 5.20). Über den AT1 Rezeptor vermittelt das Hormon Angiotensin II verschiedene kardiovaskuläre Reaktionen, wie die Stimulierung der Produktion von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β), Vasokonstriktion, vaskuläres und kardiales Remodeling und vaskuläres Zellwachstum. Dieser, auf der Zelloberfläche sich befindende Rezeptor, spielt bei atherosklerotischen und restenotischen Prozessen eine zentrale Rolle. NICKENIG et al. demonstrierten schon 1998, dass 17 β -Estradiol zu einer konzentrationsabhängigen Herunterregulierung der AT1 Rezeptor mRNA führt. Es wurde zudem von TAKEDA-MATSUBARA et al. 2002 gezeigt, dass die AT1 Rezeptor vermittelte VSMC Proliferation und c-fos Expression durch 17 β -Estradiol-Applikation gehemmt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Angiotensin II stimulierte Aktivierung von p44/42 und p38 MAPK durch 17 β -Estradiol über den AT1 Rezeptor inhibiert wird. Das hat zur Folge, dass nachgeschaltete Proteine in diesem Signalnetzwerk wie STAT1 und STAT3 nicht durch Phosphorylierung von Tyrosinresten aktiviert werden. Aktives STAT1 und STAT3 akkumulieren im Kern von

VSMCs und verstärken die *c-fos* Promotoraktivität, was zu einer Proliferationsstimulation der betroffenen Zellen führt. Das Östrogen 17 β -Estradiol soll so in der Lage sein, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu hemmen (LIU et al., 2002).

→ **17 β -Estradiol und Genistein bewirkten bei den endothelialen Primärzellen ppEC keine bzw. nur geringe konzentrations- und zeitabhängige AT1 Rezeptor-Expressionsveränderungen. Es ist daher anzunehmen, dass Effekte auf das Proliferationsverhalten der Endothelzellen nicht über den AT1 Rezeptor vermittelt werden.** (Abb. 5.17 und 5.18)

XU et al. konnten 2004 an endothelialen Zellen, isoliert aus der Aorta der Ratte, eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung dieses Rezeptors in diesem Zelltyp zeigen und erklärten so die antioxidative Wirkung von Genistein durch Hemmung der durch den AT1 Rezeptor regulierten NADPH-Oxidase. Dieser möglicherweise auch in den Primärzellen ppEC bestehende Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Durch die Behandlung der primären glatten Muskelzellkultur ppSMC mit dem Östrogen 17 β -Estradiol konnte hingegen die Expression des AT1 Rezeptors sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden leicht gehemmt werden (Abb. 5.19 und 5.20). Im Hinblick auf die Untersuchungen zur Aktivität der p44/42 MAPK und den vorangegangenen Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen (Abb. 5.7 und 5.8) ist es jedoch fraglich, ob diese, wie in der Literatur beschrieben, über den AT1 Rezeptor reguliert werden.

Sowohl Proliferation (Abb. 5.8) und p44/42 MAPK Aktivität wurden nach 17 β -Estradiol-Applikation (Abb. 5.19) nur geringfügig oder gar nicht beeinflusst. Die Hemmung des AT1 Rezeptors durch 17 β -Estradiol ist entweder zu schwach, um Auswirkungen auf die Aktivität der p44/42 MAPK und somit auch der zellulären Proliferation auszuüben oder die Regulation dieses Proteinkomplexes erfolgt über andere Signalwege, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Ein Zusammenhang zwischen dem AT1 Rezeptor mit dem p44/42 MAPK Proteinkomplex könnte über Knock Down Experimente beispielsweise mit si oder sh RNA weiterführend untersucht werden. Desweiteren haben GERALDES et al. 2003 gezeigt, dass in SMCs die Inhibierung der p44/42 und p38 MAPK Phosphorylierung über den Östrogenrezeptor β (ER β) reguliert wird, in ECs die Induktion der p44/42 und p38 MAPK Phosphorylierung über den ER α . Inwiefern der AT1 Rezeptor in dieses Signalnetzwerk integriert ist oder ob der Einfluss von 17 β -Estradiol über die Östrogenrezeptoren unabhängig zum AT1 Rezeptor erfolgt, ist nicht bekannt und muss weiter aufgeklärt werden.

Das Phytoöstrogen Genistein bewirkte ebenso wie 17 β -Estradiol sowohl nach 24 als auch nach 48 h eine konzentrationsabhängige Reduktion der AT1 Rezeptor Expression in den primären porcinen glatten Muskelzellen ppSMC (Abb. 5.20). Die verminderte Aktivierung von p44/42 MAPK könnte also in direktem Zusammenhang mit der Reduktion der AT1 Rezeptor

Expression nach Genistein-Applikation in diesem Zelltyp stehen. In weiterführenden Experimenten könnte, durch Manipulation des AT1 Rezeptors, der Einfluss von Genistein auf den Aktivierungsstatus von p44/42 MAPK untersucht werden, um diese Vermutung zu bestätigen.

→ 17 β -Estradiol und Genistein reduzieren die Proteinexpression des AT1 Rezeptors in den primären porcinen glatten Muskelzellen ppSMC.

Die Aktivität von Phosphotyrosinkinasen wird ebenso wie die der MAPK in vaskulärem Gewebe über den AT1 Rezeptor reguliert. Die Tyrosin-Phosphorylierung ist ein fundamental wichtiger Mechanismus in der Signal-Transduktion und Regulation in allen eukaryotischen Zellen, und steuert viele Prozesse wie u. a. Zellwachstum, -differenzierung und -entwicklung, metabolische Homöostase, und Gentranskription (HUNTER, 2009). Es handelt sich bei der Tyrosin-Phosphorylierung in vivo um einen reversiblen und dynamischen Prozess, der durch die gegensätzlich arbeitenden Proteine Protein Tyrosinkinasen und Protein Tyrosinphosphatasen reguliert wird (BURKE und ZHANG, 1998).

Es sollte in diesen Untersuchungen nun geprüft werden, ob das Östrogen 17 β -Estradiol bzw. das Phytoöstrogen Genistein einen Einfluss auf den Tyrosin-Phosphorylierungsstatus haben, um die Resultate zum zellulären Proliferationsverhalten der porcinen Primärzellen ppEC und ppSMC zu ergänzen.

Der Status der phosphorylierten Proteine der endothelialen Zellkultur ppEC wurde außerhalb des zytotoxischen Konzentrationsbereichs durch 17 β -Estradiol-Exposition sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden nicht beeinflusst (Abb. 5.17).

Genistein hingegen bewirkte eine Induktion der Protein Tyrosinkinasen in den primären porcinen Endothelzellen ppEC, was durch einen verstärkten Nachweis von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosinresten deutlich wurde (Abb. 5.18). Genistein wird in der Literatur als Tyrosinkinaseinhibitor beschrieben (AKIYAMA et al., 1987; DEAN et al., 1989). Die Daten suggerieren, dass dieser Wirkmechanismus zellspezifisch sein kann. In den untersuchten Endothelzellen ppEC stimuliert Genistein die Tyrosinphosphorylierung genauso wie die Aktivierung der p44/42 MAPK (Abb. 5.18). Sowohl Protein Tyrosinkinasen als auch MAPK sind maßgeblich an der Regulation der zellulären Proliferation beteiligt. Da für Genistein eine Stimulation der Endothelzellproliferation (ppEC und HCAEC) im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (Abb. 5.6 und 5.10), ist das Resultat hinsichtlich des Phospho-Tyrosin Status nachvollziehbar.

→ 17 β -Estradiol bewirkte in den primären Endothelzellen ppEC außerhalb des zytotoxischen Konzentrationsbereichs keine Änderung des Status phosphorylierter Proteine. Genistein führte zur Aktivierung von Protein Tyrosinkinasen und somit einer erhöhten Menge von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosinresten.

In der primären porcinen Muskelzellkultur ppSMC wurde der Phospho-Tyrosin-Status durch 17 β -Estradiol-Behandlung nur nach 24stündiger Wirkstoffinkubation reduziert. Nach 48 h konnte kein Einfluss des Östrogens auf die Aktivität der Phosphotyrosinkinasen im untersuchten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (Abb. 5.19). Diese Resultate stützen vorangegangene Untersuchungen. Die Reduktion der MAPK-Aktivität konnte ebenso wie die Hemmung der Aktivität der Protein Tyrosinkinasen nur nach 24 h gezeigt werden. Für das Phytoöstrogen Genistein konnte eine Reduktion von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosinresten gezeigt werden (Abb. 5.20). Diese Resultate belegen, dass Genistein einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Einfluss auf die primären glatten Muskelzellen bewirkt und somit auch in Prozesse der zellulären Regulation wie Wachstum und Differenzierung eingreift. Diese Vermutung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden wie der Vitalitäts- und Proliferationstestung sowie auch vorangegangenen Westernblotuntersuchungen mehrmals bestätigt und mit diesen Untersuchungen nochmals untermauert. Im Hinblick auf die Untersuchungen zum Aktivierungsstatus von p44/42 MAPK konnte ebenso für die Aktivität von Protein Tyrosinkinasen gezeigt werden, dass insbesondere das Isoflavon Genistein differenziert auf unterschiedliche Zelltypen wirkt. Während in endothelialen Zellen die Aktivität der Kinasen induziert wird, erfolgt in glatten Muskelzellen die Inhibition dieser Proteine.

→ 17 β -Estradiol änderte nicht den Status phosphorylierter Proteine in den primären porcinen glatten Muskelzellen ppSMC. Genistein bewirkte eine Reduktion der Protein Tyrosinkinase-Aktivität und somit eine Verringerung der Menge von Proteinen mit phosphorylierten Tyrosinresten.

Zur Untersuchung des zellulären Stresses nach Wirkstoff Exposition wurde die Expression des Hitzeschockproteins (HSP) 70 genauer betrachtet. HSP70 gehört zur Familie der 70 kDa großen HSPs, die ubiquitär exprimiert werden. Das unter normalen Umständen konstitutiv exprimierte HSP70 arbeitet während der Proteinsynthese als Chaperon und ist in Prozessen des intrazellulären Transports und der Degradation beteiligt. Unter Stress-Bedingungen wird durch die Beteiligung von HSP70 die zelluläre Struktur durch die Reparatur beschädigter Proteine im Zytoplasma und durch die Blockade der Apoptose geschützt. Daher wird HSP70 auch als Stressprotein bezeichnet und eine Hochregulierung dieses Proteins als eine Reaktion auf zellulären Stress angesehen (BEERE et al., 2000; BEERE, 2004).

→ Abgesehen von zytotoxischen Wirkstoffkonzentrationen konnten in relevanten Bereichen für die untersuchten Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein keine erhöhten Stresslevels nachgewiesen werden. Die gezeigten konzentrationsabhängigen Ergebnisse für die endotheliale Primärzellen ppEC als auch für die glatte Muskelzellkultur ppSMC resultieren nicht aus stressbedingten Reaktionen der Zellen (Abb. 5.17, 5.18, 5.19 und 5.20).

6.1.4. 17 β -Estradiol versus Genistein: Zusammenfassung der untersuchten zellulären und molekularen Mechanismen im Vergleich zur Literatur

Mit den Untersuchungen auf zellulärer Ebene in entsprechenden vaskulären Zellkultursystemen konnten wichtige Einblicke über die Auswirkungen des Östrogens 17 β -Estradiol sowie des Phytoöstrogens Genisteins gewonnen werden. Grundlegend wurde für beide Wirkstoffe eine gute Bioverträglichkeit ab einer Konzentration von 10⁻⁵ M ermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für 17 β -Estradiol nur minimale Auswirkungen auf Vitalität, Proliferation und Migration auf glatte Muskel- und vaskuläre Endothelzellen ermittelt werden. Auf proteinbiochemischer Ebene ließ sich eine geringe konzentrationsabhängige Hemmung des AT1 Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen, eine damit in Zusammenhang stehende Inhibierung der MAPK und PTK Aktivierung wurde nicht gezeigt. Es ist anzunehmen, dass die p44/42 MAPK und PTK Aktivität sowie weitere Teile des proliferationsregulierenden Netzwerkes in glatten Muskelzellen nicht nur über den AT1 Rezeptor reguliert werden, sondern andere Signalpathways involviert sind, die nicht durch das Östrogen 17 β -Estradiol beeinflusst werden können. Die AT1 Expressionshemmung ist daher möglicherweise zu schwach um Auswirkungen auf durch diesen Rezeptor kontrollierte Mechanismen sichtbar machen zu können.

In vaskulären Endothelzellen konnte eine leichte Aktivierung von p44/42 MAPK nach 17 β -Estradiol-Applikation gezeigt werden, Auswirkungen auf die Proliferation dieses Zelltyps konnten jedoch nicht ermittelt werden. Ein Einfluss auf den AT1 Rezeptor in Endothelzellen nach 17 β -Estradiol-Behandlung war nicht ersichtlich. Es wird beschrieben, dass über den AT1 Rezeptor in Endothelzellen die Bildung freier Radikale bei kardiovaskulären Erkrankungen gesteuert wird. 17 β -Estradiol scheint in diesem Zusammenhang keine antioxidative Wirkung in den untersuchten Endothelzellen zu besitzen.

In der Abbildung 6.1 sind die Resultate dieser Arbeit zusammengefasst und den publizierten Angaben zu 17 β -Estradiol gegenübergestellt.

Zusammenfassend kann auf zellulärer Ebene der in der Literatur beschriebene kardioprotektive Effekt von 17 β -Estradiol nicht nachvollzogen werden. Es ist in relevanten Konzentrationsbereichen zwar gut verträglich, vaskuläre Zellen werden jedoch nicht maßgeblich beeinflusst.

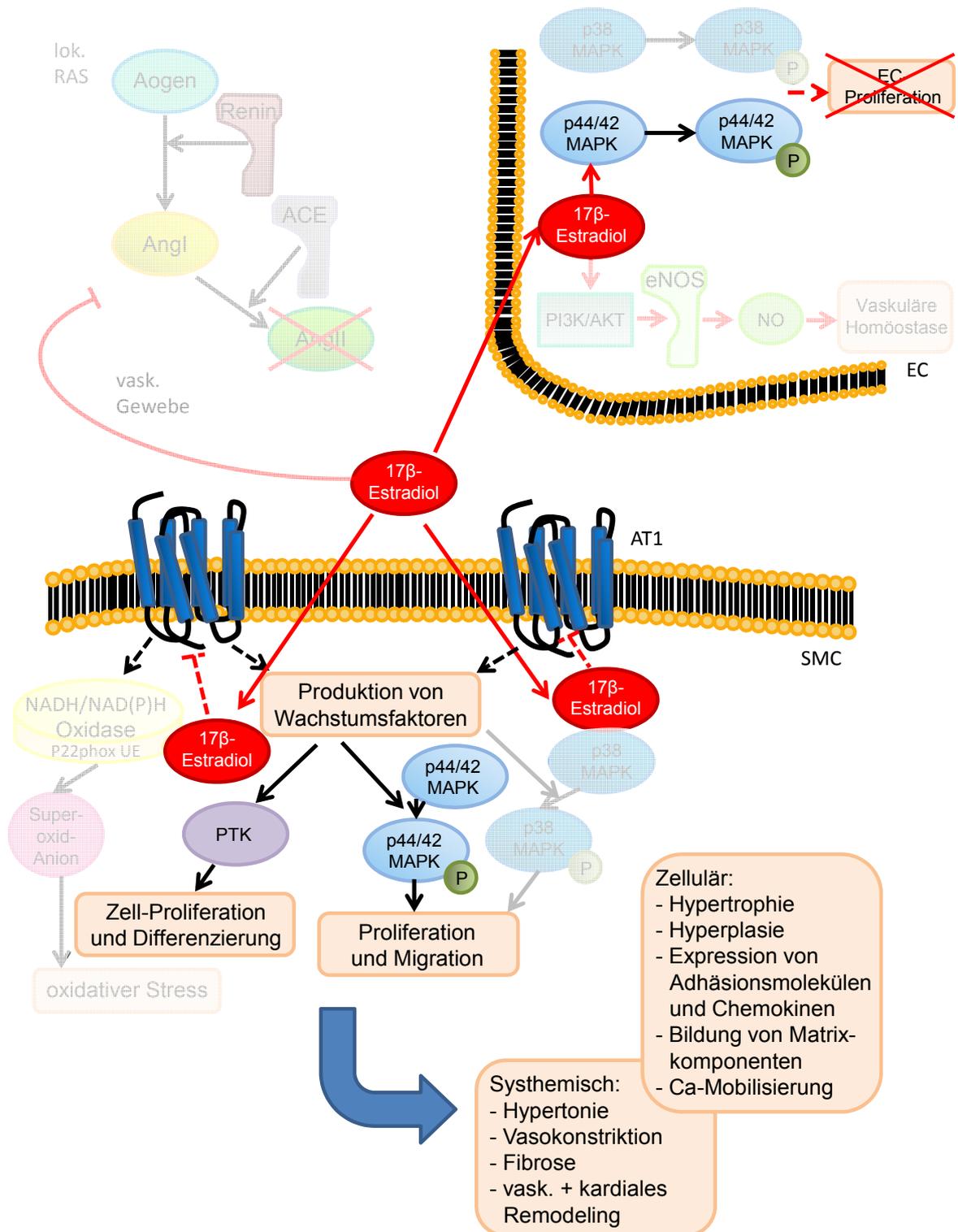


Abb. 6.1: Die Wirkweise von 17β-Estradiol auf vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen
 Erläuterungen siehe Text; Abk.: Aogen: Angiotensinogen; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; PTK: Protein Tyrosinkinase; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
 --▶: zusätzliche Signalwege →: Stimulation - -|: leichte Hemmung
 —|: Hemmung

In vielen Studien wurde berichtet, dass in Bevölkerungsgruppen, die Nahrungsmittel mit einem hohen Phytoöstrogengehalt konsumieren, ein geringes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht (ADLERCREUTZ, 1990). Phytoöstrogene wie Genistein besitzen anti-

atherogene Eigenschaften, wie die Senkung der Cholesterol-Konzentration (LEGETTE et al., 2011), die Blutdrucksenkung (LICHTENSTEIN, 1998), die Inhibierung der SMC-Zellproliferation (DUBEY et al., 1999) und die simultane Stimulation von Endothelzellen (XIANG et al., 2010) sowie eine antioxidative Wirkung (XU et al., 2004) – vergleichbar mit den Beschreibungen zum Östrogen 17 β -Estradiol. Im Gegensatz zu 17 β -Estradiol wirkt sich das Phytoöstrogen Genistein aber nicht auf das reproduktive System aus (SQUADRITO et al., 2000).

Der Einfluss auf die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wurde für Genistein auch über die Hemmung von Protein Tyrosinkinasen (POLKOWSKI und MAZUREK, 2000) und MAPK (XIANG et al., 2010) beschrieben. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte nach Genistein-Applikation die in der Literatur beschriebene Inhibierung der Aktivierung von p44/42 MAPK verifiziert werden. Zudem konnte in glatten Muskelzellen eine Hemmung des AT1 Rezeptors gezeigt werden, über den die Regulierung dieser Proteingruppen erfolgt. Die Inhibierung der Rezeptorexpression scheint daher die Aktivierung von p44/42 MAPK und PTK zu verhindern. Entsprechende Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten nach Genistein-Behandlung von glatten Muskelzellen konnten nachgewiesen werden.

In vaskulären Endothelzellen konnte für Genistein sowohl für p44/42 MAPK wie auch für die Protein Tyrosinkinasen eine erhöhte Aktivität im Gegensatz zu 17 β -Estradiol gezeigt werden. Die daraus resultierende Stimulation der Zellteilung ließ sich im Rahmen der Proliferationsuntersuchungen mit dem BrdU-Test nachweisen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Resultate für das Phytoöstrogen Genistein sind vergleichend zu den Literaturangaben in der Abbildung 6.2 zusammenfassend dargestellt.

Für das Phytoöstrogen Genistein konnte im Gegensatz zu 17 β -Estradiol gezeigt werden, das auf zellulärer Ebene in einem nicht zytotoxischen Konzentrationsbereich relevante Effekte, wie die Induktion der Endothelzellproliferation sowie die Inhibierung der glatten Muskelzellproliferation, nachgewiesen werden, die auf einen kardioprotektiven Effekt sowie auf mögliche anti-restenotische Charakteristika hinweisen.

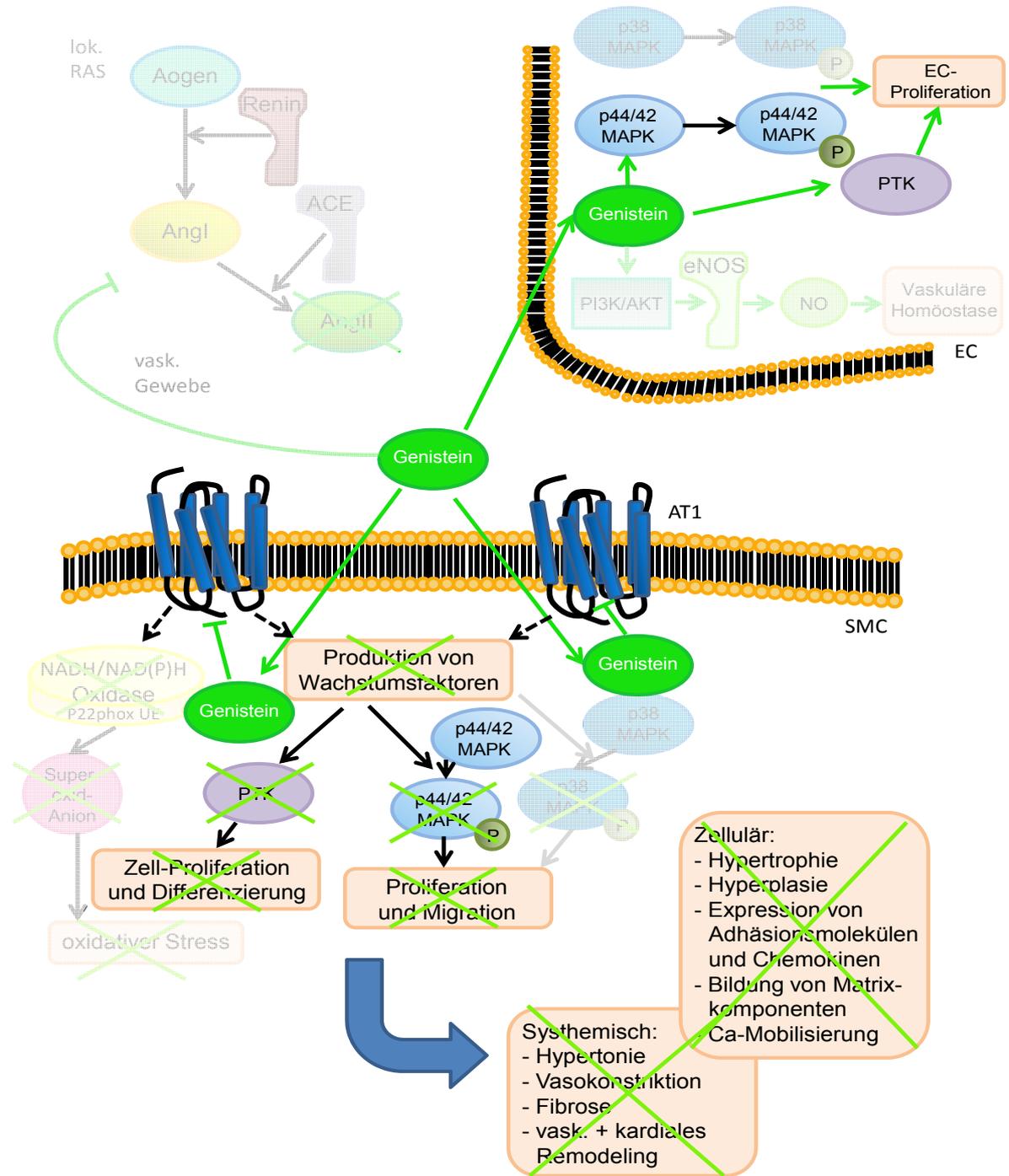


Abb. 6.2: Die Wirkweise von Genistein auf vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen
 Erläuterungen siehe Text; Abk.: Aogen: Angiotensinogen; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; PTK: Protein Tyrosinkinase; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
 --▶: zusätzliche Signalwege →: Stimulation —|: Hemmung

6.1.5. 17 β -Estradiol- und Genistein-Eluting Stent Implantation in porcinen kultivierten Carotisabschnitten

Drug-Eluting Stents haben die interventionelle Kardiologie seit der Einführung Anfang dieses Jahrtausends maßgeblich revolutioniert. Die Implantation dieser speziellen, medikamentenfreisetzungsfähigen Blutgefäßstützen reduzierte wesentlich die angiographische Restenoserate (PARK et al., 2003; MOSES et al., 2003) und somit die Notwendigkeit für Revaskularisierungsmaßnahmen im Vergleich zu Metallstents (WEISZ et al., 2006).

Im Gegensatz dazu wurde jedoch in der single-center BASKET-LATE (Basel Stent Cost-effectiveness Trial-Late Thrombotic Events) gezeigt, dass 7-18 Monate nach der DES-Implantation eine höhere Mortalität bzw. ein erhöhtes Herzinfarktrisiko bestand (PFISTERER et al., 2006). Diese Resultate wurden von CAMENZIND et al. 2007 zusätzlich untermauert.

In-Stent Thrombosen nach DES-Implantation sind zwar relativ selten, für 30 % der betroffenen Patienten endet die In-Stent Thrombose (IST) jedoch tödlich (SERRUYS und DAEMEN, 2007). Das Verhältnis zwischen early IST (<30 Tage) und late IST (>30 Tage) ist für DES und BMS ausgeglichen. Very late IST (> 1 Jahr) dagegen sind verstärkt nach der Implantation von DES zu beobachten (NORDMANN et al., 2006; CAMENZIND, 2006).

Eine Ursache für late bzw. very late In-Stent Thrombosen ist eine verzögerte oder inkomplette vaskuläre Heilung nach koronarer Intervention (PÉREZ DE PRADO et al., 2012). Von zentraler Bedeutung ist dabei eine verzögerte Endothelialisierung (DESMET, 2006; JONER et al., 2006).

In der Regel besteht ein DES aus einem Grundgerüst aus rostfreiem Stahl oder einer Cobalt Chrom Legierung, überzogen mit einem nichtdegradierbaren Polymer, in dem lipophile Medikamente wie Sirolimus, Everolimus, Zotarolimus oder Paclitaxel inkorporiert sind. Diese Implantate sind in der Lage, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch zytotoxische oder zytostatische Eigenschaften zu inhibieren. Diese Substanzen können aber durch den antiproliferativen Charakter auch auf der Ebene normaler vaskulärer Heilungsmechanismen wie der Endothelialisierung eingreifen, was zu einem erhöhten Risiko einer late In-Stent Thrombose führt (KAUL et al., 2007; LAGERQVIST et al., 2007).

Im Gegensatz zu den heute in DES inkorporierten Medikamenten wurde für das Östrogen 17 β -Estradiol vielfach beschrieben, dass neben der antiproliferativen Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen, die Proliferation der Endothelzellen stimuliert werden soll.

Auf Grund dieser Annahme haben einige Gruppen 17 β -Estradiol-Eluting Stents zunächst im Tiermodell untersucht. NEW et al. zeigten 2002, dass die Implantation eines 17 β -Estradiol-, Phosphorylcholin-beschichteten Stents im Schwein eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie ohne Einflussnahme auf die endotheliale Heilungsreaktion bewirkt. Diese Resultate wurden 2005 durch die Arbeiten von CHANDRASEKAR et al. verifiziert. Die Gruppe konnte durch die lokale Freisetzung von 17 β -Estradiol eine verbesserte Endothelialisierung

und verringerte Inflammation im porcinen Modell nachweisen. HAN et al. konnten 2007 zudem im Kaninchenmodell durch die Implantation von 17 β -Estradiol-Eluting Stents die Inhibierung der Neointimabildung sowie die Stimulation der Endothelialisierung zeigen.

Auch mit der systemischen Applikation von 17 β -Estradiol nach Stent-Implantation konnte durch die Gruppe um KYRIAKIDES 2006 eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie sowie die Verbesserung der Endothelneubildung ermittelt werden (KYRIAKIDES et al., 2006).

In der ersten humanen, 2004 durchgeführten EASTER-Studie (The Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis trial) von ABIZAID et al. wurden 17 β -Estradiol-freisetzende BiodivYsio™ Stents primär am Patienten getestet und die Resultate ließen auf eine mögliche Alternative in der Medikamentenbeladung von DES hoffen.

Auf Grund der beschriebenen Effekte auf Zellebene, vielversprechender Tierversuche und der ersten positiven klinischen Studie, wurde das Östrogen 17 β -Estradiol als DES-Inkorporation im Rahmen dieser Arbeit als Referenzwirkstoff untersucht.

17 β -Estradiol-Eluting Stents wurden in porcine Carotisabschnitte implantiert, die daraufhin 14 Tage im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung kultiviert wurden. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die Etablierung dieses Gewebekulturmodells. In zuvor am IBMT durchgeführten Arbeiten wurde bereits ein geeignetes Gewebekulturmedium hinsichtlich des Serum-, Hormon- und Wachstumsfaktor-Gehalts entwickelt und erfolgreich porcine Blutgefäßabschnitte über definierte Zeiträume bis zu 14 Tage vital erhalten. Unabhängig von dieser Arbeit erfolgten Versuche zur Gewebeverträglichkeit des, auch in der vorliegenden Arbeit in den Stentprototypen verwendeten, degradierbaren Polymers Poly-L-lactid (PLLA), welches vergleichbar mit den Auswirkungen eines Metallstent auf umliegendes Gewebe reagiert. Es erwies sich als biologisch inert und entsprach den geforderten mechanischen Anforderungen (JAKOBS, 2004; TÜMLER, 2006; SELENT, 2005). Die Kultivierung erfolgte in den vergangenen Arbeiten im Perfusionssystem nach Minuth, welches im Rahmen des Tissue-Engineerings zur Züchtung von artifiziellem Gewebe entwickelt wurde (MINUTH, 2002). Problematisch in diesem System war die ungesicherte Versorgung des Blutgefäßlumens. Die Gewebekultur im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung ermöglichte nun die separate Zufuhr von frischem Medium im Blutgefäßlumen sowie der Gefäßaußenwand, die kontinuierliche Versorgung des gesamten Gewebes mit Nährstoffen und den Abtransport von stoffwechselschädigenden Metaboliten. Es konnte in der aktuellen Arbeit gezeigt werden, dass porcine Carotisabschnitte mit nur geringen Einschränkungen der Endothelintegrität vital erhalten (Abb. 5.21) und weiterführende Arbeiten zur Charakterisierung von Gewebereaktionen in Kultur nach Stentkontakt durchgeführt werden konnten. Dieses Gewebekulturmodell ermöglichte es also, lokale Auswirkungen entsprechender Drug-Eluting Stents auf vaskuläres Gewebe zu untersuchen, ohne auf Tierversuche zurückgreifen zu

müssen. Das biologische Material stammte von Hausschweinen, die gesund waren und nicht medikamentös behandelt wurden. Diese Tiere wurden für die lokale Nahrungsmittelindustrie geschlachtet. Auf Tierversuche kann sicher nicht gänzlich verzichtet werden, es sollte aber darauf hingearbeitet werden, mit der Entwicklung geeigneter *in vitro* Methoden die Anzahl von Tierversuchsserien einzuschränken. Das Gewebekulturmodell stellt eine mögliche Alternative dar.

Nach Implantation eines 17β -Estradiol-Eluting Stents (Metallgrundgerüst mit PLLA/ 17β -Estradiol Beschichtung) in porcine Carotisabschnitte und 14tägiger Kultivierung konnte im Vergleich zum nativen Gewebe zwar eine gute Bioverträglichkeit gezeigt werden, im Bereich der Stentstruts war jedoch, bedingt durch die Stentdilataion und die damit verbundene mechanische Verletzung der Intima und der lokalen Zytotoxizität des Wirkstoffes, eine Schädigung des Endothels erkennbar. Zudem wurde auch eine Verdickung der Intima sowie eine verstärkte Bindegewebs- und Kollagenproduktion nachgewiesen (Abb. 5.24). Diese Resultate sind vergleichbar mit den ermittelten Gewebereaktionen nach Metallstent Implantation (Abb. 5.23). Von 210 μg inkorporiertem 17β -Estradiol wurden innerhalb von 14 Tagen 167 μg Wirkstoff freigesetzt. Im Hinblick auf die am IBMT durchgeführten, von dieser Arbeit unabhängigen, Freisetzungsstudien in Blutplasma (Abb. 6.3), wurde eine deutlich schnellere Elution des in Kultur untersuchten Implantats ermittelt. Entgegen einer Wirkstoffelution im Reagenzglas von ca. 20 μg in etwa 300 h, sind 80 % der gesamten inkorporierten 17β -Estradiolmenge während des 14tägigen Kultivierungszeitraum aus dem Implantat freigesetzt worden.

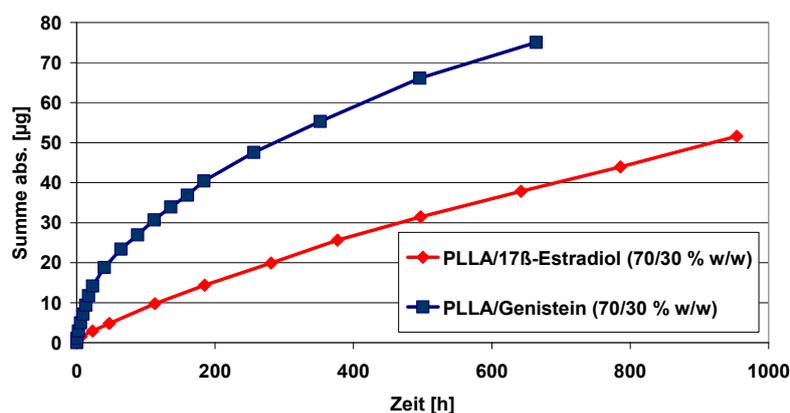


Abb. 6.3: Freisetzung von 17β -Estradiol und Genistein aus β -sterilisierten Stentbeschichtungen in Blutplasma. PLLA: Poly-L-lactid

Mit Immunfluoreszenz konnte die Anreicherung von 17β -Estradiol im kultivierten Gewebe gezeigt werden (Abb. 5.25). Wie viel sich jedoch im Gewebe angereichert hat und welche Menge mit dem Medium abtransportiert wurde, kann jedoch nicht abgeschätzt werden.

Lokal freigesetztes 17β -Estradiol scheint im porcinen kultivierten Gewebe keine Auswirkungen auf die Gewebeintegrität auszuüben. Die in der Literatur zunächst sehr vielversprechenden Resultate wie der SMC-Hemmung, der EC-Induktion und der EASTER

Studie konnten mit diesen Untersuchungen nicht nachvollzogen werden. Dieses Resultat ist aber im Hinblick auf die Vitalitäts-, Proliferations-, Migrations- und proteinbiochemischen Untersuchungen, die auf zellulärer Ebene keinen kardioprotektiven Effekt ersichtlich machen konnten, nicht überraschend.

Parallel zu den hier vorgestellten praktischen Arbeiten, wurden von anderen Gruppen ebenso Resultate für 17 β -Estradiol beschrieben, die hinsichtlich einer Reduktion von neointimaler Hyperplasie und Restenose sehr ernüchternd waren.

2007 publizierten ABIZAID et al. die Resultate der randomisierten Multicenter Studie ETHOS I (The Estradiol-eluting stents in humans for Restenosis trial), in deren Verlauf der 17 β -Estradiol-freisetzende R-StentTM mit zwei verschiedenen Freisetzungsmustern in der Klinik getestet wurde. Das Implantat erwies sich zwar als gut verträglich, im Vergleich zu den Kontrollstents (unbeschichteter R-StentTM) konnte aber keine signifikant bessere Restenoseprognose gezeigt werden. In weiteren Studien durch AIROLDI et al., 2005 und ADRIAENSSENS et al., 2007 (ISAR-PEACE) erhielt man vergleichbare Ergebnisse.

→ 17 β -Estradiol-Eluting Stents haben keine Vorteile gegenüber Metallstents. Die lokale Applikation des Östrogens bewirkt keinen restenosehemmenden Effekt.

Da für Östrogene in experimentellen Studien inhibitorische Effekte auf die Atheroskleroseprognose beschrieben worden sind (WALSH et al., 1991; DUBEY et al., 2000), wäre eine systemische 17 β -Estradiol-Applikation zusätzlich zur Koronaren Intervention mit begleitender medikamentöser Antikoagulations-Therapie eine mögliche Alternative zur lokalen Anwendung. Da aber durch ORTMANN et al., 2004 in einem Übersichtsartikel gezeigt wurde, dass in neueren Studien zur Hormonersatztherapie entweder kein Effekt oder ein Anstieg der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität nachgewiesen wurde, sollte vom Einsatz von Östrogenen bei kardiovaskulären Fragestellungen abgesehen werden.

Auf Zellebene wurden für das Phytoöstrogen Genistein ebenso wie für 17 β -Estradiol antiproliferative Effekte auf glatte Muskelzellen (DUBEY et al., 1999) sowie proliferationsinduzierende Auswirkungen auf Endothelzellen beschrieben (XIANG et al., 2010). Zudem besitzt Genistein anti-atherogene Eigenschaften, wie die Senkung der Cholesterolkonzentration (LEGETTE et al., 2011), die Blutdrucksenkung (LICHTENSTEIN, 1998) und antioxidative Eigenschaften (XU et al., 2004). Im Gegensatz zu 17 β -Estradiol wirkt sich das Phytoöstrogen Genistein aber nicht auf das reproduktive System aus (SQUADRITO et al., 2000). Es sind aber keine Daten über Gewebereaktionen auf Drug-Eluting Stents mit Genistein Inkorporation bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Genistein-Eluting Stent Prototypen in porcine Carotisabschnitte implantiert und die Auswirkungen auf das im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung kultivierte Gewebe untersucht. Im Vergleich zum nativen Gewebe konnte auch für Genistein-Eluting Stents eine

gute Verträglichkeit festgestellt werden. Neben der Verletzung der Intima durch die Stentdilataion und der lokalen Zytotoxizität von Genistein konnte, im Gegensatz zu den Carotisabschnitten mit Metall- bzw. 17β -Estradiol-Eluting Stent Kontakt, keine Gewebeumstrukturierung nachgewiesen werden. Die Intima war zwar auch leicht verdickt, die Anteile an Bindegewebe und Kollagen im untersuchten Blutgefäßabschnitt waren jedoch im Vergleich zu nativem Material nicht erhöht (Abb. 5.26).

Von 210 μg Genistein-Beladung wurden 104 μg Wirkstoff innerhalb von 14 Tagen aus dem Implantat freigesetzt. Im Hinblick auf die vom IBMT durchgeführte Freisetzungsstudie (Abb. 6.3), in der für Genistein eine Elution aus der Stentbeschichtung von ca. 50 μg in 300 h ermittelt wurde, konnte auch für diesen Wirkstoff eine deutlich schnellere Freisetzung in der Gewebekultur ermittelt werden. Dadurch ist es möglich, dass der Wirkstoff lokal so hoch konzentriert vorliegt, dass es zu zytotoxischen Auswirkungen in Kontaktbereichen von Implantat und Gefäßwand kommt. Genistein scheint sich zudem verstärkt in Bereichen der Intima anzureichern (Abb. 5.27), wohingegen 17β -Estradiol im gesamten Blutgefäßquerschnitt lokalisiert war (Abb. 5.25). Wie sich lokal aus DES freigesetztes Genistein auf vaskuläres Gewebe hinsichtlich der Bioverträglichkeit und der Fähigkeit zur Reduktion von neointimaler Hyperplasie und Restenose auswirkt, muss weiterführend in Tierversuchen geklärt werden.

Bisher sind zu Drug-Eluting Stents nur mit Genistein Inkorporation keine Literaturangaben bekannt.

DAEMEN und SERRUYS berichteten in einem Übersichtsartikel jedoch von einem Drug-Eluting Stent, der sowohl Genistein als auch Sirolimus freisetzt. Die Medikamenten-Gesamtbeladung beträgt 2,51 mg/mm^2 (112 mg Genistein und 76 mg Sirolimus auf einem 16 mm Stent).

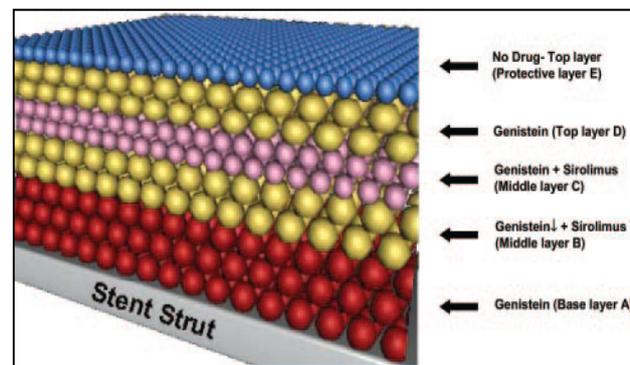


Abb. 6.4: Design des Sirolimus/Genistein Dual-Eluting Stents (DAEMEN und SERRUYS, 2007)

Dieser Stent hat eine 5lagige Beschichtung, die oberste Schicht besteht dabei aus einer medikamentenfreien Polymermischung aus den biodegradierbaren Polymeren Poly-L-lactid, 50/50 Poly-DL-lactid und Polyvinyl Pyrrolidon (Layer E). Nach Implantation dieses Stents erfolgt die initiale hochdosierte Freisetzung von Genistein aus Layer D für 2 Tage um die Plättchen-Aggregation zu inhibieren. Die kombinierte Freisetzung von Genistein und Sirolimus aus Layer C erfolgt an Tag 3-9 nach Implantation, was die primäre Thrombenbildung und intimale Zellproliferation beeinflussen soll. Die langsame Freisetzung von Genistein und Sirolimus aus Layer B 10-49 Tage nach der Intervention soll Zellproliferation inhibieren. Schließlich bewirkt die langsame Freisetzung von Genistein 50-

89 Tage nach dem Eingriff die Vermeidung später Thrombosen bis zu 3 Monate nach der Implantation (DAEMEN and SERRUYS, 2007). Resultate in Form von Tierversuchen oder klinischen Studien zu diesem Stent sind bisher nicht beschrieben worden.

Als Alternative zur Genistein Inkorporation in DES wurde durch SHEIBAN et al. 2008 der Effekt eines Genistein-Eluting Ballons im Tiermodell Schwein beschrieben. Dieser Ballon erwies sich als gut verträglich und wirkte sich anti-inflammatorisch auf das umgebende Gewebe aus. In Kombination mit der Implantation eines DES, könnte Genistein als lokal appliziertes Medikament während einer koronaren Intervention Entzündungsreaktionen vermindern und die Endothelialisierung begünstigen, was sich positiv auf Restenose- und Late IST Raten auswirkt und Revaskularisierungsmaßnahmen einschränken könnte. Durch die relativ kurze Verweildauer des Drug-Eluting Ballons während der perkutanen koronaren Intervention würden zytotoxische Auswirkungen von Genistein auf das umliegende Gewebe reduziert werden.

➔ **Durch den Genistein-Eluting Stent konnte der, nach Metall- und 17 β -Estradiol-Eluting Stent Kontakt beobachteten Gewebeumorganisation, entgegengewirkt werden. Hinsichtlich der in dieser Arbeit erzielten Resultate auf Zell- und Gewebekulturebene und der aktuellen Literaturangaben scheint Genistein ein möglicher Kandidat als DES-Inkorporation zu sein.**

6.2. Schlussfolgerung: Tauglichkeit von 17 β -Estradiol und Genistein als DES-Inkorporation zur Reduktion von neointimaler Hyperplasie und Restenose

Das Östrogen 17 β -Estradiol wurde von vielen Autoren als kardioprotektiv beschrieben. Neben der Senkung des Serumcholesterolspiegels, des Blutdruckes und weiterer maligner Erscheinungen des kardiovaskulären Systems, wurde für 17 β -Estradiol die Fähigkeit zur Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei simultaner Stimulation von Endothelzellen beschrieben. Daher war es naheliegend, diesen Wirkstoff in einen Drug-Eluting Stent zu inkorporieren und auf die Auswirkungen in atherosklerotischem Gewebe zu untersuchen. In mehreren repräsentativen humanen Studien konnte für 17 β -Estradiol-Eluting Stents, trotz vielversprechender Resultate in verschiedenen Tiermodellen, kein Vorteil zu Metallstents ermittelt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die publizierten Daten; sowohl auf zellulärer als auch auf Gewebeebene konnten keine Hinweise für die Kardioprotektivität des Östrogens abgeleitet werden. Es ist daher nicht anzunehmen, dass 17 β -Estradiol bei lokaler Applikation signifikant die neointimale Hyperplasie und damit die Restenoserate senken kann. 17 β -Estradiol stellt damit keine neue Option in der interventionellen Kardiologie dar.

Das Phytoöstrogen Genistein wurde ebenso wie 17β -Estradiol als kardioprotektiv beschrieben. Es konnten vergleichbare Effekte nachgewiesen werden, die jedoch um 30 % effektiver waren. Hinsichtlich der in dieser Arbeit ermittelten Resultate auf zellulärer und Gewebekulturebene, scheint Genistein ein Wirkstoff zu sein, der sich positiv auf vaskuläres Gewebe nach perkutanen koronaren Interventionen auswirken könnte. Die von verschiedenen Gruppen beschriebenen Auswirkungen von Genistein konnten sowohl auf vaskuläre Zellen als auch nach lokaler Applikation im Gewebe verifiziert werden. Durch die Fähigkeit zur Stimulation der Endothelzellproliferation bei gleichzeitiger Reduktion der Muskelzellproliferation, scheint das Phytoöstrogen die vaskuläre Heilungsreaktion zu verbessern. Genistein stellt somit eine vielversprechende Option in der Weiterentwicklung von Drug-Eluting Stents dar, welche durch die lokale Freisetzung eine mögliche Verringerung der neointimalen Hyperplasie und der Restenoserate bewirken könnten. Insbesondere im Hinblick auf die late und very late In-Stent Thrombose scheint ein potenter Kandidat in der Entwicklung neuer Local Drug Delivery Systeme ermittelt worden zu sein.

7. Zusammenfassung

Hintergrund: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den westlichen Industrienationen weit verbreitet und Folgeerkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit und der Herzinfarkt, führen oftmals zum Tod. Die perkutane transluminale koronare Intervention in Kombination mit der Implantation eines Stents ist die bevorzugte Behandlungsmethode, deren Erfolg durch den Wiederverschluss des behandelten Blutgefäßabschnittes eingeschränkt wird. Die Restenoserate konnte durch Drug-Eluting Stents zwar deutlich reduziert werden, deren Verwendung führt jedoch zu späten Stenosen, den sog. late bzw. very late in-Stent Thrombosen. Ziel der Forschung besteht in der Weiterentwicklung von Drug-Eluting Stents und der Inkorporation neuer Medikamente, die signifikant die Restenoserate senken und die Langzeitprognose verbessern. Das als kardioprotektiv beschriebene Östrogen 17 β -Estradiol scheint daher ein potenter Kandidat zu sein, der Einfluss auf das reproduktive System grenzt die Einsetzbarkeit des Östrogens als Stentinkorporation jedoch ein. Für das strukturell ähnliche Phytoöstrogen Genistein sind vergleichbare Effekte beschrieben worden, ohne jedoch das reproduktive System negativ zu beeinflussen.

Methoden: Die Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein wurden in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-12} M hinsichtlich ihres Einflusses auf die Vitalität, Proliferation und Migration der vaskulären Endothelzellen BFA, ppEC und HCAEC und der vaskulären glatten Muskelzellen A7r5, ppSMC und HCASMC charakterisiert. Auf proteinbiochemischer Ebene erfolgte die Untersuchung verschiedener Targets von 17 β -Estradiol und Genistein, wie der Expression und Aktivität von p44/42 MAP Kinasen, der AT1 Expression und der Aktivität von Protein Tyrosinkinase.

Entsprechende 17 β -Estradiol- bzw. Genistein-Eluting Stent Prototypen wurden am Institut für Biomedizinische Technik mit dem teilautomatisierten Spraycoating-Verfahren RAMSES (*Rostock Advanced Manufacturing of Spraycoated drug Eluting Stents*) mit einem PLLA/Wirkstoff-Verhältnis von 70 %/30 % (w/w) hergestellt und diese im Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung auf ihre Auswirkungen auf porcine Carotisabschnitte mit histologischen und morphologischen Methoden sowie hinsichtlich der Wirkstoffanreicherung und -verteilung mit Immunfluoreszenz untersucht.

Ergebnisse: Im Rahmen dieser Arbeit konnten für das Östrogen 17 β -Estradiol neben der Zytotoxizität bei einer Konzentration von 10^{-4} M nur minimale Auswirkungen auf Vitalität, Proliferation und Migration auf glatte Muskel- und vaskuläre Endothelzellen ermittelt werden. Auf proteinbiochemischer Ebene ließ sich eine geringe konzentrationsabhängige Hemmung des AT1 Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen, eine damit in Zusammenhang stehende Inhibierung der p44/42 MAP Kinase und Protein Tyrosinkinase Aktivierung wurde nicht gezeigt.

In vaskulären Endothelzellen konnte eine leichte Aktivierung von p44/42 MAP Kinase nach 17 β -Estradiol-Applikation gezeigt werden, Auswirkungen auf die Proliferation dieses Zelltyps konnten jedoch nicht ermittelt werden. Ein Einfluss auf den AT1 Rezeptor in Endothelzellen nach 17 β -Estradiol-Behandlung war nicht ersichtlich.

Für das Phytoöstrogen Genistein konnte die Proliferationshemmung von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Stimulation der Endothelzellproliferation gezeigt werden. Bei einer Konzentration von 10⁻⁴ M erwies sich Genistein ebenso als zytotoxisch.

Genistein bewirkte die Inhibierung der p44/42 MAPK Aktivierung sowie die Hemmung des AT1 Rezeptors in vaskulären glatten Muskelzellen sowie eine Reduktion der Protein Tyrosinkinase Aktivität. In vaskulären Endothelzellen konnte sowohl für p44/42 MAPK wie auch für die Protein Tyrosinkinasen eine erhöhte Aktivität gezeigt werden.

Durch die Etablierung des Tube Chamber System TCS^{2c} (Provitro) mit innerer und äußerer Mediumversorgung konnten porcine Carotisabschnitte über 14 d vital erhalten werden und entsprechende Stentprototypen in kultivierte Carotisabschnitte implantiert und Gewebereaktionen nach Stentimplantation charakterisiert werden. 17 β -Estradiol-Eluting Stents zeigten vergleichbare Auswirkungen auf vaskuläre, kultivierte Carotisabschnitte wie Metallstents mit einer Umstrukturierung des Gewebes durch Reduktion des Muskelzell- und Erhöhung des Bindegewebs- und Kollagenanteils. Nach Genistein-Eluting Stent Implantation wurde keine Umstrukturierung des Gewebes ermittelt.

Schlussfolgerung: Sowohl auf zellulärer als auch auf Gewebeebene konnten für das Östrogen 17 β -Estradiol keine Hinweise für eine Kardioprotektivität nachgewiesen werden. 17 β -Estradiol scheint bei lokaler Applikation nicht signifikant die neointimale Hyperplasie und damit die Restenoserate senken zu können und stellt damit keine neue Option in der interventionellen Kardiologie dar.

Das Phytoöstrogen Genistein kann vermutlich durch die lokale Freisetzung die vaskuläre Heilungsreaktion verbessern. Es stellt somit eine vielversprechende Option in der Weiterentwicklung von Drug-Eluting Stents dar, durch eine mögliche Verringerung der neointimalen Hyperplasie und der Restenoserate sowie der Reduktion von late und very late In-Stent Thrombosen.

8. Ausblick

Untersuchungen zu 17 β -Estradiol-Eluting Stents sollten nicht weiter in Betracht gezogen werden. Vielmehr könnten die Auswirkungen des Östrogens nach systemischer Applikation als Begleittherapie zur perkutanen koronaren Intervention sowie der Anti-Koagulationstherapie untersucht werden.

Genistein-Eluting Stents müssen hinsichtlich der Freisetzungskinetik weiter optimiert werden. Da keine Daten zu den Auswirkungen im lebenden Organismus bekannt sind, müssen weiterführend die Auswirkungen der im Perfusionssystem getesteten Implantate in Tierversuchen näher charakterisiert und nach definierten Zeiträumen pathologisch begutachtet werden.

Um die Wirkweise von Genistein auf vaskuläre Zellen besser zu verstehen, müssen weiterführende molekulare und proteinbiochemische Untersuchungen erfolgen.

9. Literaturverzeichnis

1. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AG, Moses J, Kipshidize N, Roubin GS, Mehran R, New G, Leon MB, Sousa JE. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43 (6): 1118-21.
2. Abizaid A, Chaves AJ, Leon MB, Hauptmann K, Mehran R, Lansky AJ, Baumbach W, Shanker H, Muller R, Feres F, Sousa AGMR, Sousa JE, Grube E. Randomized, double blind, multicenter study of the polymer-based 17 β -estradiol-eluting stent for treatment of native coronary artery lesions: Six-month results of the ETHOS I trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007; 70 (5): 654-660.
3. Abu-Halawa SA, Thompson K, Kirkeeide RL, Vaughn WK, Rosales O, Fujisi K, Schroth G, Smalling R, Anderson HV. Abu-Halawa SA, Thompson K, Kirkeeide RL, Vaughn WK, Rosales O, Fujisi K, Schroth G, Smalling R, Anderson HV. Estrogen replacement therapy and outcome of coronary balloon angioplasty in postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 1998; 82 (4): 409-13.
4. Adlercreutz H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1990; 201: 3-23.
5. Adriaenssens T, Mehilli J, Wessely R, Ndrepepa G, Seyfarth M, Wieczorek A, Blaich B, Iijima R, Pache J, Kastrati A, Schömig A. Does Addition of Estradiol Improve the Efficacy of a Rapamycin-Eluting Stent? Results of the ISAR-PEACE Randomized Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49 (12): 1265-1271.
6. Airoidi F, Di Mario C, Ribichini F, Presbitero P, Sganzerla P, Ferrero V, Vassanelli C, Briguori C, Carlino M, Montorfano M, Biondi-Zoccai GG, Chieffo A, Ferrari A, Colombo A. 17-beta-estradiol eluting stent versus phosphorylcholine-coated stent for the treatment of native coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96 (5): 664-7.
7. Akishita M, Shirakami G, Iwai M, Wu L, Aoki M, Zhang L, Toba K, Horiuchi M. Angiotensin converting enzyme inhibitor restrains inflammation-induced vascular injury in mice. *J Hypertens.* 2001; 19 (6): 1083-8.
8. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987; 262 (12): 5592-5.
9. Alazzoni A, Al-Saleh A, Jolly SS. Everolimus-Eluting versus Paclitaxel-Eluting Stents in Percutaneous Coronary Intervention: Meta-Analysis of Randomized Trials. *Thrombosis.* 2012; 2012: 1263-69.
10. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003; 199 (1): 8-17.
11. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem.* 2001; 276 (21): 17808-14. Epub 2001 Feb 21.
12. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr.* 1996; 126 (1): 43-50.
13. Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68 (6 Suppl): 1390S-1393S.
14. Antonov AS, Kolodgie FD, Munn DH, Gerrity RG. Regulation of macrophage foam cell formation by α v β 3 integrin: potential role in human atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2004; 165 (1): 247-58.
15. Arnal J-F, Gourdy P, Elhage R, Garmy-Susini B, Delmas E, Brouchet L, Castano C, Barreira Y, Couloumiers JC, Prats H, Prats A-C, Bayard F. Estrogens and atherosclerosis. *European Journal of Endocrinology.* 2004; 150: 113-117.

16. Babapulle MN, Joseph L, Bélisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ. A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet*. 2004; 364 (9434): 583-91.
17. Barragan P, Rieu R, Garitey V, Roquebert PO, Sainsous J, Silvestri M, Bayet G. Elastic recoil of coronary stents: a comparative analysis. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2000; 50 (1): 112-9.
18. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 469-475.
19. Beere HM: "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004, 117: 2641-2651.
20. Brass, L.F. & Shattil, S.J. Hemmung der Thrombin-induzierten Blutplättchen-Aktivierung durch Leupeptin. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 5210-5216.
21. Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Apr;32(4):373-81.
22. Bruckenberger E. Herzbericht 2006. Hannover: Eigenverlag, 2007.
23. Burke TR Jr, Zhang ZY. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers.* 1998; 47 (3): 225-41.
24. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112 (2): 195-203.
25. Byrne RA, Sarafoff N, Kastrati A, Schömig A. Drug-eluting stents in percutaneous coronary intervention: a benefit-risk assessment. *Drug Saf.* 2009; 32 (9): 749-70.
26. Camenzind E. Do drug-eluting stents increase death? *European Society of Cardiology Congress News.* September 5, 2006.
27. Camenzind E, Steg PG, Wijns W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. *Circulation.* 2007; 115 (11): 1440-55; discussion 1455. Epub 2007 Mar 7.
28. Carlsson J, von Wagenheim B, Linder R, Anwari TM, Qvist J, Petersson I, Magounakis T, Lagerqvist B. Is late stent thrombosis in drug-eluting stents a real clinical issue? A single-center experience and review of the literature. *Clin Res Cardiol.* 2007; 96 (2): 86-93. Epub 2006 Dec 22.
29. Cassidy A, Hooper L. Phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Br Menopause Soc.* 2006; 12(2): 49-56.
30. Chandrasekar B, Tanguay J-F. Local Delivery of 17-Beta-Estradiol Decreases Neointimal Hyperplasia After Coronary Angioplasty in a Porcine Model. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 1972-1978.
31. Chandrasekar B, Nattel S, Tanguay JF. Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38 (5): 1570-6.
32. Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, Lauzier D, Nattel S, Tanguay J-F. Local delivery of 17 β -estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 1042-1047.
33. Charakida M, Tousoulis D, Stefanadis C. Early atherosclerosis in childhood: diagnostic approaches and therapeutic strategies. *Int J Cardiol.* 2006; 109 (2): 152-9. Epub 2005 Jul 14.
34. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998; 83 (9): 952-9.
35. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit.* 2005; 11 (6): RA194-205. Epub 2005 May 25.

36. Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honoré EK, Cline JM. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998; 217 (3): 365-8.
37. Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2002; 132 (3): 566S-569S.
38. Colditz GA. Hormones and breast cancer: evidence and implications for consideration of risks and benefits of hormone replacement therapy. *J Womens Health.* 1999; 8 (3): 347-57.
39. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997; 350 (9084): 1047-59.
40. Concina P, Sordello S, Barbacanne MA, Elhage R, Pieraggi MT, Fournial G, Plouet J, Bayard F, Arnal JF. The mitogenic effect of 17beta-estradiol on in vitro endothelial cell proliferation and on in vivo reendothelialization are both dependent on vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res.* 2000; 37(3): 202-8
41. Coqueret O. New targets for viral cyclins. *Cell Cycle.* 2003 Jul-Aug; 2(4): 293-5.
42. Costa MA, Simon DI. Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents. *Circulation.* 2005; 111: 2257-2273
43. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem.* 1993; 41 (11): 1961–1967.
44. Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. *Circ J.* 2011; 75(6): 1287-96. Epub 2011 Apr 29.
45. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87 (13): 5134-8.
46. Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II Induces Smooth Muscle Cell Proliferation in the Normal and Injured Rat Arterial Wall. *Circulation Research.* 1991; 68: 450-456
47. Daemen J, Serruys PW. Drug-eluting stent update 2007: part I. A survey of current and future generation drug-eluting stents: meaningful advances or more of the same? *Circulation.* 2007 Jul 17;116(3):316-28.
48. Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F, Yang Z, Mahler F, Lüscher TF. 17 β -Estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. *Cardiovascular Research.* 1996; 32: 980-985
49. Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CW. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem.* 2003; 278 (2): 962-7. Epub 2002 Nov 5.
50. Dancu MB, Berardi DE, Vanden Heuvel JP, Tarbell JM. Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (11): 2088-94. Epub 2004 Sep 2.
51. Dean NM, Kanemitsu M, Boynton AL. Effects of the tyrosine-kinase inhibitor genistein on DNA synthesis and phospholipid-derived second messenger generation in mouse 10T1/2 fibroblasts and rat liver T51B cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165 (2): 795-801.
52. deBlois D, Viswanathan M, Su JE, Clowes AW, Saavedra JM, Schwartz SM. Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery: role of AT1 receptor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 1130 –1137.

53. Denes L, Entz L, Jancsik V. Restenosis and therapy. *Int J Vasc Med.* 2012; 2012: 406236. Epub 2012 Feb 23.
54. Desmet W. Delayed neointimal healing after drug-eluting stent implantation: seeing is believing. *Eur Heart J.* 2006; 27 (18): 2147-9. Epub 2006 Aug 9.
55. Di Lorenzo E, De Luca G, Sauro R, Varricchio A, Capasso M, Lanzillo T, Manganelli F, Mariello C, Siano F, Pagliuca MR, Stanco G, Rosato G. The PASEO (PaclitAxel or Sirolimus-Eluting Stent Versus Bare Metal Stent in Primary Angioplasty) Randomized Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009; 2 (6): 515-23.
56. Djuric Z, Chen G, Doerge DR, Heilbrun LK, Kucuk O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett.* 2001; 172 (1): 1-6.
57. Doostzadeh J, Clark LN, Bezenek S, Pierson W, Sood PR, Sudhir K. Recent progress in percutaneous coronary intervention: evolution of the drug-eluting stents, focus on the XIENCE V drug-eluting stent. *Coron Artery Dis.* 2010 Jan; 21 (1): 46-56.
58. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clément JF, Chénard V, Moreau P, Servant MJ. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I κ B kinase complex. *J Biol Chem.* 2006; 281 (19): 13275-84. Epub 2006 Mar 2.
59. Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 33 (1 Pt 2): 177-82.
60. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (4): 964-72.
61. Duff JL, Berk BC, Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 188: 257-264.
62. Dykens JA, Carroll AK, Wiley S, Covey DF, Cai ZY, Zhao L, Wen R. Photoreceptor preservation in the S334ter model of retinitis pigmentosa by a novel estradiol analog. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68 (10): 1971-84.
63. Ellis, 2004 Laborjournal online (<http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick16.html>)
64. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994 Aug 25;331(8):496-501.
65. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991 Mar 1;17(3):758-69.
66. Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 34 (1): 118-25.
67. Galle J. Atherosclerosis and arteriitis: implications for therapy of cardiovascular disease. *Herz.* 2004; 29 (1): 4-11.
68. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 2001; Sep; 108 (5): 689-701.
69. García-García HM, Vaina S, Tsuchida K, Serruys PW. Drug-eluting stents. *Arch Cardiol Mex.* 2006; 76 (3): 297-319.
70. Garg P, Mauri L. The conundrum of late and very late stent thrombosis following drug-eluting stent implantation. *Curr Opin Cardiol.* 2007; 22: 565-571
71. Gebbers JO. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins--a critical review. *Ger Med Sci.* 2007; 5: Doc04.

72. Geraldès P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen Regulation of Endothelial and Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation. Role of p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1585-1590
73. Geraldès P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res.* 2003; 93 (5): 399-405. Epub 2003 Jul 31.
74. Geraldès P, Geoffroy P, Cloutier I, Sirois MG, Tanguay JF. Local Delivery of 17-Beta-Estradiol Modulates Collagen Content in Coronary Porcine Arteries after PTCA and Stent Implantation. *J Vasc Res.* 2008; 45: 503-511
75. Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (2): 722-6.
76. Goldstein JL, Brown MS. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 1977; 26 (11): 1257-75.
77. Gore-Langton RE. Cyclosporine differentially affects estrogen and progesterin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 1988 Jun; 57 (3): 187-98.
78. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension.* 1997; 29 (1 Pt 2): 366-73.
79. Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2000 Dec 19; 133 (12): 933-41.
80. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int.* 2001; 59 (2): 415-24.
81. Guo RW, Yang LX, Li MQ, Liu B, Wang XM. Angiotensin II induces NF-kappa B activation in HUVEC via the p38MAPK pathway. *Peptides.* 2006; 27 (12): 3269-75. Epub 2006 Nov 9.
82. Haas, SJ-P. ECL-Blots hausgemacht. *Laborjournal* 2005, 5: 68
83. Han Y, Liang M, Kang J, Qi Y, Deng J, Xu K, Yan C. Estrogen-Eluting Stent Implantation Inhibits Neointimal Formation and Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007; 70 (5): 647-653
84. Han YL, Zhang J, Li Y, Wang SL, Jing QM, Yi XH, Ma YY, Luan B, Wang G, Wang B. Long-term outcomes of drug-eluting versus bare-metal stent implantation in patients with chronic total coronary artery occlusions. *Chin Med J (Engl).* 2009; 122 (6): 643-7.
85. Hao H, Ishibashi-Ueda H, Tsujimoto M, Ueda Y, Shite J, Gabbiani G, Fujii K, Hirota S. Drug-eluting stent: importance of clinico-pathological correlations. *Circ J.* 2011; 75 (7): 1548-58. Epub 2011 May 27.
86. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214 (3): 847-55.
87. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000 Oct 13; 87 (8): 677-82.
88. Heermann KH, Gültekin H, Gerlich WH. Protein blotting: techniques and application in virus hepatitis research. *Ric Clin Lab.* 1988; 18 (2-3): 193-221.
89. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276 (5): 3459-67. Epub 2000 Oct 23.

90. Hoffmann R, Jansen C, König A, Haager PK, Kerckhoff G, vom Dahl J, Klauss V, Hanrath P, Mudra H. Stent design related neointimal tissue proliferation in human coronary arteries; an intravascular ultrasound study. *Eur Heart J.* 2001; 22 (21): 2007-14.
91. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21 (2): 140-6. Epub 2009 Mar 9.
92. Huong PL, Kolk AH, Eggelte TA, Verstijnen CP, Gilis H, Hendriks JT. Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. *J Immunol Methods.* 1991 Jul 5;140 (2): 243-8.
93. Ide N, Hirase T, Nishimoto-Hazuku A, Ikeda Y, Node K. Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells. *Hypertens Res.* 2008 Jun; 31 (6): 1257-67.
94. Jakobs D. Charakterisierung von Gewebereaktionen auf Stents mit Cyclosporinbeladung in porcinen kultivierten Blutgefäßen. Diplomarbeit, 2004.
95. Jeremias A, Sylvia B, Bridges J, Kirtane AJ, Bigelow B, Pinto DS, Ho KK, Cohen DJ, Garcia LA, Cutlip DE, Carrozza JP Jr. Stent thrombosis after successful sirolimus-eluting stent implantation. *Circulation.* 2004 Apr 27; 109 (16): 1930-2. Epub 2004 Apr 12.
96. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 4; 48 (1): 193-202. Epub 2006 May 5.
97. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25; 268 (33): 24543-6.
98. Kaufman PB, Duke JA, Briemann H, Boik J, Hoyt JE. A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. *The Journal of alternative and complementary Medicine.* 1997; 3 (1), 7-12
99. Kaul S, Shah PK, Diamond GA. As time goes by: current status and future directions in the controversy over stenting. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50 (2): 128-37. Epub 2007 May 22.
100. Kim JK and Levin ER. Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nuclear Receptor Signaling.* 2006; 4: e013 1-5
101. Kirchner and Abbott. Update on the everolimus-eluting coronary stent system: results and implications from the SPIRITclinical trial program. *Vascular Health and Risk Management* 2009; 5: 1089–1097
102. Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia.* 2002; 40 (2): 175-83.
103. Koh KK, Mincemoyer R, Bui MN, Csako G, Pucino F, Guetta V, Waclawiw M, Cannon RO 3rd. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1997; 336 (10): 683-90.
104. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, Carlson GC, Farb A, Verma A, Virmani R. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol.* 1996; 148 (3): 969-76.
105. Kon V and Jabs K. Angiotensin in Atherosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13 (3): 291-297.
106. Kondo K, Suzuki Y, Ikeda Y, Umemura K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *Eur J Pharmacol.* 2002; 455 (1): 53-7.
107. Kruger NJ. The Bradford method for Protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994; 32: 9-15.

108. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998 Oct;139 (10): 4252-63.
109. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10 (5): 275-82.
110. Kyriakides ZS, Lymberopoulos E, Papalois A, Kyrzopoulos S, Dafnomili V, Sbarouni E, Kremastinos DTh. Estrogen decreases neointimal hyperplasia and improves re-endothelialization in pigs. *International Journal of Cardiology*. 2006; 113: 48-53
111. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-5.
112. Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, Lindbäck J, Nilsson T, Wallentin L; SCAAR Study Group. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med*. 2007 Mar 8; 356 (10): 1009-19. Epub 2007 Feb 12.
113. Levenson B. Positionspapier zum Einsatz von beschichteten Stents (DES) bei perperkutanen Koronarinterventionen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. *Z Kardiol*. 2003; 92: 606-612
114. Legette LL, Lee WH, Martin BR, Story JA, Arabshahi A, Barnes S, Weaver CM. Genistein, a phytoestrogen, improves total cholesterol, and Synergy, a prebiotic, improves calcium utilization, but there were no synergistic effects. *Menopause*. 2011; 18 (8): 923-31.
115. Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr*. 1998; 128 (10): 1589-92.
116. Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. 5. Auflage. 2002. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
117. Liu HW, Iwai M, Takeda-Matsubara Y, Wu L, Li JM, Okumura M, Cui TX, Horiuchi M. Effect of estrogen and AT1 receptor blocker on neointima formation. *Hypertension*. 2002; 40 (4): 451-7; discussion 448-50.
118. Liu J, Wu S, Wei H, Zhou K, Ruan Y, Lai W. Effects of sex hormones and their balance on the proliferation of rat vascular endothelial cells. *Horm Res*. 2002; 58 (1): 16-20.
119. Lucas AR, Korol R, Pepine CJ. Inflammation in Atherosclerosis. Some Thoughts About Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2006; 113: e728-e732
120. Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2007; 115 (8): 1051-8.
121. Luo H, Reidy MA. Activation of big mitogen-activated protein kinase-1 regulates smooth muscle cell replication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22 (3): 394-9.
122. Ma XL, Gao F, Nelson AH, Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, Barone FC. Oxidative inactivation of nitric oxide and endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneous hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Sep;298(3):879-85.
123. Mahmoudi M, Delhay C, Waksman R. Safety and efficacy of drug-eluting stents and bare metal stents in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Revasc Med*. 2011; 12 (6): 385-90. Epub 2011 Feb 16.
124. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 1997 Dec 31; 124 (3): 179-92.
125. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998; 83 (12): 1182-91.
126. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007; 62 (1): 77-86.

127. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72 (5 Suppl): 1307S-1315S.
128. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999; 340 (23): 1801-11.
129. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86: 279–367.
130. Meijering BD, van der Wouden EA, Pelgröm V, Henning RH, Sharma K, Deelman LE. TGF-beta inhibits Ang II-induced MAPK p44/42 signaling in vascular smooth muscle cells by Ang II type 1 receptor downregulation. *J Vasc Res.* 2009; 46 (5): 459-68. doi: 10.1159/000200961. Epub 2009 Feb 10.
131. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr.* 2003 May;133(5):1238-43.
132. Miller AP, Chen Y-F Xing D, Feng W, Oparil S. Hormone Replacement Therapy and Inflammation. *Interactions in Cardiovascular Disease. Hypertension.* 2003; 42 (part 2): 657-663.
133. Millonig G, Malcom GT, Wick G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis.* 2002; 160 (2): 441-8.
134. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Von der Zellkultur zum Tissue engineering. PABST SCIENCE PUBLISHERS. 2002.
135. Miyazaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF, Shiraishi H, Nomura T, Hattori Y, Iguchi A. 17β-Estradiol Antagonizes the Down-Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase and GTP Cyclohydrolase I by High Glucose: Relevance to Postmenopausal Diabetic Cardiovascular Disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2007; 320: 591-598.
136. Mohacsi PJ, Tüller D, Hulliger B, Wijngaard PL. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant.* 1997; 16 (5): 484-92.
137. Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993; 268: 7338-7345.
138. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, Falotico R; RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002; 346 (23): 1773-80.
139. Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, Stoll HP; REALITY Trial Investigators. Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006; 295 (8): 895-904.
140. Morris RE, Cao W, Huang X, Gregory CR, Billingham ME, Rowan R, Shorthouse RA. Rapamycin (Sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells. *Transplant Proc.* 1995; 27 (1): 430-1.
141. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE; SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003; 349 (14): 1315-23.

142. Moulias A, Alexopoulos D. Long-term outcome of percutaneous coronary intervention: the significance of native coronary artery disease progression. *Clin Cardiol.* 2011; 34 (10): 588-92. doi: 10.1002/clc.20929. Epub 2011 Sep 19.
143. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25; 268 (33): 24539-42.
144. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol.* 2007; 100 (8B): 36M-44M.
145. New G, Moses JW, Roubin GS, Leon MB, Colombo A, Iyer SS, Tio FO, Mehran R, Kipshidze N. Estrogen-Eluting, Phosphorylcholine-Coated Stent Implantation Is Associated With Reduced Neointimal Formation But No Delay in Vascular Repair in a Porcine Coronary Model. *Cathet Cardiovasc Intervent.* 2002; 57: 266-271
146. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005; 85 (1): 1-31.
147. Nickenig G, Bäumer AT, Grohè C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998; 97 (22): 2197-201.
148. Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a metaanalysis. *Eur Heart J* 2006; 27: 2784-814.
149. Odenlund M, Ekblad E, Nilsson BO. Stimulation of oestrogen receptor-expressing endothelial cells with oestrogen reduces proliferation of cocultured vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Mar; 35 (3): 245-8.
150. Ong AT, Serruys PW. Technology Insight: an overview of research in drug-eluting stents. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005; 2 (12): 647-58.
151. Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W, Martin DP, Degenkolbe I, Wahlers T, Stock UA. Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32 (2): 212-22.
152. Ormiston JA, Dixon SR, Webster MW, Ruygrok PN, Stewart JT, Minchington I, West T. Stent longitudinal flexibility: a comparison of 13 stent designs before and after balloon expansion. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2000; 50 (1): 120-4.
153. Ortmann J, Traupe T, Vetter W, Barton M. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular risk: role of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate. *Praxis (Bern 1994).* 2004; 93 (21): 904-14.
154. Palmerini T, Biondi-Zoccai G, Della Riva D, Stettler C, Sangiorgi D, D'Ascenzo F, Kimura T, Briguori C, Sabatè M, Kim HS, De Waha A, Kedhi E, Smits PC, Kaiser C, Sardella G, Marullo A, Kirtane AJ, Leon MB, Stone GW. Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *Lancet.* 2012; 379 (9824): 1393-402. Epub 2012 Mar 23.
155. Pan W, Ikeda K, Takebe M, Yamori Y. Genistein, daidzein and glycitein inhibit growth and DNA synthesis of aortic smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2001; 131 (4): 1154-8.
156. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi D, Jang Y, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med.* 2003; 348 (16): 1537-45.
157. Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85 (5): 2057-67.

158. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C; BASKET-LATE Investigators. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48 (12): 2584-91. Epub 2006 Nov 2.
159. Pham JP, Ueno M, Tello-Montoliu A, Ferreiro JL, Tomasello SD, Dharmashankar K, Kodali M, Seecheran N, Capodanno D, Desai B, Bass TA, Angiolillo DJ. Impact of gastric acid-suppressing therapies on platelet reactivity in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel: results of a pharmacodynamic study. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58 (13): 1396-8.
160. Pickar JH, Thorneycroft I, Whitehead M. Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: a review of randomized clinical trials, 1985 to 1995. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178 (5): 1087-99.
161. Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm.* 2000; 57 (2): 135-55.
162. Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Cuellas C, Gonzalo-Orden JM, Diego A, Regueiro M, Martínez-Fernández B, Altónaga JR, García-Marín JF, Fernández-Vázquez F. Preclinical Evaluation of Coronary Stents: Focus on Safety Issues. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012. [Epub ahead of print]
163. Prescott MF, Webb RL, Reidy MA. Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT1 receptor antagonist: effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol.* 1991; 139: 1291–1296
164. Prouty WF, Goldberg AL. Effects of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1972; 247 (10): 3341-52.
165. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jan 15;75(2):346-59. Epub 2007 Jul 7.
166. Rakugi H, Jacob HJ, Krieger JE, Ingelfinger JR, Pratt RE. Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. *Circulation.* 1993; 87: 283–290.
167. Rakugi H, Kim D-K, Krieger JE, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE. Induction of Angiotensin Converting Enzyme in the Neointima after Vascular Injury. Possible Role in Restenosis *J. Clin. Invest.* 1994: 339-346
168. Renz-Polster und Krautzig, *Basislehrbuch Innere Medizin.* Urban & Fischer (Elsevier), 2008: 63-75
169. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973; 180 (4093): 1332-9.
170. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340 (2): 115-26.
171. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* 1997; 26 (1): 63-70.
172. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000; 86 (12): 1266-72.
173. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5 (1): 73-9.
174. Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1986; 156 (2): 341-7.
175. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000; 101 (12): 1372-8.

176. Schnaper HW, McGuire J, Runyan C, Hubchak SC. Sex Steroids and the Endothelium. *Current Medical Chemistry*. 2000; 7: 519-531.
177. van der Schouw YT, de Kleijn MJ, Peeters PH, Grobbee DE. Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000; 10 (3): 154-67.
178. Selent C. Charakterisierung von Gewebereaktionen auf Stents mit Disulfirambeladung in porcinen, kultivierten Karotiden. Dissertation, 2005.
179. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*. 1994; 331 (8): 489-95.
180. Serruys PW, Daemen J. Are drug-eluting stents associated with a higher rate of late thrombosis than bare metal stents? Late stent thrombosis: a nuisance in both bare metal and drug-eluting stents. *Circulation*. 2007; 115 (11): 1433-9; discussion 1439. Epub 2007 Mar 7.
181. Sheiban I, Anselmino M, Moretti C, Biondi-Zoccai G, Galloni M, Vignolini C, Mattoni M, Sciuto F, Omedè P, Trevi GP. Effect of a novel drug-eluted balloon coated with genistein before stent implantation in porcine coronary arteries. *Clin Res Cardiol*. 2008 Dec;97(12):891-8. Epub 2008 Sep 5.
182. Shimokado K, Uwezawa K, Ogata J. Tyrosine Kinase Inhibitors Inhibit Multiple Steps of the Cell Cycle of Vascular Smooth Muscle Cells. *Experimental Cell Research*. 1995; 220: 266-273
183. Si H, Liu D. Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2008 Feb; 138 (2): 297-304.
184. Silber S, Hoffmeister HM, Bode C. Optimale Thrombozytenaggregationshemmung nach koronarer Stentimplantation. *Aktueller Stand. Herz*. 2008 Jun; 33 (4): 244-53.
185. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000 Sep 28; 407 (6803): 538-41.
186. Simoncini T, Fu X-D, Caruso A, Garibaldi S, Baldacci C, Giretti MS, Mannella P, Flamini MI, Sanchez AM Genazzani AR. Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. *Human Reproduction*. 2007; 22 (No.8): 2325-2334
187. Slavin L, Chhabra A, Tobis JM. Drug-Eluting Stents. Preventing Restenosis. *Cardiology in Review*. 2007; 15: 1-12
188. Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U, Pohl U. The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275 (25): 18745-50.
189. Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N. Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension*. 1998; 32 (1): 39-45.
190. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med*. 2007; 356 (10): 989-97. Epub 2007 Feb 12.
191. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res*. 2000 Jan 14; 45 (2): 454-62.
192. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*. 1991; 325 (11): 756-62.

193. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME; TAXUS-IV Investigators. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004; 350 (3): 221-31.
194. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME; TAXUS-IV Investigators. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation.* 2004; 109 (16): 1942-7. Epub 2004 Apr 12.
195. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DeVecchio V, Halks-Miller M, Rubanyi GM. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (9): 1498-505.
196. Suzuki A, Mizuno K, Ino Y, Okada M, Kikkawa F, Mizutani S, Tomoda Y. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res.* 1996; 32 (3): 516-23.
197. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Jun; 35 (6): 881-900.
198. Suzuki H, Eguchi K, Ohtsu H, Higuchi S, Dhobale S, Frank GD, Motley ED, Eguchi S. Activation of endothelial nitric oxide synthase by the angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology.* 2006 Dec; 147 (12): 5914-20. Epub 2006 Sep 15.
199. Tan E, Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. Estrogen receptor- α gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovascular Research.* 1999; 43: 788-797.
200. Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M, Horiuchi M. Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension.* 2002 Jan; 39 (1): 41-5.
201. Tedgui A. The role of inflammation in atherothrombosis: implications for clinical practice. *Vasc Med.* 2005 Feb; 10 (1): 45-53.
202. The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *Jama.* 1995; 273 (3): 199-208.
203. Tsang BK, Armstrong DT, Whitfield JF. Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 Dec; 51 (6): 1407-11.
204. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1992; 71: 620-630.
205. Tsuda M, Iwai M, Li J-M, Li H-S, Min L-J, Ide A, Okumura M, Suzuki J, Mogi M, Suzuki H, Horiuchi M. Inhibitory Effects of AT₁ Receptor Blocker, Olmesartan, and Estrogen on Atherosclerosis Via Anti-Oxidative Stress. *Hypertension.* 2005; 45: 545-551.
206. Tümmler C. Einfluss bioabbaubarer Magnesiumstents auf die Vitalität und Proliferation isolierter, porciner Primärzellen und auf die Zellen des Gewebeverbandes kultivierter, porciner Arterien. Diplomarbeit, 2006.
207. Umezawa, H. Struktur und Aktivität mikrobieller Protease-Inhibitoren. *Methods Enzymol.* 1976; 45 (Part B): 678-695.
208. Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Mickle DA. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Dec; 126 (6): 1886-91.
209. Di Virgilio F, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb; 135 (4): 831-42.

210. Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2006 Jun; 4 (6):1186-93.
211. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikaar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 1991 Oct 24; 325 (17): 1196-204.
212. Wang J, Fan J, Laschinger C, Arora PD, Kapus A, Seth A, McCulloch CA. Smooth muscle actin determines mechanical force-induced p38 activation. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25; 280 (8): 7273-84. Epub 2004 Dec 9.
213. Wang Y, Andrews M, Yang Y, Lang S, Jin JW, Cameron-Vendrig A, Zhu G, Rehemian A, Ni H. Platelets in Thrombosis and Hemostasis: Old Topic with New Mechanisms. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2012 Dec; 12 (2): 126-32.
214. Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb; 73 (2): 225-31.
215. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22 (7): 361-8. Review. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci* 2001; (11): 596.
216. Weissman NJ, Ellis SG, Grube E, Dawkins KD, Greenberg JD, Mann T, Cannon LA, Cambier PA, Fernandez S, Mintz GS, Mandinov L, Koglin J, Stone GW. Effect of the polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS Express stent on vascular tissue responses: a volumetric intravascular ultrasound integrated analysis from the TAXUS IV, V, and VI trials. *Eur Heart J.* 2007 Jul; 28 (13): 1574-82. Epub 2007 May 31.
217. Weisz G, Leon MB, Holmes DR Jr, Kereiakes DJ, Clark MR, Cohen BM, Ellis SG, Coleman P, Hill C, Shi C, Cutlip DE, Kuntz RE, Moses JW. Two-year outcomes after sirolimus-eluting stent implantation: results from the Sirolimus-Eluting Stent in de Novo Native Coronary Lesions (SIRIUS) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Apr 4;47(7):1350-5. Epub 2006 Mar 20.
218. Welsch. *Lehrbuch Histologie*, 2. Auflage. 2006; Kapitel 5.1: 236-252.
219. Welt FGP, Tso C, Edelmann ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, Rogers C. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vascular Medicine.* 2003; 8: 1-7
220. Welt FGP; Rogers C. Inflammation and Restenosis in the Stent Era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1769-1776
221. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest.* 1997; 100 (5): 1047-58.
222. Wood CE, Appt SE, Clarkson TB, Franke AA, Lees CJ, Doerge DR, Cline JM. Effects of high-dose soy isoflavones and equol on reproductive tissues in female cynomolgus monkeys. *Biol Reprod.* 2006; 75 (3): 477-86. Epub 2006 May 24.
223. Wu Z, Zheng W, Sandberg K. Estrogen regulates adrenal angiotensin type 1 receptors by modulating adrenal angiotensin levels. *Endocrinology.* 2003 Apr; 144(4): 1350-6.
224. Xiang Q, Lin G, Xu J, Zheng S, Chen S, Zhou K, Wang T. The role of caveolin1 and sprouty1 in genistein's regulation of vascular smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Eur J Pharmacol.* 2010; 648 (1-3): 153-61. Epub 2010 Sep 7.
225. Xu J-W, Ikeda K, Yamori Y. Genistein Inhibits Expressions of NADPH Oxidase p22phox and Angiotensin II Type 1 Receptor in Aortic Endothelial Cells from Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res.* 2004; 27: 675-683.

226. Yu JY, Lee JJ, Lim Y, Kim TJ, Jin YR, Sheen YY, Yun YP. Genistein inhibits rat aortic smooth muscle cell proliferation through the induction of p27kip1. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107 (1): 90-8.

10. Anhang**I. Material**

Tabelle I: Material	
Material	Hersteller / Lieferant
96er Multiwellplatten	Greiner
12er Wellplatten	Greiner
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner
Cryoröhrchen	Greiner
sterile Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Greiner
sterile Spitzen (5 ml, 1 ml, 100 µl, 10 µl)	Greiner
sterile Combitips	Eppendorf
Permanentkulturen: A7r5 und BFA	ECACC
Primärzellen HCASMC und HCAEC	Promocell
Silikonschläuche (steril)	Minucells and Minutissue
Deckel mit Schlauchverbindung	Minucells and Minutissue
Vorratsflasche (steril) 500 ml	Schott
Abfallflasche (steril) 500 ml	Schott
Pipetten (steril) 25 ml	Greiner
Wärmeabdeckung	IBMT Rostock
12er Wellplatte	Greiner
Kanülen	Greiner
PVDF-Membran	ROTH
Millicell Cell Culture Plate Assemblies	Millipore
Gel-Blotting-Papier	ROTH
Röntgenfilm (Medical X-Ray Film HT1.000G Plus)	Agfa
Latexhandschuhe	ROTH
Objektträger	Histoband Adhäsion Marienfeld
Deckgläschen 24 x 40 mm	Menzel
Färbeschalen	Roth
transparente Folie	
Frischhaltefolie & Gefrierbeutel	
steriles Filterpapier	
steriles Leinentuch	
ophtalonische Schere	
Präparierunterlage	
Becherglas (steril) 400 ml	
OP-Handschuhe (steril)	
Präparierbesteck (steril)	
Präparierunterlage (steril)	
Färbeschälchen	
Maßkolben	
Glastrichter	
Papierfilter	

II. Geräte

Tabelle II: Geräte		
Gerät	Spezifikation	Hersteller
Pipetten	5 ml, 1 ml, 100 µl, 10 µl; automatisch	Eppendorf
Multipipette	Multipipette® plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus® - akku	HIRSCHMANN LABORGERÄTE
Zählkammer	Bürker-Assistent-Zählkammer; 0,1 mm Tiefe	Glaswarenfabrik Hecht
Zentrifuge	Labofuge 400	Heraeus
Kühlzentrifuge	Biofuge fico R	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Mikroskop	TH4-200	Olympus
Digitalkamera	C-5050	Olympus
ELISA-Reader	2010	anthos
Peristaltikpumpe	IPC	Ismatec
Mikrowelle	NN-T259W	Panasonic
Kritisch-Punkt-Trockner	Polaron Range CPD7501	VG Microtech
Sputter Coater	Agar Sputter Coater (manuell)	Plano GmbH
Fluoreszenzmikroskop	FluoView 1000	Olympus
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 ESEM	Phillips
Gelelektrophorese-Apparatur	45-1614-i	peqLab
Stromversorgungsgerät für Elektrophorese	High Voltage Power Pack P 30	Biometra
Stromversorgungsgerät für Blot	E 831	CONSORT
Blotting-Apparatur	Fastblot B44	Biometra
pH-Meter	wtw	inoLab
Sonotrode	SONOPULS	BANDELIN
Waage	SBA 53	SCALTEC
Taumeltisch	WT17	Biometra
Brutschrank		Heraeus
Sterilbank		BDK
Heizplatte		Leica
Wärmeschrank (56°C, 70°C)		Heraeus
Folienschweißgerät		Severin
Filmkassette		

III. Chemikalien

Tabelle III: Chemikalien	
Substanz	Hersteller / Lieferant
Aceton	AppliChem
Acrylamid	AppliChem
AEBSF-Hydrochlorid	AppliChem
Aluminiumsulfat	AppliChem
6-Aminohexansäure	MERCK Schuchard
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	ROTH
Amphotericin	PAA
Angiotensin II	Sigma
Anilinblau	Fluka
Aquateq	
Ascorbinsäure	Sigma
Azokarmin G	Fluka
bFGF	Sigma
Bromphenolblau	ROTH
Collagen S, Typ I; 3 mg/ml	Roche
Collagenase A	Roche
Coomassie Blue G 250	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Diff-Quick-Kit	Polysciences, Inc.
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	VEB Laborchemie Apolda
DMEM Pulvermedium (inkl. 4,5 g/l D+Glucose, L-Glutamin und Na-Pyruvat)	AppliChem
DMEM-Pulvermedium ohne Phenolrot (4,5 g/l D+Glucose, L-Glutamin und Na-Pyruvat)	AppliChem
Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium	AppliChem
EDTA	ROTH
Eisessig	AppliChem
Entwickler (Polymax RT Developer/Replenisher)	Kodak
Eosin G	ROTH
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	AppliChem
FCS	Biochrom
Fixierer (Fixer)	Kodak
Gentamycin	PAA
Glutardialdehyd 25 %	Merck
Glycerin	AppliChem
Glycin	ICN Biomedicals
Ham's F12-Pulvermedium	Biochrom
HEPES	AppliChem
Hydrocortison	Sigma
Insulin	Sigma
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	AppliChem
Kernechtrot	Chroma
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem
Ly294002	Sigma
Lysepuffer (Cell Lysis Buffer)	Cell Signaling Technology®
Mercaptoethanol	AppliChem

Anhang

Substanz	Hersteller / Lieferant
Methanol (CH ₃ OH)	AppliChem
Natriumcacodylat (Cacodylsäure-Na-Salz-Trihydrat)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O)	ROTH
Natriumhydrogencarbonat (NAHCO ₃)	AppliChem
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Orange G	Fluka
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pertex	medite
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	ROTH
Ponceau-S-Pulver	AppliChem
Resorcin-Fuchsin (nach Weigert)	Chroma
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem
Salzsäure (HCL)	AppliChem
SDS	AppliChem
saures Hämalun nach Mayer	Merck
TEMED	ROTH
Trichloressigsäure	AppliChem
Tris	ROTH
Trypanblau	AppliChem
Tween 20	SERVA
VEGF	Sigma
Wolframatophosphorsäure (Phosphorwolframsäurehydrat)	Fluka
Xylol	ROTH

IV. Zellkulturmedien

Tabelle IV: DMEM-Medium (A7r5, ppSMC, ppEC)		
Substanz	Menge	Endkonzentration
DMEM-Pulvermedium (AppliChem; inkl. 4,5 g/l D+Glucose, L-Glutamin und Na-Pyruvat)	13,5 g	13,5 mg/ml
NaHCO ₃	3,7 g	45 mM
HEPES	5,96	25 mM
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,4 → sterilfiltrieren		

Tabelle V: DMEM-Medium ohne Phenolrot (MTS-Test)		
Substanz	Menge	Endkonzentration
DMEM-Pulvermedium ohne Phenolrot (AppliChem; inkl. 4,5 g/l D+Glucose, L-Glutamin und Na-Pyruvat)	13,49 g	13,49 mg/ml
NaHCO ₃	0,85 g	10 mM
HEPES	5,96 g	25 mM
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,4 → sterilfiltrieren		

Anhang

Tabelle VI: Ham's F12-Medium (BFA)

Substanz	Menge	Endkonzentration
Ham's F12-Pulvermedium (Biochrom)	10,7 g	10,7 mg/ml
NaHCO ₃	2,352 g	28 mM
HEPES	5,96 g	25 mM
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,4 → sterilfiltrieren		

Tabelle VII: MTS-Medium

DMEM-Medium ohne Phenolrot (inkl. 10 % (v/v) FCS)	80 % (v/v)
MTS-Reagenz (Promega; angesetzt nach Herstellerangaben)	20 % (v/v)

Tabelle VIII: Kardiomedium für die Perfusion

Substanz	Endkonzentration
DMEM-Pulvermedium (AppliChem; inkl. 4,5 g/l D+Glucose, L-Glutamin und Na-Pyruvat)	13,5 mg/ml
NaHCO ₃	2,4 mM
Ascorbinsäure	5,7 mM
HEPES	25 mM
Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/ml
Amphotericin	2,7 mM
Hydrocortison	0,00137 mM
Insulin	0,86 mM
VEGF	0,0005 mg/ml
bFGF	0,01 mg/ml
FCS	2 % (v/v)
Gentamycin	0,1 mg/ml
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,4 → sterilfiltrieren	

V. Puffer

Tabelle IX: Anodenpuffer I (Westernblot)

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris	36,3 g	0,3 M
Methanol	200 ml	20 %
Aqua dest.	ad 1000 ml	
pH 10,4		

Tabelle X: Anodenpuffer II (Westernblot)

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris	6,04 g	25mM
Methanol	400 ml	20 %
Aqua dest.	ad 2000 ml	
pH 10,4		

Anhang

Tabelle XI: 1 x Elektrodenpuffer (Laufpuffer SDS-PAGE)

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris	3,03 g	0,025 M
Glycin	14,1 g	0,192 M
SDS	1,0 g	0,1 %
Aqua dest.	ad 1000 ml	
pH 8,3		

Tabelle XII: Kathodenpuffer (Westernblot)

Substanz	Menge	Endkonzentration
6 – Amino-hexansäure	5,24 g	40 mM
SDS	0,1 g	0,01 %
Methanol	200 ml	20 %
Aqua dest.	ad 1000 ml	
pH 9,4		

Tabelle XIII: Natrium-Phosphat-Puffer (REM-Entwässerung)

Substanz	Menge	Endkonzentration
Lösung I		
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	15,602 g	0,1 M
Aqua dest.	ad 1000 ml	
Lösung II		
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	17,896 g	0,1 M
Aqua dest.	ad 1000 ml	
Lösung I und II wurden im Verhältnis 1:3,3 miteinander gemischt.		

Tabelle XIV: 10 x PBS (Zell- und Gewebekultur und Westernblot)

Substanz	Menge	Endkonzentration
NaCl	80 g	1,37 M
KCl	2 g	0,027 M
KH ₂ PO ₄	2 g	0,015 M
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	11,5 g	0,072 M
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,4		

Tabelle XV: 3 x Probenpuffer (Protein)

Substanz	Menge	Endkonzentration
SDS (10 %)	30,0 ml	6 %
Glycerin	16,5 ml	30 %
EDTA (0,5 M, pH 8)	1,5 ml	15 mM
Tris (5 M, pH 6,8)	1,875 ml	187,5 mM
Aqua dest.	0,125 ml	—
Bromphenolblau	eine kleine Spatelspitze	
5 % β-Mercaptoethanol (erst kurz vor Gebrauch hinzufügen)		10 %

Anhang

Tabelle XVI: 1 x TBS (Immunhistochemie)		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris	6,05 g	50 mM
NaCl	8,76 g	150 mM
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,5 einstellen (HCl)		
TBS bei 4°C stabil für 3 Monate		

VI. Farblösungen

Tabelle XVII: Anilinblau-Orange-Gemisch		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Anilinblau	0,5 g	0,5 % (w/v)
Orange G	2 g	2 % (w/v)
A.dest.	100 ml	
Eisessig	8 ml	8 % (v/v)
Anilinblau und Orange G wurden in Aqua dest. gelöst, dazu Eisessig gegeben, kurz aufgekocht und nach dem Erkalten filtriert.		

Tabelle XIX: Azokarminlösung		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Azokarmin G	0,1 g	0,1 % (w/v)
A.dest.	100 ml	
Eisessig	1 ml	1 % (v/v)
Azokarmin G wurde in A. dest. aufgeschwemmt, kurz aufgekocht und durch ein nicht gehärtetes Filter abfiltriert. Dann wurden zu je 100 ml Filtrat 1 ml Eisessig gegeben.		

Tabelle XIX: Eosin		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Eosin	1 g	1 % (w/v)
A.dest.	100 ml	
Nach Lösen des Eosins in Aqua .dest. wurde die Färbelösung mit 5 Tropfen Eisessig versetzt.		

Tabelle XX: Kernechtrot		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Kernechtrot	0,1 g	0,1 % (w/v)
Aluminiumsulfat-Lösung 5 % (w/v)	100 ml	
In 100 ml einer kochenden 5%igen Aluminiumsulfatlösung wurden 0,1 g Kernechtrot gelöst. Nach dem Erkalten wurde diese Farbstofflösung filtriert.		

Tabelle XXI: Ponceau-S-Lösung		
Substanz	Menge	Endkonzentration
0,2 % Ponceau-S-Pulver	1 g	0,2 % (w/v)
3 % Trichloressigsäure	15 ml	0,09 %
Aqua dest.	ad 500 ml	

Anhang

Tabelle XXII: Resorcin-Fuchsin-Salzsäurealkohol		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Resorcin-Fuchsin	0,5 g	0,5 % (w/v)
Ethanol 100 %	70 ml	70 % (v/v)
Aqua dest.	27 ml	
Salzsäure 25 %	3 ml	0,75 % (v/v)

Resorcin-Fuchsin wurde in 10 ml 100 % Ethanol siedend heiß im Wasserbad gelöst. Dazu wurden 60 ml 100 % Ethanol und 27 ml Aqua dest. gegeben. Nachdem diese Lösung abgekühlt war, wurde sie filtriert und zu dem Filtrat 3 ml der 25%igen Salzsäure gegeben. Diese Lösung musste im Kühlschrank aufbewahrt werden, weil sie nur begrenzt haltbar war.

VII. Sonstige Lösungen

Tabelle XXIII: BRADFORD-Reagenz 5x (Proteinbestimmung)	
Substanz	Menge
Coomassie Blue G 250 (Biorad)	100 mg
Ethanol 95 %	50 ml
H ₃ PO ₄ konz.	100 ml
Aqua dest.	ad 200 ml

Tabelle XXIV: Collagenlösung (Beschichtung Migrationseinsätze)		
Substanz	Menge	Endkonzentration
Collagen S, Typ I; 3 mg/ml	625 µl	0,75 mg/ml
Ethanol 70 %	1,875 ml	

Tabelle XXV: ECL-Solution A	
Substanz	Menge
Tris-HCl (0,1 M)	200 ml
Luminol (Sigma A4685)	50 mg
Lagerung im Kühlschrank	

Tabelle XXVI: ECL-Solution B	
Substanz	Menge
para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008)	11 mg
DMSO	10 ml
Lagerung dunkel bei Raumtemperatur	

Tabelle XXVII: ECL-Gebrauchslösung für die Detektion	
Substanz	Menge
Solution A	4 ml
H ₂ O ₂ (30 %)	1,2 µl
Solution B	400 µl

Anhang

Tabelle XXIIIX: Fixierlösung (Gewebekultur, REM)

Substanz	Menge	Endkonzentration
6,25 % Glutaraldehyd	20 ml	1,5625 % (v/v)
1 x PBS	20 ml	25 % (v/v)
Natriumcacodylat (0,2 M Stammlösung)	40 ml	0,1 M

Tabelle XXIX: Trenngel (SDS-PAGE)

Substanz	12 %
Aqua dest.	9,9 ml
30 % (v/v) Acrylamid/Bis-29:1	12,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	7,5 ml
10 % SDS	300 µl
10 % APS (0,4 g/ml)	300 µl
TEMED (ROTH)	12 µl

Tabelle XXX: Sammelgel (SDS-PAGE)

Substanz	5 %
Aqua dest.	6,8 ml
30 % (v/v) Acrylamid/Bis-29:1	1,7 ml
1,5 M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS (0,4g/ml)	100 µl
TEMED	10 µl

VIII. Bekannte Drug-Eluting Stents

Zu den „First Generation DES“ gehören der Sirolimus-Eluting Stent (SES; Cypher®; Cordis Corporation, Miami Lakes, FL, USA) und der Paclitaxel-Eluting Stent (PES; Taxus®; Boston Scientific Corporation, Maple Grove, MN, USA; NAKAZAWA et al.; 2007).

Bei Sirolimus (Rapamycin) handelt es sich um ein makrozyklisches Lacton, welches die SMC-Proliferation und –Migration, bekannt als zentrale Mechanismen der Neointimabildung und Restenose, inhibiert. Sirolimus interferiert mit Zellzyklusregulatoren und bindet an FK-Binding Protein 12. Ein Target von Sirolimus ist der Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway, welcher in die Inhibierung der Regulation der Tissue Factor Expression in Endothelzellen und Monozyten involviert ist. Es wird die Thrombin und Tumor Necrosis Factor- α induzierte Endothelial Tissue Factor Expression und Aktivität induziert.

Bei dem Sirolimus-Eluting Stent werden ca. 80 % des Wirkstoffes in den ersten 30 Tagen freigesetzt.

Bei Paclitaxel handelt es sich um ein lipophiles Diterpenoid, welches an die β -Untereinheit des Tubulin-Heterodimers bindet und somit die Tubulin-Polymerisation, Zellzyklus-Arrest und Inhibierung von SMC-Migration und Proliferation induziert. Zudem erfolgt die Aktivierung von c-Jun NH₂-Terminal Kinase, ein wichtiger Mediator der Endothelialen und Monozyten Tissue Factor Induktion. Paclitaxel verstärkt ebenso die Tissue Factor Expression und Aktivität in Endothelzellen.

Der Paclitaxel-Eluting Stent zeichnet sich durch eine biphasische Wirkstofffreisetzung aus. Nach einer initialen hochkonzentrierten Freisetzung des Medikaments innerhalb von 48 h nach der Implantation, erfolgt eine anhaltende Freisetzung einer geringen Wirkstoffkonzentration (LÜSCHER et al., 2007).

Beide DES zeigten eine signifikante Reduktion der Restenoserate im Vergleich zu BMS und wurden so sehr schnell Standardbehandlung bei PCI und somit der symptomatischen Behandlung der Koronaren Herzkrankheit. Aber es wurden deutlich höhere in-Stent Thromboserate mehr als 30 Tage nach der Implantation dieser DES als bei der Verwendung eines BMS beobachtet (NAKAZAWA et al.; 2007). In pathologischen Studien von Patienten, die an dieser sog. Late Stent Thrombose (LST) verstorben sind, wurde festgestellt, dass in allen Fällen eine verzögerte arterielle Heilungsreaktion, begleitet durch eine persistierende Fibrindepositionierung und nur geringe Endothelialisierung, zu verzeichnen war (NAKAZAWA et al.; 2007; JONER et al., 2006).

Zu den „Second Generation DES“ werden der Everolimus-Eluting Stent (EES; Xience V®, Abbot Vascular, Santa Clara, CA, USA) und der Zotarolimus-Eluting Stent (ZES; Endeavor®, Medtronic Vascular, Santa Rosa, CA, USA; BYRNE et al., 2009) gezählt.

Bei dem Everolimus-Eluting Stent handelt es sich um ein Implantat aus einer Kobalt-Chrom Legierung (MULTI-LINK VISION) mit einer nichtabbaubaren Polymerbeschichtung

bestehend zum einen aus Poly (n-Butyl Methacrylat) (PBMA), welches am Stent adhärert und zum anderen aus Vinylidene Fluorid und Hexafluorpropylen Monomeren, in die das Pharmakon Everolimus inkorporiert wurde, einem semi-synthetischem Derivat von Sirolimus (KIRCHNER und ABBOTT, 2009; ALAZZONI et al., 2011). Everolimus, ein Macrolid Immunsuppressivum, wirkt inhibierend auf die Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation verschiedener Zelltypen, einschließlich vaskulärer glatter Muskelzellen. Auf molekularer Ebene bildet dieses Medikament einen Komplex mit dem zytoplasmatischen Protein FKBP-12 (FK 506 Binding Protein). Dieser Komplex bindet und interferiert mit FRAP (FKBP-12 Rapamycin Associated Protein) auch bekannt als mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) was zur Inhibierung des Zellmetabolismus, Wachstum und Proliferation durch den Zellzyklusarrest in der G1 Phase führt. Everolimus ist stark lipophil, was eine potente und schnelle Aufnahme des Wirkstoffes in das Gewebe gewährleistet. Das Copolymer gewährleistet eine kontrollierte Freisetzung von Everolimus, wobei 80 % des Wirkstoffes innerhalb des ersten Monats nach Implantation freigesetzt werden, die im DES verbleibenden 20 % innerhalb von 4 Monaten (KIRCHNER und ABBOTT, 2009)

Zotarolimus ist ein künstlich synthetisiertes Sirolimusanalogon, welches sich aber durch eine stärkere Lipophilität auszeichnet. Die biologischen Effekte zur Inhibierung der SMC-Proliferation erfolgen, vergleichbar wie für Sirolimus und Everolimus, über die Komplexbildung mit FK 506-Binding Protein 12, wodurch die Zellzyklusprogression blockiert wird. Zudem wird für Zotarolimus eine Suppression der Lymphozyten-vermittelten inflammatorischen Reaktion beschrieben. Der Zotarolimus-Eluting Stent wurde mit dem Polymer Phosphorylcholin beschichtet, in dem der Wirkstoff inkorporiert wurde (LÜSCHER et al., 2007).

Die Verwendung von DES bewirkt eine signifikant geringere Neigung zu restenotischen Gefäßverschlüssen und somit geringere Restenoseraten im Vergleich zum Einsatz von Metallstents (BMS). Dadurch wurde bei diesen Patientengruppen auch eine geringere Notwendigkeit einer Wiederbehandlung in Form weiterer koronarer Interventionen oder Bypass-Operationen beschrieben (MORICE et al., 2002; MAHMOUDI et al., 2011; DI LORENZO et al., 2009; HAN et al., 2009).

Die „Second Generation Stents“ weisen zudem eine geringere Thrombogenität bei vergleichbarer Effizienz in der Reduktion der Neointimalen Hyperplasie als die „First Generation Stents“ auf (PALMERINI et al., 2012).

Aber es ist auch eine hohe Morbidität und Mortalität mit dem Einsatz von DES assoziiert, insbesondere durch das Risiko einer in-Stent-Thrombose (JEREMIAS et al., 2004; DAEMEN et al., 2007).

IX. Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Zelllinien BFA und A7r5

In Abb. I ist der Einfluss der Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der vaskulären Endothelzelllinie BFA nach 48 h in Bezug zur arretierten und restimulierten Kontrolle NC3 dargestellt.

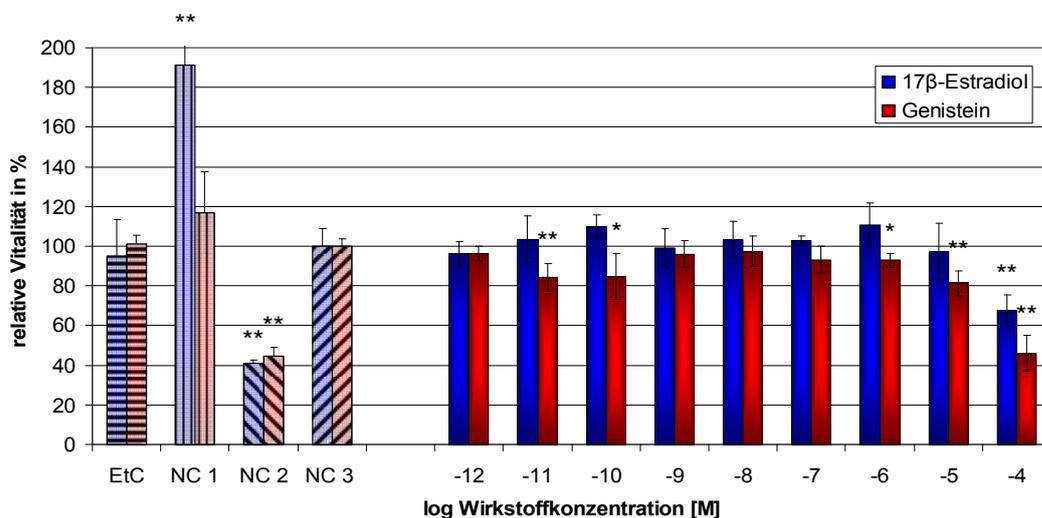


Abb. I: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der Zelllinie BFA relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: Ham's F 12 + 20 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (Ham's F 12 + 0 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Im direkten Vergleich beeinflusste der Wirkstoff Genistein die Vitalität der Zelllinie BFA stärker als 17 β -Estradiol. Bei einer Konzentration von 10^{-4} M war für beide Pharmaka eine Vitalitätshemmung zu verzeichnen. Dabei bewirkte Genistein eine Vitalitätsreduktion im Mittel um 51 %, 17 β -Estradiol um 33 % im Vergleich zur Bezugskontrolle NC3. Diese Reaktion ist auf zytotoxische Eigenschaften der Wirkstoffe bei hohen Konzentrationen zurückzuführen. In allen weiteren getesteten Konzentrationsbereichen nahm 17 β -Estradiol keinen Einfluss auf das Vitalitätsverhalten der endothelialen Zelllinie BFA, Genistein hingegen bewirkte auch bei Konzentrationen von 10^{-5} - 10^{-6} M sowie in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-11} M eine Vitalitätsreduktion um ca. 5-20 %.

Aus der Lösungsmittelkontrolle EtC mit der höchsten wirkstoffrelevanten Konzentration von 0,1 % Ethanol (v/v; 17 β -Estradiol-Testung) bzw. 0,2 % Ethanol (v/v; Genistein-Testung) konnte kein Einfluss auf die Vitalität der Zelllinie BFA abgeleitet werden.

Die Zellen der Kontrolle NC1, die während des gesamten Versuchszeitraums mit unverändertem Kulturmedium mit vollem Serumgehalt (20 % v/v) versorgt wurden, zeigten

durch den ausreichenden Nährstoffgehalt eine höhere Vitalität als die Bezugskontrolle. Die durchgehend arretierte Kontrolle NC2 wies hingegen eine deutlich geringere Vitalität als Folge des Serummangels auf. Alle Kontrollen entsprachen somit den Erwartungen.

Der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die vaskuläre Endothelzelllinie BFA hinsichtlich Proliferation in Bezug zur Negativkontrolle NC3 ist in Abb. II dargestellt.

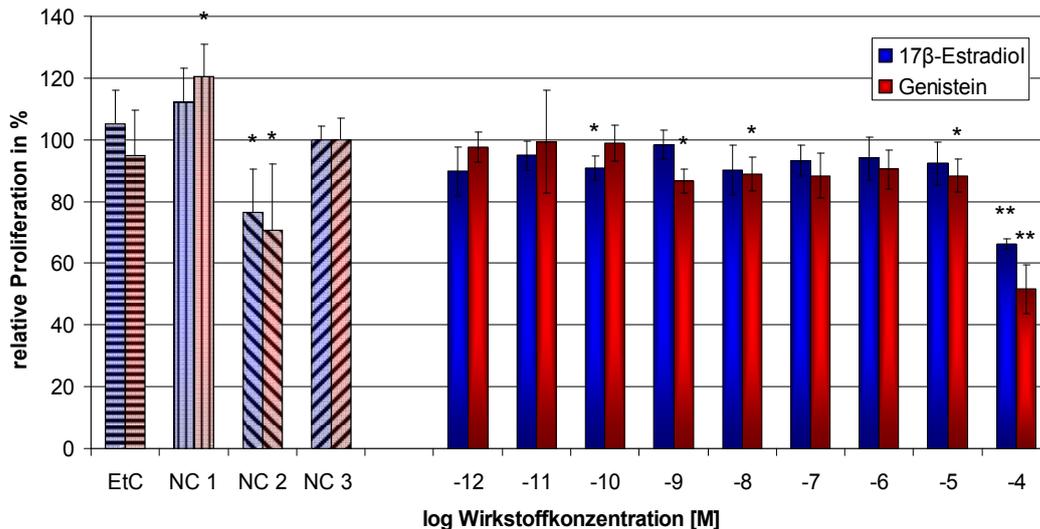


Abb II: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der Zelllinie BFA relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: Ham's F 12 + 20 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (Ham's F 12 + 0 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: EGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Wie schon in den zuvor gezeigten Vitalitätsuntersuchungen wies das Pharmakon Genistein einen stärkeren Einfluss auf das Proliferationsverhalten der vaskulären endothelialen Zelllinie BFA auf als 17 β -Estradiol. Für beide Wirkstoffe wurde eine Proliferationshemmung bei einer Konzentration von 10^{-4} M nachgewiesen. Die Zellteilung wurde durch 17 β -Estradiol im Mittel um 34 %, durch Genistein um 48 % signifikant reduziert. Für den Wirkstoff 17 β -Estradiol wurde zudem bei einer Konzentration von 10^{-10} M eine geringe Proliferationshemmung im Mittel um 9 % gezeigt, Genistein erwies sich zusätzlich bei 10^{-5} M und 10^{-8} - 10^{-9} M Wirkstoffkonzentration als leicht proliferationshemmend und reduzierte die Zellteilungsrate der Zelllinie BFA signifikant um 11-13 %.

Abb. III zeigt den Einfluss der Wirkstoffe 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der vaskulären glatten Muskelzelllinie A7r5 in Bezug zur arretierten und restimulierten Negativkontrolle NC3.

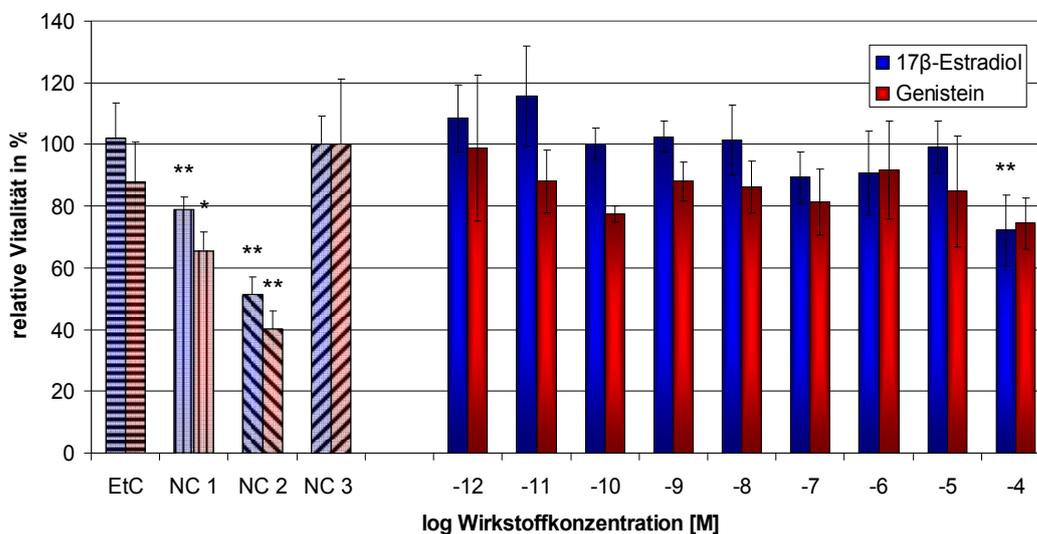


Abb. III: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Vitalität der Zelllinie A7r5 relative Vitalität in Bezug zu NC3; Test zur Vitalitätsbestimmung: MTS (Promega) bei $\lambda=492$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Die vergleichenden Vitalitätsuntersuchungen der vaskulären glatten Muskelzelllinie A7r5 nach 17 β -Estradiol- und Genistein-Einfluss zeigten nur geringe Unterschiede beider Pharmaka. Es konnte lediglich für den Wirkstoff 17 β -Estradiol bei einer Konzentration von 10^{-4} M eine signifikante Vitalitätshemmung im Mittel um 28 % nachgewiesen werden. In allen weiteren Konzentrationsbereichen bewirkten sowohl 17 β -Estradiol als auch Genistein keinen Einfluss auf die Vitalität der Zelllinie A7r5.

Die nicht arretierte Kontrolle NC1 zeigte im Rahmen dieser Untersuchungen eine signifikante Vitalitätsreduktion. Zu erwarten wäre eine deutlich höhere Vitalität als in den anderen Versuchsansätzen. Die mikroskopischen Beobachtungen ließen aber darauf schließen, dass die Zellzahl in den Wells der Kontrolle NC1 zu hoch war und durch Kontaktinhibition die Zellen der Zelllinie A7r5 mit einer Vitalitätsreduktion reagierten. Die Zellzahl musste in diesem Versuchsaufbau jedoch so hoch gewählt werden, da durch die Arretierung der anderen Kontroll- und Versuchsansätze eine Vermehrung der Zellen in den Wells deutlich geringer war als in denen der Kontrolle NC1 und der MTS- bzw. der BrdU-Test keine eindeutigen Ergebnisse geliefert hätte.

Der Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der vaskulären Zelllinie A7r5 ist in Abb. IV dargestellt.

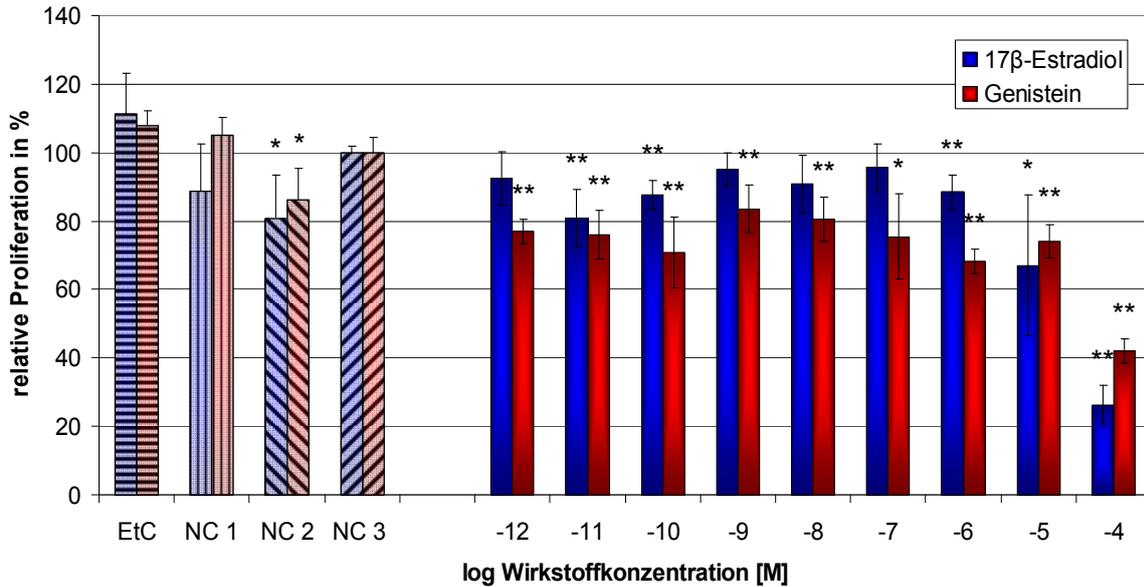


Abb. IV: Einfluss von 17 β -Estradiol und Genistein auf die Proliferation der Zelllinie A7r5 relative Proliferation in Bezug zu NC3; Test zur Proliferationsbestimmung: BrdU (Roche) bei $\lambda=450$ nm; Lösungsmittel des Wirkstoffes: Ethanol; Zellzahl: 3×10^4 Zellen/ml; n=4; Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.; 48 h Arretierung (DMEM + 2 % FCS + 100 μ g/ml Pen./Strep.); Wachstumsfaktor: PDGF (25 ng/ml; außer bei NC1 und NC2); NC1: unbehandelte Negativkontrolle; NC2: arretierte Negativkontrolle; NC3: arretierte und restimulierte Negativkontrolle; EtC: Ethanolkontrolle (0,1 % EtOH bei 17 β -Estradiol-Testung, 0,2 % EtOH bei Genistein-Testung); Messung des Wirkstoffeinflusses nach 48 h; * = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,05$); ** = Werte statistisch signifikant verschieden zu NC3 ($p \leq 0,01$)

Die Proliferation der Zelllinie A7r5 wurde nach 48 h durch beide Wirkstoffe signifikant beeinflusst. Das Pharmakon 17 β -Estradiol reduzierte die Proliferation bei einer Konzentration von 10^{-4} M im Mittel um 74 % und bei 10^{-5} M um 33 %. Zudem wurde für die 17 β -Estradiol-Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-10} - 10^{-11} M eine signifikante Proliferationshemmung um 11-19 % nachgewiesen.

Nach 48 h Genistein-Behandlung konnte die Proliferation der glatten Muskelzelllinie A7r5 bei einer Konzentration von 10^{-4} M im Mittel um 58 %, von 10^{-5} - 10^{-12} M um 17-32 % reduziert werden. Für den Wirkstoff Genistein wurde somit ebenso die in der Literatur beschriebene Proliferationshemmung gezeigt, jedoch genauso wie für das Pharmakon 17 β -Estradiol nicht in der beschriebenen Wirkintensität.

Für beide Wirkstoffe war die Proliferationshemmung bei einer Konzentration von 10^{-4} M am stärksten, was aber, genau wie für die Endothelzelllinie BFA auf die Zytotoxizität der Wirkstoffe in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen ist.

Die Kontrolle NC1 wies in diesem Versuchsansatz ebenso nicht die zu erwartende erhöhte Proliferation auf, da im Laufe der Versuchsdauer wie in der Vitalitätstestung die Zellzahl in den Wells zu hoch und durch Kontaktinhibition ein weiteres Zellwachstum reduziert wurde.

Publikationen

„Transforming growth factor β “ im Prostatakarzinom. Stope MB, Rönna C, Schubert T, **Staar D**, Bradl J, Ziegler P, Streitbörgger A, Kroeger N, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M, Börggermann C. Urologe A. 2012 Nov 18. [Epub ahead of print]

Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. Stope MB, Schubert T, **Staar D**, Rönna C, Streitbörgger A, Kroeger N, Kubisch C, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. World J Urol. 2012 Jun;30(3):327-31. Epub 2012 Feb 24.