Deutsches Herzzentrum München, Klinik an der Technischen Universität München (Ärztl. Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig) und Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher)

Charakterisierung der Wirksamkeit und der molekularen Wirkmechanismen zellzyklusinhibierender Therapiestrategien zur Prävention der Neointimahyperplasie nach vaskulärer Stentimplantation

Birgit Blaich

geb. Jaschke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzende:	Univ	UnivProf. Dr. Sevil Weinkauf	
Prüfer der Dissertation:	1.	UnivProf. Dr. Dr. Adelbert Bacher	
	2.	PrivDoz. Dr. Rainer Wessely	

Die Dissertation wurde am 14.07.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.09.2006 angenommen.

Diese Arbeit wurde im Deutschen Herzzentrum München, Klinik an der Technischen Universität München in der Abteilung Experimentelle Erwachsenenkardiologie unter der Leitung von PD Dr. R. Wessely und Prof. Dr. Dr. A. Bacher konzipiert und angefertigt. meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	1.1 Atherosklerose und Koronare Herzkrankheit (KHK)	1
	1.2 Interventionelle Therapieverfahren	2
	1.2.1 Perkutane transluminale Koronar-Angioplastie (PTCA)	3
	1.2.1.1 Prinzip der PTCA	3
	1.2.1.2 Problematik der PTCA	3
	1.2.2 Stents	4
	1.2.2.1 Stentimplantation	5
	1.2.2.2 In-Stent Restenose (ISR)	5
	1.2.2.3 ISR im Tiermodell	7
	1.3 Strategien der In-Stent Restenoseprävention	9
	1.3.1 Systemische Therapie	9
	1.3.1.1 Antiproliferative Therapiestrategien	9
	1.3.1.2 Antioxidative Therapiestrategien	. 10
	1.3.1.3 Unterstützung der Endothelfunktion als Therapieansatz	. 11
	1.3.1.4 Gentherapeutischer Ansatz	.11
	1.3.2 Lokale Applikation – Stents als Arzneimittelträger	. 12
	1.3.2.1 Stent- und Matrix-Materialien (passive Beschichtung)	. 13
	1.3.2.2 "Drug-eluting" Stents (aktive Beschichtung)	. 14
	1.3.2.3 Lokale Pharmakokinetik	.17
	1.4 Zellzyklus und Zellzyklusinhibitoren	. 17
	1.4.1 Der eukaryonte Zellzyklus	. 18
	1.4.2 Zellzyklusinhibitoren	. 21
	1.4.2.1 p21 ^{cip1} (WAF1, cip1, Sdi1, Cap20, Pic1)	. 21
	$1.4.2.2 p27^{kip1}$. 22
	1.4.3 Therapeutische Zielstrukturen	. 23
	1.4.4 CDK-Inhibition durch Flavopiridol (alvocidib, HMR1275, L86-8275, NSC-	
	49890)	. 24
	1.4.4.1 Präklinische und klinische Erkenntnisse	. 24
	1.4.4.2 Flavopiridol in der Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen	. 26
	1.5 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)	. 26
	1.5.1 Cholesterin-Biosynthese	. 26
	1.5.2 Wirkung von Statinen auf die Cholesterin-Biosynthese	. 27
	1.5.3 Isoprenylierte Proteine	. 28
	1.5.4 Pleiotrope Statineffekte	. 29
	1.5.5 Cerivastatin (Lipobay [®] , Baycol [®] , BAYw6228)	. 30
2	MATERIAL & METHODIK	. 33
	2.1 Humane Zelllinien und deren Kultivierung	. 33
	2.2 Testsubstanzen: Eigenschaften und Lagerung	. 34
	2.2.1 Flavopiridol (alvocidib, HMR12/5, L86-82/5, NSC-649890)	. 34
	2.2.2 Cerivastatin (Lipobay [®] , Baycol [®] , BAYw6228)	. 34
	2.2.3 Weitere Chemikalien, Reagenzien und Puffer	. 34
	2.3 Quantifizierung der Proliferationrate	. 35
	2.3.1 Proliterationsassay und Zellzählung	.35
	2.3.2 BrdU-Inkorporations-ELISA	. 36
	2.3.3 FACS-Zellzyklusanalyse	. 36
	2.4 Untersuchung der Migration	.37
	2.4.1 Boyden-Kammer-Assay	. 38
	2.4.2 Zellzählung	. 38

	2.4.3	Fotometrische Messung	. 38
	2.5 Cyte	otoxizität und Apoptose	. 39
	2.5.1	LDH-Freisetzung	. 39
	2.5.2	Apoptose	. 40
	2.6 Prot	einbiochemische Methoden	. 41
	2.6.1	Zellernte und Lyse	. 41
	2.6.1.1	Totallysate mit NP-40	. 41
	2.6.1.2	Lysate für pRb-ELISA	. 41
	2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	. 42
	2.6.3	SDS-PAGE-Gelelektrophorese	. 43
	2.6.4	Western Blot	. 43
	2.6.5	Proteindetektion	. 43
	2.6.6	Digitalisierung und Quantifizierung der Western Blots	. 45
	2.6.7	pRb-ELISA	. 45
	2.7 Bio	divYsio [™] -Matrix DD Stent-System	. 46
	2.7.1	Beschichtung der Stents	. 46
	2.7.2	In vitro-Freisetzungskinetik	. 47
	2.7.2.1	HPLC/uv-Konzentrationsbestimmung	. 47
	2.7.2.2	Biologische Wirkung (BrdU-ELISA)	. 48
	2.7.3	In vivo-Experimente (Ratte)	. 48
	2.7.3.1	Anästhesie und präoperative Vorbereitung	. 48
	2.7.3.2	2 Operationstechnik des Carotis-Verletzungsmodells	. 48
	2.7.3.3	Stentimplantation und postoperative Behandlung	. 49
	2.7.3.4	Opterung, Herstellen der Praparate und histomorphometrische Analyse	. 50
	2.7.3.3	intigaba Avanuation a	. 31 51
	2.0 Stat	isusche Ausweltung	. 31
3	ERGEBN	NISSE	52
5	31 <i>In-v</i>	<i>itro</i> Untersuchungen (Flavoniridol)	52
	311	Flavoniridol hemmt die mitogeninduzierte Proliferation humaner glatter	
	5.1.1	Gefäßmuskelzellen	52
	3.1.2	Flavopiridol führt zu einem Zellzvklusarrest in der G_1 -Phase sowie in G_2/M	. 54
	3.1.3	Flavopiridol hemmt die Fibronektin-induzierte Migration von CASMC <i>in vi</i>	tro
			. 55
	3.1.4	Sicherheit der Anwendung: Keine detektierbaren cytotoxischen oder pro-	
		apoptotischen Effekte in CASMC und CAEC	. 56
	3.1.5	Flavopiridol führt zu einer distinkten Regulation der Konzentrationen wichti	iger
		zellzyklusrelevanter Proteine	. 58
	3.1.5.1	Flavopiridol hemmt die Phosphorylierung von Rb	. 58
	3.1.5.2	2 Hemmung der Expression von Cyclinen durch Flavopiridol	. 59
	3.1.5.3	Erhöhte Expression von CKI der cip/kip-Familie	. 59
	3.1.5.4	Induktion des Tumorsuppressorproteins p53	. 60
	3.2 <i>In-v</i>	itro Untersuchungen (Cerivastatin)	. 61
	3.2.1	Differenzielle Inhibition der mitogeninduzierten CASMC-Proliferation durc	h
		Cerivastatin	. 62
	3.2.2	Cerivastatin führt zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in CASMC	. 63
	3.2.3	Cerivastatin inhibiert selektiv die Migration von CASMC	. 65
	3.2.4	Keine detektierbare cytotoxische oder apoptotische Zellschädigung durch	<i></i>
		Cerivastatin	. 66
	3.2.5	Cerivastatin beeintlusst die Expression und Aktivität wichtiger	~ -
		Zellzyklusregulatoren auf Proteinebene	. 67

	3.2.5.1	Einfluss von Cerivastatin auf die Expression wichtiger Proliferationsma in CASMC versus CAEC	arker 68
	3.2.5.2	Cerivastatin führt zu einer Abnahme der Konzentration verschiedener Cyc	line .
	3.2.5.3	Induktion wichtiger CKI der cip/kip-Familie durch Cerivastatin	70
3	1.3 In vi	tro-Experimente mit beschichteten Stents	71
	3.3.1	Dauer der Freisetzung und Quantifizierung der Freisetzung pro Stunde	12
	3.3.2	Biologische Wirkung der Stent-Überstande	/3
	3.3.3	Einordnung der Ergebnisse	/4
~	3.3.4	Limitation des experimentellen <i>in vitro</i> -Ansatzes	76
3	.4 In vi	vo-Experimente (Carotis-Verletzungsmodell der Ratte)	
	3.4.1	Hemmung der Neointimatormation durch lokale CDK-Inhibition (Flavop	iridol) 77
	3.4.2	Reduktion der Neointimahyperplasie durch pleiotrope Wirkungen von lok	al 70
	2 4 2	Genius statin führt nicht zu sinen Inihitigen des Deundsthaligibigen von Deu-	/ð
	3.4.3	Cerivastatin funrt nicht zu einer Inibition des Reendothelialisierungs-Proz	zesses
	3.4.4	Limitation des experimentellen in vivo-Ansatzes (Tiermodell)	79
4	DISKUS	SION	83
. 4	1 Präv	ention der ISR durch selektive CDK-Inhibition - Flavoniridol	83
4	.2 Diff	erenzielle Inhibition der Neointimahyperplasie durch Cerivastatin	92
5	ZUSAM	MENFASSUNG	100
6	SUMMA	RY	102
7	LITERA	ΓURVERZEICHNIS	104
8	TABELL	ENVERZEICHNIS	121
9	ABBILD	UNGSVERZEICHNIS	122
10	ABKÜRZ	ZUNGSVERZEICHNIS	125
11	DANKSA	AGUNG	128
12	LEBENS	LAUF	129

"Was auch immer Du tun willst, oder erträumst tun zu können. Beginne es! Kühnheit besitzt magische Kraft und Genie. Beginne es. Jetzt." J. W. v. Goethe

1 EINLEITUNG

1.1 Atherosklerose und Koronare Herzkrankheit (KHK)

Der Begriff "Atherosklerose" wurde 1904 von dem deutschen Pathologen MARCHAND für einen speziellen Typ der Arterienverhärtung geprägt, der durch das Vorhandensein intimaler Plaques charakterisiert ist. Diese Plaques bestehen aus einem weichen (gr. *athere*), fettreichen und einem harten (gr. *skleros*) Teil [GOTTO, 1985]. Die Veränderungen an der Arterienwand führen zur Verminderung des Blutflusses und damit zur Beeinträchtigung der Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff [BÖTTIGER und FLEISCHER, 1994].

Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung, die sich langsam und meist stetig über den Verlauf von Jahren entwickelt [Ross, 1999]. Dieser Vorgang, die Atherogenese, ist definiert als ein komplexer "response-to-injury"-Prozess, der mit einer funktionellen oder mechanischen Verletzung der Endothelzellschicht beginnt [Ross, 1993]. Durch die



Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung atherosklerotischer Läsionen [DZAU et al., 2002]

lich zur Bildung der Läsion beitragen [Ross, 1999].

Dysfunktion des Gefäßendothels wird zunächst die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten verstärkt (Abb. 1.1). In der Folge kommt es zur Bildung und Freisetzung vasoaktiven von Molekülen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren und zu einer chronischen Inflammation an der Arterienwand. Diese stimuliert die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die maßgeb-

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien. Unter ihrem Begriff werden alle Krankheitsbilder zusammengefasst, die durch eine Arterienverkalkung in den Herzkranzgefäßen verursacht werden. Dazu gehören Angina Pectoris, Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod.

Die klassischen Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Plaques sind männliches Geschlecht, Alter, erhöhter LDL-Plasmaspiegel, Bluthochdruck, Rauchen und Diabetes Mellitus. Die Akkumulation von LDL (v.a. an Verzweigungen kleiner Arterien) und freien Radikalen sowie erhöhte Konzentrationen glykosylierter Substanzen (durch Diabetes) gelten als Noxen, die gemeinsam mit Bluthochdruck und erhöhter Scherkraft im Gefäß primäre Verletzungen des Endothels verursachen können [LUSIS, 2000]. Lipidakkumulation, Infiltration von Makrophagen, Migration und Proliferation vaskulärer Gefäßmuskelzellen (VSMC) sowie extrazelluläre Matrixsynthese führen zur Progression der Plaques und zur sukzessiven Verengung des erkrankten Gefäßes bis hin zum vollständigen Verschluss.

Abb. 1.2 zeigt immunhistologische Präparate eines nativen Koronargefäßes [A] und eines atherosklerotischen Gefäßes im Querschnitt [B].



Abb. 1.2: Immunhistologisches Präparat einer nativen Koronararterie [A] im Vergleich zu einem atherosklerotischen Gefäß [B]. [aus: www.med.utah.edu]

1.2 Interventionelle Therapieverfahren

Neben präventiven Maßnahmen, medikamentöser Therapie und aortokoronarvenöser Bypassoperation ist das Mittel der Wahl zur Behandlung verengter oder verschlossener Gefäße heute die interventionelle (= invasivtherapeutische) Therapie. Jährlich werden weltweit über 1,5 Millionen Revaskularisations-Prozeduren durchgeführt, mehrheitlich Angioplastien [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001]. Alle Interventionen haben dasselbe Ziel: Die Verbesserung der myokardialen Sauerstoffbilanz [BOKISCH et al., 2000].

1.2.1 Perkutane transluminale Koronar-Angioplastie (PTCA)

Erstmals wurde die PTCA-Technik durch A.R. GRÜNTZIG zur Revaskularisierung koronarer Arterien angewandt. Die klinische Einführung fand 1977 in Zürich statt [GRÜNTZIG et al., 1979].

1.2.1.1 Prinzip der PTCA

Das Prinzip der PTCA besteht in einer Dilatation stenosierter Gefäßabschnitte mit Hilfe eines über einen Katheter ins Gefäß eingeführten Ballons. Dabei kommt es zu einem dem Ausmaß der Ballondilatation proportionalen initialen Lumengewinn ("initial gain"), der die Reperfusion des Gefäßes und damit die Durchblutung des Myokards sicherstellt.

Im Gegensatz zu früheren Hypothesen beruht die Gefäßdilatation nicht allein auf einer Kompression des Plaques, sondern ebenso auf der Tatsache, dass das Plaque-Material bei lokaler Überdehnung der Media und Adventitia aufgebrochen wird und verschiedene Schichten der Gefäßwand einreißen. Diese Vorgänge sind Bestandteil des Erfolges der PTCA und gleichzeitig die Grundlage für Komplikationen [STRAUER, 1999].

1.2.1.2 Problematik der PTCA

Die bei einer PTCA möglichen Komplikationen gliedern sich zeitlich aufeinanderfolgend in akute und verzögerte Reaktionen. In ca. 7% der Fälle kommt es nach Durchführung der PTCA innerhalb der ersten Minuten bis Stunden zu einem akuten Verschluss des Koronargefäßes infolge einer ausgedehnten Dissektion von Intima und Media, begünstigt durch Spasmen und Aktivierung der Gerinnung [DETRE et al., 1990]. Ein thrombotischer Verschluss als Akutkomplikation führt in ca. 1% der Fälle zu einem tödlichen Ausgang oder einer notfallmäßigen Bybass-Operation [HILLIS und RUTHERFORD, 1994]. Innerhalb der ersten Minuten bis Stunden *post interventionem* kommt es zudem zum Phänomen des "elastic recoil". Gemeint ist die Tendenz elastischer Strukturen der Gefäßwand, nach erfolgter Dilatation die Ausgangsgröße des Gefäßes wiederherzustellen. Dieser Vorgang führt zu einem Lumenverlust von bis zu 40% des Durchmessers, der während der Dilatation erreicht wurde [RENSING et al., 1991]. Eine weitergehende Verengung des dilatierten Gefäßes kann noch Wochen nach der Intervention einsetzen und beruht auf einer chronischen, fibrotischen Veränderung der Adventitia ("chronic recoil") [Post et al., 1994]. Dem initialen Lumengewinn ("initial gain") wird der Begriff des "late loss" gegenübergestellt, durch den

nach TEIRSTEIN die Wiederverengung des dilatierten Gefäßes (= Restenose) am besten beschrieben wird [TEIRSTEIN et al., 2001].

Die Restenose ist die weitaus häufigste Komplikation nach Dilatation der Koronargefäße und tritt in 30-40% der Fälle auf [POPMA et al., 1991]. Der Verlust des Gefäßlumens kann bis hin zum Ausgangspunkt vor der Dilatation und sogar noch weiter gehen. Die Restenose-Manifestation ist ein zeitbezogenes Phänomen mit einer maximalen Inzidenz (95%) nach ca. sechs Monaten postinterventionell [HANKE et al., 1995].

Klinisch existieren unterschiedliche Definitionen des Begriffs "Restenose". Eine bei Folgeuntersuchungen nachweisbare erneute Verengung wird als "angiographische Restenose" bezeichnet, beim Auftreten von Symptomen und/oder klinischen Ereignissen wie Tod, Myokardinfarkt oder Notwendigkeit erneuter Revaskularisation spricht man dagegen von "symptomatischer" oder "klinischer Restenose". Werden bei pathologischen Untersuchungen ohne vorherigen klinischen Befund histologische Veränderungen bemerkt, spricht man von "histologischer Restenose" [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001]. Im klinischen Gebrauch wird unter Restenose ein mehr als 50%iger Verlust des Gefäßlumens verstanden. Die binäre Unterscheidung zwischen "Restenose" oder "keine Restenose" ist attraktiv, entspricht allerdings nicht der Realität, da es sich um eine kontinuierlich veränderliche Variable handelt, die in unterschiedlichem Ausmaß in allen behandelten Gefäßen eine Rolle spielt [RENSING et al., 1992].

Das Auftreten von Restenosen nach PTCA ist der limitierende Faktor für deren klinischen Erfolg und der Grund für erneute Interventionen. Durch die Implantation einer Gefäßstütze (Stent) im Rahmen der PTCA kommt es zu einer Abnahme der Restenoserate auf weniger als 30% und konsekutiv zu einer Reduktion der Anzahl notwendiger Revaskularisierungs-Prozeduren [FISCHMAN et al., 1994; SERRUYS et al., 1994].

1.2.2 Stents

Expandierbare Endoprothesen (Gefäßstützen) aus verschiedenen Materialien, die dazu dienen, röhrenförmige Strukturen offen zu halten, werden als Stents bezeichnet. Stents sollten in nicht entfaltetem Zustand flexibel sein, um den Ort der Implantation erreichen zu können. Nach erfolgter Dilatation sollten sie eine starre und stabile Struktur besitzen. Das Material sollte soweit möglich biokompatibel und röntgenologisch darstellbar sein, um eine exakte Lokalisierung und Positionierung zu gewährleisten.

Zu Beginn der 1960er Jahre machten DOTTER und JUDKINS erste Erfahrungen mit der Implantation einfacher Metallspiralen in periphere Arterien von Hunden und erkannten, dass

deren Oberfläche, sofern sich kein Thrombus bildete, von einer neuen Zellschicht überzogen wurde [DOTTER und JUDKINS, 1964]. PALMAZ und seine Mitarbeiter entwickelten später den ersten ballonexpandierbaren Stent aus chirurgischem Edelstahl und studierten die akuten und chronischen biologischen Reaktionen in Koronararterien von Hunden [SCHATZ et al., 1987]. Die erste Implantation eines koronaren Stents beim Menschen wurde in Lausanne durch SIGWART und seine Mitarbeiter durchgeführt [SIGWART et al., 1987].

1.2.2.1 Stentimplantation

Intrakoronare Stents sind der bislang erfolgreichste Therapieansatz zur Verminderung der Restenoserate nach PTCA. Ihr Vorteil ist zum einen ein erhöhter initialer Lumengewinn und zum anderen eine physische Begrenzung der elastischen Rückstellkräfte nach der Intervention [KUNTZ et al., 1993]. Die Anzahl der PTCA-Prozeduren mit zusätzlicher Stent-Implantation zeigt eine steil ansteigende Tendenz: 1996 wurde in ca. 50% und 1998 bereits in 70% der Fälle zusätzlich eine Gefäßstütze implantiert [HOLMES et al., 1998; SMITH et al., 2001]. Inzwischen kann davon ausgegangen werden, dass in über 80% der Interventionen ein Stent implantiert wird. Dabei kommen unterschiedlichste Stenttypen zum Einsatz, die aufgrund ihrer Geometrie und Materialbeschaffenheit in ihren Eigenschaften differieren. Eine detailliertere Einteilung aller Stents findet man in: "Coronary Stenting: Current Perspectives" [KUTRYK und SERRUYS, 2002].

1.2.2.2 In-Stent Restenose (ISR)

Nach der Implantation koronarer Stents kommt es in ca. 12-22% der Fälle zu einer Stenose im Stentbereich (In-Stent Restenose, ISR) [SERRUYS et al., 1994; EMANUELSSON et al., 1997], für deren sichere Prävention es bislang keine etablierte Therapie gibt. Die ISR gilt als der Hauptgrund für den klinischen Misserfolg einer koronaren Stentimplantation [TOPOL und SERRUYS, 1998]. Trotzdem wird die Stentimplantation auf immer weitere klinische Indikationen ausgedehnt, z.B. bei langen, komplizierten Läsionen, sehr kleinen Gefäßen, vollständigen Verschlüssen, Angioplastie- und Stent-Stenosen, Bypassverschlüssen und bei Diabetikern. Die ISR-Rate für Gefäße mit geringem Durchmesser ist mit 20-39% deutlich erhöht [ELEZI et al., 1998], bei Hochrisiko-Läsionen kann sie sogar bis zu 59% betragen [KASTRATI et al., 1997]. Es ist bekannt, dass die Entstehung einer ISR zudem von der Stent-Geometrie abhängig ist: Vergleichende quantitative, angiographische und histologische Untersuchungen im porcinen Modell zeigten nach der Implantation von Stents

unterschiedlicher Geometrie signifikante Unterschiede im späten Lumenverlust [KJELSBERG et al., 1998].

Durch die Stentimplantation wird zwar den elastischen Rückstellkräften der Gefäßwand entgegengewirkt, jedoch ist der neointimale Wachstumsprozess durch verstärkten bzw. verlängerten Proliferationsstimulus auf die glatten Muskelzellen ausgeprägter als bei der PTCA [HANKE et al., 1995]. Die Neointimahyperplasie gilt in den meisten Publikationen als Hauptgrund für den späteren Lumenverlust nach Stentimplantationen und wird als das pathoanatomische Korrelat der Restenose bezeichnet [GORDON et al., 1993; EDELMAN und ROGERS, 1996]. Gemäß der "response-to-injury"-Theorie (s. Kapitel 1.1) ist die spätere Ausdehnung der Neointima dabei proportional zum Grad der Verletzung des Gefäßes während der Intervention. Dieser wiederum ist abhängig u.a. von der Stent-Geometrie, insbesondere von der Dicke der Stentstreben [KONIG et al., 2002].

In unverletzten Arterien befinden sich vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) in der G₀-Phase des Zellzyklus, proliferieren nicht und werden als "quieszent" bezeichnet. Dieser Zustand entspricht dem funktionell kontraktilen, differenzierten Phänotyp. Bei einer PTCA und/oder Stentimplantation kommt es durch mechanische Überdehnung des Gefäßes zu einer Verletzung der Endothelzellschicht. Die darunter liegenden Ebenen der Gefäßwand kommen daraufhin mit den im Blutstrom zirkulierenden Mitogenen in Kontakt. Adhärierende Plättchen, aktivierte Endothelzellen, VSMC selbst und Zellen des Immunsystems setzen lokal zusätzlich Mitogene und Cytokine frei. So führt die Verletzung der Arterienwand zur Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie zur vermehrten Produktion extrazellulärer Matrixproteine und Kollagen [LIU et al., 1989; IP et al., 1990]. Der zelluläre Anteil der Neointima besteht zu ca. 90% aus CASMC, die aus der Media- in die Intima-Region migrieren und dort proliferieren [VIRMANI und FARB, 1999]. Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen gelten daher als Hauptgründe für die Entstehung einer Neointimahyperplasie im Stent-Bereich und damit als Auslöser der ISR [KOMATSU et al., 1998].

Viele Studien basierend auf histologischen Befunden beschreiben das Phänomen der pathologischen VSMC-Proliferation als Grund für die Entstehung von Restenosen [NOBUYOSHI et al., 1991; GORDON et al., 1993]. Es konnte gezeigt werden, dass VSMC aus Restenosen höhere Proliferationsraten aufweisen, als Zellen aus primären Läsionen [DARTSCH et al., 1990; MACLEOD et al., 1994]. Im Gegensatz zur Restenose nach PTCA beruht die ISR in erster Linie auf dem Phänomen der Neointimahyperplasie [GORDON et al., 1993; HOFFMANN et al., 1996], während konstriktive "remodeling"-Prozesse eine geringere Rolle

spielen [MUDRA et al., 1997; ARAKAWA et al., 1998]. Diese Erkenntnisse machen die pathologische VSMC-Proliferation zum interessantesten Ziel anti-restenotischer Therapieansätze.

Neben der Neointimahyperplasie tragen noch andere zelluläre und molekulare Mechanismen zur Entstehung der ISR bei.

Durch die Endothel-Denudation und die Verletzung der Media kommt es zur Freisetzung subintimal lokalisierter Substanzen wie Kollagen, von Willebrand-Faktor, Fibronectin und Laminin. Diese Faktoren führen zur vermehrten Plättchenadhäsion und -aggregation, vermittelt v.a. durch die Wirkung des membrangebundenen Glycoprotein-Rezeptors IIb/IIIa. Ablagerungen aus Plättchen und Fibrin, die mit einer späteren Neointimahyperplasie in Verbindung gebracht werden, findet man schon sehr bald nach der Implantation an den Stentstreben [KOMATSU et al., 1998; FARB et al., 1999; GREWE et al., 2000].

Ein wichtiger Faktor, der nach einer Angioplastie die Thrombusformation begünstigt, ist Tissue Factor [SPEIDEL et al., 1995]. Im Gegensatz zur PTCA spielt dieses Protein bei der ISR jedoch nur eine untergeordnete Rolle und es wird angenommen, dass die Stentimplantation eine eher zellulär-proliferative, weniger thrombogene Antwort im Gefäß hervorruft [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001]. Bedeutsamer ist hier wohl die mitogene Wirkung von Bestandteilen der Koagulationskaskade auf VSMC, z. B. durch Faktor X, Xa, Faktor S [GASIC et al., 1992] und Thrombin [BAR-SHAVIT et al., 1990].

Die Rolle inflammatorischer Reaktionen bei der Restenose ist noch wenig erforscht. Humane Studien zeigen eine frühe Entzündungsreaktion, v.a. bei einer Verletzung der Media oder des lipidreichen Plaque-Kerns durch den Stent [KOMATSU et al., 1998; FARB et al., 1999; GREWE et al., 2000]. Monozyten und Makrophagen finden sich in allen Stufen der Restenose [KOMATSU et al., 1998] und sekretieren fibrinolytische Enzyme, die den Thrombus umformen oder resorbieren können [NATHAN, 1987].

Schlussendlich kann die Restenose nach Stentimplantation (ISR) als eine Folge von elastischen Strukturveränderungen, thrombotischen und immunologischen Vorgängen sowie Migration und proliferativen Prozessen an und in der Gefäßwand betrachtet werden.

1.2.2.3 ISR im Tiermodell

Viele Erkenntnisse zur humanen ISR und deren Mechanismen konnten durch tierexperimentelle Studien gewonnen werden, obwohl die gängigen Restenosemodelle die Situation im Menschen nur teilweise imitieren. Ein vollkommen gültiges Tiermodell sollte die

biologischen Mechanismen, die der Erkrankung im Menschen zugrunde liegen, exakt reproduzieren.

Im Tierexperiment werden i.d.R. gesunde, nicht atherosklerotische Gefäße dilatiert und/oder gestentet. Auch eine prä-interventionelle künstliche Verletzung der später gestenteten Gefäße führt nicht exakt zu einer der Atherosklerose vergleichbaren Ausgangssituation. Zudem können v.a. im Kleintiermodell aus methodischen Gründen nicht die den humanen Gefäßen entsprechenden (Koronar-)Arterien experimentell untersucht werden. Periphere und koronare Gefäße unterscheiden sich jedoch u.a. in ihren elastischen Eigenschaften und folglich im Ausmaß des "elastic recoil".

Pharmakologische Experimente zur Therapie der Restenose im Tiermodell erweisen sich bislang als ungeeignet für eine Prognose des therapeutischen Erfolges im Menschen. Viele Wirkstoffe, die bei systemischer Verabreichung im Tier zu einer Reduktion der Neointima führen, erwiesen sich in humanen Studien als unwirksam [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001]. Für die fehlende Übertragbarkeit der Ergebnisse gibt es eine Reihe denkbarer Gründe. Möglich ist, dass pharmakologisch wirksame Dosen, die im Tier zu einer Prävention der Neointimaformation führen, im Menschen ohne inakzeptable systemische Nebenwirkungen nicht zu erreichen sind. Auch kann die zur therapeutischen Effizienz eines Medikaments notwendige Zeitspanne im Menschen von der im Tier abweichen und ggf. eine chronische Applikation erfordern.

Ein weiteres Problem ist die Definition des Erfolges einer Therapie. Während im Tierexperiment zu beliebig wählbaren Zeitpunkten histologische Untersuchungen und Messungen der Neointimafläche bzw. des Intima-Media-Verhältnisses möglich sind, können in der klinischen Praxis i.d.R. ausschließlich angiographische Untersuchungen und das Auftreten charakteristischer klinischer Symptome zur Beurteilung des therapeutischen Erfolges herangezogen werden [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001].

Grundsätzlich sollten experimentelle Modelle hinsichtlich einer ausreichenden Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung detailliert hinterfragt und die daraus gewonnenen Ergebnisse entsprechend kritisch bewertet werden. Bislang sind tierexperimentelle Studien jedoch die einzige Möglichkeit, erfolgversprechende Therapieansätze präklinisch zu untersuchen [BENNETT und O'SULLIVAN, 2001]. Zu den Grenzen des tierexperimentellen Ansatzes siehe auch Kapitel 3.3.4.

1.3 Strategien der In-Stent Restenoseprävention

Voraussetzung für die Entwicklung einer geeigneten medikamentösen Therapie der ISR ist die Identifikation der zu Grunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen.

1.3.1 Systemische Therapie

Durch die Implantation eines Stents bzw. die Verletzung des betroffenen Gefäßabschnitts kommt es lokal zur Induktion von Migration und Proliferation v.a. der glatten Gefäßmuskelzellen ("response-to-injury"-Modell). Diese beiden Vorgänge bilden die zelluläre Grundlage der Neointimahyperplasie, die als das pathoanatomische Korrelat der Restenose gilt [GORDON et al., 1993; EDELMAN und ROGERS, 1996]. Antiproliferative Therapieansätze gelten demgemäß als chancenreiche Kandidaten zur Prävention der ISR. Möglicherweise kann die Inhibition eines bestimmten, für den Eintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus relevanten Moleküls die Migration und/oder Proliferation der VSMC und damit die Entstehung einer Neointimahyperplasie verhindern. Andere Therapiestrategien beinhalten u.a. die Inhibition von Sauerstoffradikalen, eine direkte positive Beeinflussung des Endothels, die Inhibition von Aggregations- und Koagulationskaskaden sowie gentherapeutische Ansätze.

1.3.1.1 Antiproliferative Therapiestrategien

Die Einführung des diagnostischen intravaskulären Ultraschalls (IVUS) in den späten 1980er Jahren führte zu einem enormen Erkenntnisgewinn über die pathophysiologischen Mechanismen der Restenose. Der Fokus, der bis dahin auf Plättchen, Wachstumsfaktoren und Lipiden lag, verschob sich hin zu inflammatorischen Mechanismen, Endothelfunktion und VSMC-Proliferation [KOCHULAKANTI und WAKSMAN, 2004].

Die systemische Applikation hochpotenter Cytostatika (z.B. Vincristin, Actinomycin) ist durch schwere Nebenwirkungen, bedingt durch die Inhibition von Zellpopulationen mit einer physiologisch hohen Teilungsfrequenz (u.a. Knochenmark-, Epithelstammzellen) stark eingeschränkt [HERMANS et al., 1991]. Andere zellzyklusinhibierende Substanzen aus dem Bereich der Onkologie, wie z.B. der synthetische CDK-Inhibitor Flavopiridol haben geringere Nebenwirkungen und befinden sich in der Tumortherapie in fortgeschrittenen Stadien der klinischen Erprobung (vgl. Kapitel 1.4.4). Die Anwendung dieser Substanzen in der Kardiologie ist jedoch noch weitgehend unerforscht.

Weitere Medikamente wie z.B. Paclitaxel (Taxol), das über die Inhibition der Mikrotubuli-Aktivität zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führt [SCHIFF et al., 1979], oder Rapamycin (Sirolimus) finden sowohl systemisch als auch in Form beschichteter Stents (vgl. Kapitel 1.3.2.2) seit einigen Jahren klinische Anwendung. Im Rahmen einer randomisierten Studie mit hochdosierter oraler Rapamycin-Verabreichung (OSIRIS = "Oral Sirolimus to Inhibit Recurrent In-stent Stenosis) kam es zu einer Reduktion der angiographischen Restenoserate von 42,2 auf 22,1% sechs Monate nach Stentimplantation [HAUSLEITER et al., 2004].

Ein weiterer systemischer Therapieansatz bedient sich der in der Kardiologie zur Behandlung von Hyperlipidämien routinemäßig eingesetzten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine). Substanzen dieser Wirkstoffgruppe haben neben ihren lipidsenkenden Eigenschaften sogenannte "pleiotrope" Effekte (u.a. zellzyklusinhibierende Wirkung), die für eine verlangsamte Progression der KHK verantwortlich sein können (s. Kapitel 1.5.4).

Im Tiermodell führt die subkutane Injektion von Cerivastatin (BAYw6228) zu einer verminderten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und konsekutiv zu einer Inhibition der Neointimahyperplasie nach Gefäßverletzung [IGARASHI et al, 1997].

Klinische Untersuchungen nach perkutaner koronarer Intervention (PTCA mit/ohne Stentimplantation) zeigen jedoch, dass eine systemische Verabreichung von Statinen zur Prävention der humanen Restenose nicht geeignet ist. Zwar kommt es zu einer Reduktion der Mortalität, v.a. bei Patienten mit erhöhter Konzentration des Inflammationsmarkers hsCRP [SCHÖMIG et al., 2002; CHAN et al., 2003], ein positiver Einfluss auf das Ausmaß der Restenose-Entstehung kann jedoch im Patienten nicht nachgewiesen werden [KUCHULAKANTI und WAKSMAN, 2004; WEINTRAUB et al., 1994].

1.3.1.2 Antioxidative Therapiestrategien

Eine einzelne klinische Studie zeigt eine Reduktion der Restenoserate nach PTCA durch eine präinterventionelle Therapie mit dem antioxidativ wirksamen Probucol, sogar in kleineren Gefäßen [RODES et al., 1998]. Dabei bleibt zu klären, ob dieser positive Effekt ausschließlich auf antioxidative [LEE et al., 1996] oder zumindest partiell auf antiproliferative Wirkungen des Medikaments zurückzuführen ist [WATANABE et al., 1996]. Im Tierexperiment ist eine Hemmung der VSMC-Proliferation und -Migration durch Probucol nachweisbar [JACKSON und PETTERSSON, 2001], wobei die Inhibition der Proliferation auf einer verminderten PDGF-Expression beruht [MIYAUCHI et al., 1998]. Eine erfolgreiche Therapie der humanen ISR durch systemische Anwendung von Probucol hingegen ist bislang nicht beschrieben [KIM et al., 2002].

Carvedilol, ein ß-Blocker mit hohem antioxidativen Potential inhibiert *in vitro* sowohl Migration als auch Proliferation humaner pulmonaler VSMC und führt im Carotis-Verletzungsmodell der Ratte zu einer attenuierten Neointimaformation [OHLSTEIN et al., 1993]. Im porcinen Modell haben Carvedilol-beschichtete Stents im Gegensatz zur Probucol-Beschichtung eine Reduktion der Neointimafläche um 42% nach 28 Tagen zur Folge [KIM et al., 2005]. Bei systemischer Applikation ist das Medikament zur Prävention der humanen ISR jedoch nicht geeignet [CHA et al., 2004].

1.3.1.3 Unterstützung der Endothelfunktion als Therapieansatz

Das Ausmaß der Endothelverletzung spielt eine wichtige Rolle für den Erfolg einer PTCA. Werden im betroffenen Gefäß nur geringe Areale denudiert, entsteht wenig, bei großflächiger Schädigung der Endothelzellschicht entsprechend mehr Neointima [REIDY und SCHWARZ, 1981; BJOKERUD und BONDJERS, 1973]. Eine vollständige Reendothelialisierung der Oberfläche des Stents möglichst frühzeitig nach der Implantation ist daher anzustreben.

Das Cytokin VEGF ist das wichtigste Signalmolekül bei der Regulation der Endothelzell-Proliferation und der Bildung neuer Gefäße [CELEC und YONEMITSU, 2004]. Die Anwendung rekombinanten VEGF-Proteins zur Stimulation der Proliferation vaskulärer Endothelzellen führt jedoch selbst bei lokaler katheterbasierter Applikation zu nicht vertretbaren Nebenwirkungen wie Hypotension und Plaque-Destabilisierung [HENRY et al., 2001].

Die endothelprotektive Wirkung von Statinen ist wissenschaftlich anerkannt (vgl. Kapitel 1.5.4). Durch pleiotrope Effekte dieser Medikamentenklasse kommt es über Induktion sowie Stimulation der endothelialen NO-Synthase zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), das eine endothelprotektive Wirkung hat [LAUFS et al., 1998]. Die Vermeidung von oxidativem Stress und in der Folge eine Reduktion des Anteils oxidierten LDL's durch die systemische Wirkung von Fluvastatin führt zu einer verbesserten Endothelfunktion in atherosklerotischen Gefäßen im Kaninchenmodell [RIKITAKE et al., 2001]. Die Übertragbarkeit dieser positiven Effekte auf die Situation im gestenteten Gefäß ist jedoch nicht gesichert.

1.3.1.4 Gentherapeutischer Ansatz

Als Gentherapie bezeichnet man das Einbringen eines (i.d.R. viralen) Vektors in einen Wirtsorganismus mit dem Ziel, durch Expression des im Vektor integrierten Gens in der Zelle eine hohe Konzentration des therapeutisch wirksamen Genproduktes zu erzielen. Aktuelle Studien auf dem Gebiet der Restenoseprävention konzentrieren sich auf das vasoprotektive

Molekül NO, das dilatativ, antiproliferativ, antiaggregatorisch sowie als Radikalfänger wirkt [DZAU, 2003]. Im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen führte eine Liposomenbasierte Transfektion zu einer verstärkten NOS-Expression und konsekutiv zu einer erhöhten NO-Konzentration sowie zur signifikanten Reduktion der ISR im porcinen Modell [MUHs et al., 2003]. Ein System zur katheterbasierten intravaskulären Applikation einer den endothelialen Wachstumsfaktor VEGF kodierenden Plasmid-DNA wird bereits in klinischen Phase I und II-Studien im Hinblick auf Sicherheit und Effizienz untersucht [LOSORDO et al., 2002]. Andere Therapieansätze beruhen auf der Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie mit dem Ziel einer Inhibition der VSMC-Proliferation in koronaren Gefäßen nach einer Herztransplantation (Transplantat-Vaskulopathie). PREVENT I und II (PRoject in *Ex vivo* Vein graft ENgineering via Transfection I und II) sind die ersten prospektiven, randomisierten klinischen Studien, die sich gentechnischer Methoden bedienen. Sie bestätigen die Möglichkeit einer sicheren intraoperativen Transfektion von E2F-inaktivierenden Oligonukleotiden, die zu einer verminderten Expression zellzyklusrelevanter Gene führen [MANN et al., 1999].

Studien auf der Basis systemischer Applikation verschiedener Medikamente zur Prävention der ISR zeigen bislang im Gegensatz zu vorausgehenden tierexperimentellen Untersuchungen im Patienten nicht den erwarteten Erfolg [CHAN et al., 2003; HOLMES et al., 2002]. Antiproliferative und antimigratorische Effekte von Wirkstoffen aus unterschiedlichen Gruppen (z.B. Paclitaxel, Rapamycin, Statine) scheinen jedoch für den Erfolg der Therapie von essenzieller Bedeutung zu sein.

1.3.2 Lokale Applikation – Stents als Arzneimittelträger

Verglichen mit der systemischen Verabreichung bietet die lokale Applikation von Medikamenten wesentliche Vorteile. Im Gegensatz zur systemischen kommt es durch katheterbasierte, räumlich begrenzte Anwendung des Zellzyklusinhibitors Paclitaxel im Carotis-Verletzungsmodell des Kaninchens zu einer Reduktion der neointimal bedingten Gefäßverengung acht Wochen *post interventionem* [HERDEG et al., 2000].

Die Weiterentwicklung dieser Methodik mit der Einführung Wirkstoff-freisetzender Stent-Systeme ist ohne Frage einer der bedeutendsten Fortschritte auf dem Gebiet der interventionellen Kardiologie im Verlauf der vergangenen zehn Jahre [FAXON, 2004]. Durch die Implantation dieser Stents können direkt am betroffenen Gefäßabschnitt hohe Wirkstoff-Konzentrationen erreicht werden, während die systemischen Nebenwirkungen gering bleiben [DEV et al., 1995]. So kann neben der mechanischen Unterstützung des Gefäßes an der Läsionsstelle zusätzlich durch biologische Reduktion der Neointimahyperplasie die Notwendigkeit einer erneuten Revaskularisation vermieden werden [SONODA et al., 2003]. Ökonomische Untersuchungen basierend auf einem entscheidungsanalytischen Modell zeigen, dass die Implantation antiproliferativ beschichteter Stents zur Prävention der primären Restenose bei nahezu allen Patienten zu einer Reduktion der medizinischen Behandlungskosten führt, vorausgesetzt, die Implantate sind therapeutisch wirksam und zu einem "vernünftigen" Preis erhältlich [GREENBERG und COHEN, 2002].

Generell wird unterschieden zwischen einer "passiven" Beschichtung, bei der das Beschichtungsmaterial ausschließlich zur Erhöhung der Biokompatibilität zwischen Stahl und Gewebe dient, und einer "aktiven" Beschichtung mit Substanzen, die die biologischen Prozesse im Gefäß direkt beeinflussen [WIENEKE et al., 2002]. Die verwendeten Matrices erhöhen also entweder selbst die Biokompatibilität des Implantates oder sie speichern ein Medikament unterschiedlich lange und ermöglichen die Steuerung der Freisetzung über ein bestimmtes Zeitfenster.

1.3.2.1 Stent- und Matrix-Materialien (passive Beschichtung)

Zur Verbesserung der Biokompatibilität und zur Beschleunigung der Reendothelialisierung können Stents mit verschiedenen Polymeren, z.B. Polyurethan (PU) oder Polyester (Dacron) beschichtet werden. In einem statischen *in vitro*-System führen beide Materialien zu einer erhöhten Adhärenz humaner venöser Endothelzellen [MULLER-HULSBECK et al., 2002].

Neben einer häufig beobachteten Erhöhung der Bioverträglichkeit durch die Beschichtung mit polymeren Substanzen sind diese darüberhinaus in der Lage, bioaktive Substanzen zu speichern und über eine definierte Zeitspanne wieder freizusetzen.

Phosphorycholin (PC), das auch bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten BiodivYsio[™]-Stents als Matrix dient, verbessert die Hämokompatibilität der Stentoberfläche und minimiert so deren thrombogene Eigenschaften. Die bessere Verträglichkeit des Stents (unabhhängig von einer weiteren Beschichtung mit einer bioaktiven Substanz) beruht dabei auf der strukturellen Ähnlichkeit der PC-Matrix zu Phospholipiden auf der Oberfläche von Erythrozyten [LEWIS et al., 2001]. Das Polymer ist *in vivo* über einen langen Zeitraum stabil [LEWIS et al., 2002], wird vom Gewebe gut toleriert und kann therapeutisch wirksame Substanzen aufnehmen und wieder freisetzen [LEWIS und STRATFORD, 2002]. Die Sicherheit und die Effizienz der klinischen Anwendung wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie (SOPHOS = Study Of PHosphorylcoline coating On Stents) durch Implantation von 425 PC-beschichteten BiodivYsio[™] Stents in native koronare Läsionen bestätigt. Sechs Monate nach der Implantation kommt es zu einer mit 17,6% als unterdurchschnittlich zu bewertenden Restenoserate [BOLAND et al., 2000]. Die PC-Beschichtung selbst hat jedoch keinen positiven Effekt auf die angiographische Restenoserate nach perkutaner Intervention [HAUSLEITER et al., 2004].

Die Aufnahme von Wirkstoffen in die polymere Matrix erfolgt bei diesem System durch Eintauchen in eine wässrige oder ethanolische Lösung des gewählten Medikaments. Dabei ist die Menge der Substanz auf dem Stent innerhalb der Löslichkeitsgrenzen durch die Konzentration der Beschichtungslösung regulierbar. Die Kinetik der Freisetzung ist abhängig von der Lipophilie des gespeicherten Wirkstoffs: Hydrophobe Moleküle interagieren gut mit der ebenfalls hydrophoben Polymer-Matrix und werden langsamer ins wässrige Milieu abgegeben als hydrophile [LEWIS et al., 2001].

1.3.2.2 "Drug-eluting" Stents (aktive Beschichtung)

Ein "Drug-eluting" Stent ist in der Lage, lokal und hochkonzentriert bioaktive Substanzen freizusetzen, die bedingt durch die räumliche Nähe einen direkten Einfluss auf die Zellen der Gefäßwand haben. Unter Vermeidung systemisch wirksamer Konzentrationen treten lokal Reaktionen auf das freigesetzte Medikament auf, die sowohl die Zellen der Gefäßwand selbst und/oder Plaque-Bestandteile betreffen können. Dabei ist die Wirkung nicht streng auf Geweberegionen beschränkt, die räumlich direkt an den Stent bzw. eine Stent-Strebe angrenzen [SCHWARTZ und EDELMAN, 2002].

Die In-Stent Restenose gilt als wichtigster limitierender Faktor für den therapeutischen Erfolg einer Stentimplantation [TOPOL und SERRUYS, 1998]. Die Neointimahyperplasie als pathoanatomisches Korrelat der ISR kann durch die Implantation antiproliferativ beschichteter Stents wirksam inhibiert werden [MOSES et al., 2003; STONE et al., 2004].

Das immunsuppressiv wirksame Antibiotikum Rapamycin (Sirolimus) wird klinisch seit den 1990er Jahren zur Prävention einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen eingesetzt [KAHAN et al., 2000]. Das makrozyklische Lakton hemmt *in vitro* effektiv sowohl Proliferation als auch Migration glatter Gefäßmuskelzellen [MARX et al., 1995; POON et al., 1996] und ist damit ein attraktives Medikament zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen. Die Inhibition der VSMC-Proliferation durch systemische Applikation von Rapamycin korreliert mit einer signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie nach PTCA im porcinen Modell sowie auf molekularer Ebene mit einem erhöhten p27^{kip1}-Spiegel und einer Inhibition der Phosphorylierung von Retinoblastoma-Protein (Rb) in Zellen der Gefäßwand [GALLO et al. 1999]. Im selben Modell kommt es 28 Tage nach Implantation Rapamycin-beschichteter, sogenannter Cypher[®] Stents (Cordis, Miami, FL, USA) zu einer Reduktion der ISR um 50% [SUZUKI et al., 2001]. Dabei lassen sich über 95% des freigesetzten Medikaments in der den Stent umgebenden Gefäßwand nachweisen [YU et al., 2004].

Auch im Patienten führt die Implantation Rapamycin-freisetzender BX Velocity Stents (Cypher[®]) in *de novo*-Läsionen zu einer hochwirksamen Reduktion von Neointimahyperplasie und ISR acht Monate *post interventionem*. Bei einer Freisetzungsdauer von ca. 28 Tagen erwies sich die Implantation dieser Stents im Rahmen einer kleinen Pilotstudie als sicher und effektiv [SOUSA et al., 2001].

Die 2001 durchgeführte SIRIUS-Studie (SIRolImUS-coated Bx Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with *de novo* native coronary artery lesions) bestätigte eine hohe Effizienz dieses Stent-Systems auch in Läsionen mit erhöhtem Restenose-Risiko, z.B. in diabetischen Patienten. Dabei kam es zu einer Reduktion der Notwendigkeit einer erneuten Revaskularisierung des gestenteten Gefäßabschnittes von 21% in der Kontrollgruppe auf 8,6% bei Patienten, die einen beschichteten Stent erhielten [MOSES et al., 2003]. Subgruppenanalysen im Rahmen dieser Studie zeigen jedoch eine begrenzte Wirksamkeit dieses Systems bei der Behandlung von Hochrisiko-Läsionen. In diabetischen Patienten kommt es zu einer Reduktion der ISR von 50,5% auf 17,6%, in kleineren Koronargefäßen führt die antiproliferative Beschichtung zu einer Verminderung der Restenoserate von 42,9% auf 18,4% [MOSES et al., 2003]. Eine unabhängige Studie zur Analyse der Effizienz dieses Stent-Systems bei Implantation in Bifurkations-Läsionen zeigte mit einer ISR-Rate von 25,7% ebenfalls keine vollständige Eliminierung der Problematik [COLOMBO et al., 2004]. Trotzdem wird das Stent-System auch zur Implantation in komplizierte Läsionen empfohlen [COHEN et al., 2004]. Neueste Studien zeigen, dass der Stent durch seine antiproliferative Beschichtung auch zur Behandlung von Restenosen im Bereich eines zuvor implantierten Stents (ISR) geeignet zu sein scheint. Hier führt die Rapamycin-Freisetzung zu einer Reduktion der Restenoserate von 61% (PTCA) auf 13% [IOFINA et al., 2005].

Neben der Beschichtung mit Rapamycin bietet die antiproliferative Wirkung von Paclitaxel (Taxol) einen weiteren erfolgversprechenden Ansatz zur Prävention der ISR. Paclitaxel ist ein lipophiler Inhibitor der Mikrotubuli-Aktivität [SCHIFF et al., 1979]. Die Substanz führt *in vitro* zur Hemmung der Proliferation und Motilität koronarer glatter Gefäßmuskelzellen und *in vivo*

bei katheterbasierter Applikation zu einer Reduktion der Neointimahyperplasie im Kaninchen [AXEL et al., 1997; HERDEG et al., 2000]. Gewebeanalysen nach lokaler Paclitaxel-Applikation über ein Polymer-beschichtetes Stent-System zeigen eine Reduktion der mittleren Neointimadicke von bis zu 49% im Femoralis-Verletzungsmodell des Kaninchens [FARB et al., 2001]. Unter Verwendung Paclitaxel-beschichteter Stents kommt es im porcinen Modell zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion der Neointimahyperplasie vier Wochen nach deren Implantation [HELDMAN et al., 2001].

Im Rahmen der ELUTES-Pilotstudie (European evaLUation of the pacliTaxel Eluting Stent) konnte bei der Behandlung von de novo-Stenosen unter Einsatz der höchsten Test-Dosis (2,7 µg/mm² Stentoberfläche) eine Reduktion der ISR-Rate von 20,6% auf 3,2% beobachtet werden [GERSHLICK et al., 2004]. Die entsprechende asiatische Pilotstudie ASPECT (ASian Paclitaxel-Eluting stent Clinical Trial) bestätigt eine Reduktion der ISR-Rate, signifikant jedoch nur für die höchste Beschichtungsdosis [GRUBE und BUELLESFELD, 2004]. Die Sicherheit der Anwendung sowie eine signifikante Reduktion der ISR-Rate wurden im Rahmen der TAXUS I- und II-Studien über polymerbasierte NIRx-Stents (Taxus[®], Boston Scientific, Natick, MA, USA) mit verlangsamter Paclitaxel-Freisetzung auch für niedrigere Dosen nachgewiesen [GRUBE und BUELLESFELD, 2004]. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die klinische Evaluierung der Wirksamkeit dieses Systems auch in der Behandlung der ISR (TAXUS III). Die Implantation der Stents erweist sich auch in dieser Studie als sicher und führt zu einer Reduktion der ISR-Rate auf 16% nach 12 Monaten [TANABE et al., 2003]. Neuere Studien reproduzieren auch dieses Ergebnis: Die Paclitaxel-Freisetzung führt hier zu einer Restenoserate von 20% im "doppelt" gestenteten Gefäßabschnitt, während eine Behandlung der ISR mittels PTCA hier eine Restenose-Rate von 61% zur Folge hat [IOFINA et al., 2005]. Neuere Studien zur Prüfung der Effizienz des Paclitaxel-fresetzenden Stent-Systems und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in komplexen Läsionen (TAXUS IV) zeigen eine sichere Anwendung auch in Patienten mit instabilen ischämischen Symptomen und einen positiven Effekt auf die ISR-Rate, selbst in Patienten mit Diabetes Mellitus [MOSES et al., 2005; HERMILLER et al., 2005].

Verglichen mit antiproliferativ wirksamen Beschichtungen sind andere Ansätze unter Verwendung von DES bislang als wenig effektiv einzustufen. In der Entwicklung befinden sich u.a. antioxidative, endothelprotektive sowie gentherapeutische Strategien.

Neben einer direkten positiven Wirkung auf den Gefäßtonus hemmt Stickstoffmonoxid (NO) die Entstehung von Läsionen in koronaren Gefäßen. Dies geschieht über verschiedenste

Mechanismen, zu welchen u.a. die Hemmung der Plättchen- und Leukozytenadhäsion gehört [RADOMSKI et al., 1990]. Die lokale Applikation des NO-Donors Natrium-Nitroprussid über einen Polyurethan-Matrix-Stent reduziert jedoch im porcinen Modell die Neointimahyperplasie nicht [YOON et al., 2002].

Das Östrogen 17β-Estradiol besitzt neben anti-atherogenen, anti-inflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften die Fähigkeit zur *in vitro*-Inhibition sowohl der VSMC-Proliferation als auch -Migration [DAI-DO et al., 1996]. Im Rahmen der EASTER-Studie (Estradiol And Stents To Eliminate Restenosis) unter Verwendung des BiodivYsio[™]-Matrix LO Stent-Systems verhindert die lokale Applikation des Hormons innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 6-12 Monaten bei allen 30 behandelten Patienten die Entstehung einer ISR [ABIZAID et al., 2004].

1.3.2.3 Lokale Pharmakokinetik

Zur exakten Beurteilung der Pharmakokinetik bei lokaler Anwendung von Medikamenten über beschichtete Stent-Systeme existieren mathematische Modelle. Wichtig hierfür sind sowohl die Diffusionsresistenz der Beschichtung als auch die (reversible) Bindung des Medikaments an die Gefäßwand. Durch Diffusion aus der polymeren Beschichtung ins definierten räumlichen umgebende Gewebe kommt es zu und zeitlichen Konzentrationsprofilen. Die mittleren Wirkstoffkonzentrationen innerhalb der Gefäßwand sind berechenbar und es zeigt sich, dass sowohl die Kontinuität der Stent-Beschichtung als auch die Affinität des Wirkstoffs zum Gewebe für die zeitabhängige lokale Konzentration ausschlaggebende Faktoren sind [SAKHAROV et al., 2002]. Eine wichtige Rolle für die Homogenität der Dosierung des Medikaments in der Gefäßwand spielt darüber hinaus die Stent-Geometrie, d.h. die Position der einzelnen Stent-Streben [HOSE et al., 2004].

Bei der Anwendung beschichteter Stent-Systeme kommt es in jedem Fall zu nicht genau vorhersehbaren Konzentrationsgradienten in der Gefäßwand, deren Ausprägung stark von den auftretenden Diffusionskräften abhängig ist. Die größten lokalen Variationen treten bei hydrophoben Medikamenten auf, die im Vergleich zu hydrophilen Substanzen höhere mittlere Konzentrationen erreichen und besser ins Intimagewebe eindringen [HWANG et al., 2001].

1.4 Zellzyklus und Zellzyklusinhibitoren

Die In-Stent Restenose (ISR) beruht im Wesentlichen auf einer pathologischen Hyperplasie der Neointima und bildet daher zusammen mit Bypass-Atherosklerose und TransplantatVaskulopathie die Gruppe der vaskuloproliferativen Erkrankungen. Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sind die pathophysiologische Grundlage der ISR (vgl. Kapitel 1.2.2.2). Die Signaltransduktionswege, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen, sind vielfältig und z.T. redundant, konvergieren aber ausnahmslos in dem finalen Signal zur Einleitung der Zellteilung. Der Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke aller mitotischen Signaltransduktionswege beinhaltet daher entscheidende Zielstrukturen für die therapeutische Prävention vaskuloproliferativer Erkrankungen [SRIRAM und PETTERSON, 2001].

1.4.1 Der eukaryonte Zellzyklus

Werden quieszente Zellen mitogen stimuliert, so treten sie aus der G_0 -Phase in die G_1 -Phase ein und beginnen mit der Synthese und/oder Aktivierung bestimmter Proteine, die die nachfolgende DNA-Synthesephase (S-Phase) vorbereiten. Bevor eine Zelle in die S-Phase eintritt, passiert sie den Restriktionspunkt (R), nach dessen Überschreitung mitogene Stimuli zur weiteren Progression durch den Zellzyklus nicht mehr notwendig sind. Nach der DNA-Synthese durchläuft die Zelle eine kurze (G₂-)Phase, während der die Replikation der DNA auf Fehlerhaftigkeit überprüft und ggf. korrigiert wird. Ist die Replikation korrekt verlaufen, kommt es zur eigentlichen Karyo- und Cytokinese (M-Phase).

Die exakte Abfolge der Zellzyklusphasen wird durch das oszillierende Auftreten von Cyclinen zeitlich genau geregelt. Cycline sind aktivierende Untereinheiten einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's), die im monomeren Zustand inaktiv sind und deren Konzentrationen während des gesamten Zellzyklus weitgehend unverändert bleiben [SHERR, 1993]. Die transient aktiven heterodimeren CDK/Cyclin-Komplexe spielen eine zentrale Rolle bei der Progression des Zellzyklus durch die Phasen des Zellwachstums (G₁), der DNA-Replikation (S) und der Mitose (G₂/M). Alle Cycline besitzen mit der sogenannten "Cyclin-Box" einen homologen Bereich von 100 Aminosäuren, über den die Bindung an die verschiedenen CDK's erfolgt [MORGAN, 1995]. Bis heute sind in Säugern 10 verschiedene Cycline und 9 Partner-Kinasen (CDK 1-9) charakterisiert [KIM et al., 2000], von welchen die für diese Arbeit relevanten in Tabelle 1.1 aufgeführt sind.

Die Regulation der CDK-Aktivität erfolgt auf mehreren Ebenen. Eine Möglichkeit der Aktivierung beruht auf der Assoziation mit Cyclinen, eine weitere auf Phosphorylierungen der Kinase-Untereinheit des CDK/Cyclin-Holoenzyms. Diese werden i.d.R. durch CDK7/Cyclin H (= CDK-aktivierende Kinase) katalysiert [TASSAN et al., 1994]. Zu einer

18

Inaktivierung der Kinasekomplexe kommt es durch die Bindung endogener CDK-Inhibitoren (CKI) an die Cyclin-Untereinheit (vgl. Kapitel 1.4.2).

Protein	Zeitfenster	Funktion	Regulation
Cyclin Λ_{1}/Λ_{2}	S bis M Phase	CDK2-Aktivierung	TK-Ebene, PEST-
Cyclini A_1/A_2	5- DIS IVI-FILASE		Proteolyse
Cualin D.	Custin D C Dhose	CDK4- und CDK6-	TK-Ebene, PEST-
Cycliff D_{1-3}	U ₁ -Fliase	Aktivierung	Proteolyse
Cualin E	Cualin E S Phaga	CDV2 Altivianing	TK-Ebene, PEST-
Cyclin E S-Phase	CDK2-Aktivielulig	Proteolyse	
CDK2	C und S Dhaga	Steuerung der DNA-	Aktivierung durch
CDK2	O]- unu S-ritase	Reparaturmaschinerie	Cyclin A und E
	G. Dhasa	Ph Dhamhamilianung	Aktivierung durch
CDK4 G ₁ -Phase		Ko-r nospholynerung	Cycline D ₁₋₃
CDK6	C Phase	Dh Dhaanhardiarung	Aktivierung durch
CDK0	Ul-Fllase	Ko-r nosphorynerung	Cycline D ₁₋₃

 Tab. 1.1:
 Ausgewählte Cycline und CDK's und ihre Funktion [verändert nach PURI et al., 1999]

CDK = Cyclin-abhängige Kinase, TK = Transkription; PEST = Prolin-(P), Glutaminsäure-(E), Serin-(S) und Threonin-(T)-reiche Region als Signal für Abbau, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen; Rb = Retinoblastoma Protein.

Durch Steuerung der Biosynthese sowie des Abbaus können die in der Zelle vorliegenden Cyclin-Konzentrationen reguliert werden [PINES, 1995]. Der für die exakte Zellzyklusregulation elementare rasche Abbau erfolgt nach Markierung der Cyclin-Moleküle über den Ubiquitin-Proteosom-Pathway (= PEST-Proteolyse).

Nach mitogener Stimulation werden zunächst D-Typ-Cycline (Cyclin D₁₋₃) exprimiert, die im Verlauf der G₁-Phase akkumulieren und mit CDK4 sowie CDK6 Komplexe bilden [SHERR, 1994]. Sie sind das direkte Bindeglied zwischen den Wachstumsfaktoren und der Zellzyklusmaschinerie [LUKAS et al., 1996]. Eine Überexpression von Cyclin D₁ verkürzt die Dauer der G₁-Phase in (Ratten-)Fibroblasten und beschleunigt die G₁/S-Transition. Eine ausreichende Konzentration der Cycline D₁ und D₂ gilt als limitierender Faktor für den Eintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus [QUELLE et al., 1993; RESNITZKY et al., 1994]. Die Beobachtung, dass Zellen trotz fehlendem Cyclin D₁-Gen zur (embryonalen) Zellteilung fähig sind [SICINSKI et al., 1995] zeigt jedoch, dass die Funktion von D-Typ-Cyclinen möglicherweise durch später exprimierte Cycline übernommen werden kann [REDDY, 1999]. Für den Eintritt in sowie die Progression durch die S-Phase benötigt die Zelle die Aktivität von CDK2/Cyclin-Komplexen [FANG und NEWPORT, 1991]. Sie entstehen durch die Bindung von Cyclinen des E- und A-Typs, die somit direkt in die S-Phase-Transition involviert sind. Dabei erreicht die Cyclin E-Konzentration zu Beginn der S-Phase ihr Maximum [KOFF et al., 1992; DULIC et al., 1992], während Cyclin A-Level erst im Verlauf der S-Phase ansteigen und mit dem Eintritt in die G₂-Phase kulminieren [PINES und HUNTER, 1990]. In embryonalen Zellen bleibt Cyclin E über den gesamten Zellzyklus stabil in hoher Konzentration erhalten, während die Cycline des A-Typs nach Vollendung der Mitose degradiert werden [STRAUSFELD et al., 1996]. Aktivierte CDK/Cyclin-Komplexe phosphorylieren spezifisch nukleäre Substrate, häufig Transkriptionsfaktoren, die noch nicht vollständig bekannt sind. Ein wichtiges Substrat ist das Retinoblastoma-Genprodukt (Rb), das u.a. von CDK4/Cyclin D₁ in der mittleren bis späten G₁/S-Übergangsphase phosphoryliert wird [KNUDSEN und WANG, 1997]. An dieser Stelle des Zellzyklus passiert die Zelle den Restriktionspunkt (R) und die unwiderrufliche Entscheidung über Zellteilung oder Quieszenz wird getroffen [PARDEE, 1989]. Aus diesem Grund unterliegt die Überschreitung von R einer engen Kontrolle. Aktives Rb reprimiert die Expression zahlreicher Gene, deren Aktivität zum Eintritt in die S-Phase unentbehrlich ist und fungiert als wichtiger Tumorsuppressor [WEINBERG, 1995]. Die Regulation von Rb selbst funktioniert in erster Linie auf posttranskriptioneller Ebene über den Phosphorylierungsstatus. Wird die Zelle nicht mitogen stimuliert, befindet sich das Protein in unterphosphoryliertem Zustand (Rb) und reprimiert die Zellzyklusprogression durch Bindung und Inhibition des wichtigen Transkriptionsfaktors E2F. Durch Hyperphosphorylierung (pRb) wird das Protein inaktiviert, d.h. es gibt E2F frei und es kommt zur Transkription E2F-regulierter Gene, z.B. Cyclin E und des für die S-Phase-Progression essenziellen Enzyms Thymidinkinase [Dyson, 1998]. Während des restlichen Zellzyklus bleibt pRb in der hyperphosphorylierten Konfiguration erhalten, erst nach Beendigung der M-Phase entsteht von neuem die unterphosphorylierte Form [Weinberg, 1995].

Die Bedeutung des als eukaryonter Proliferationsmarker bekannten Proteins PCNA (= Proliferating Cell Nuclear Antigen) beruht auf zwei Funktionen, die es im Verlauf des Zellzyklus übernimmt. Zum einen wirkt es als Aktivator der δ -Untereinheit der eukaryonten DNA-Polymerase und ist sowohl in die DNA-Replikation als auch in Korrekturvorgänge während der S-Phase involviert [BRAVO et al., 1987; TOSCHI und BRAVO, 1988]. Zum anderen assoziiert PCNA mit verschiedenen CDK/Cyclin-Aggregaten und kann unter Bindung des Inhibitors p21^{cip1} zur Bildung quaternärer Komplexe führen [ZHANG et al., 1993].

20

1.4.2 CDK-Inhibitoren (CKI)

Die heterodimeren CDK/Cyclin-Komplexe können durch die Bindung endogener CDK-Inhibitoren (CKI) negativ reguliert werden. Im normalen Ablauf des Zellzyklus inhibieren diese kleinen Proteinmoleküle die CDK-Aktivität direkt nachdem diese ihre Funktion ausgeübt haben und sichern so die sequenzielle Aktivierung spezifischer CDK/Cyclin-Komplexe zu distinkten Zeitpunkten. Die Funktion von CKI ist in Säugerzellen gut untersucht und beinhaltet neben der Regulation des Zellzyklus auch Vorgänge der Differenzierung, die Aufrechterhaltung des postmitotischen Stadiums in terminal differenzierten Zellen und die Regulation der Zellteilung unter der Wirkung genotoxischer Stressfaktoren [PURI et al., 1999]. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und ihrer Spezifität werden CKI in zwei Gruppen eingeteilt: Die Mitglieder der cip/kip-Familie (universelle CKI) hemmen über die Bindung an verschiedene Cycline relativ unspezifisch alle G₁-Kinasen (CDK2, 4, 6). Zu ihnen gehören p21^{cip1}, p27^{kip1} und p57^{kip2}. Die zweite Familie wird als ink4-Familie (spezifische CKI) bezeichnet und besteht aus p15^{ink4B}, p16^{ink4A}, p18^{ink4C} und p19^{ink4D}. Diese Proteine inhibieren ausschließlich CDK4 und CDK6 [PURI et al., 1999].

1.4.2.1 p21^{cip1} (WAF1, cip1, Sdi1, Cap20, Pic1)

Als erstes CDK-interagierendes Protein (CIP) wurde p21^{cip1} in Cyclin A-, Cyclin D₁-, Cyclin E- und CDK2-Präzipitaten entdeckt [HARPER et al., 1993]. Das Mitglied der cip/kip-Familie bindet und inhibiert in nicht transformierten Zellen die Kinaseaktivität von CDK2/Cyclin A-, CDK2/Cyclin E- und CDK4/Cyclin D₁-Komplexen [XIONG et al., 1993]. Die Tatsache, dass die zellzyklusinhibierende Funktion von p21^{cip1} von dessen stöchiometrischem Verhältnis zu den vorhandenen CDK/Cyclin-Komplexen abhängt, erklärt die paradox erscheinende Präsenz des Moleküls in vielen CDK/Cyclin-Komplexen auch in proliferierenden Zellen. In normalen Fibroblasten z.B. bildet CDK2 zusammen mit seinem Cyclin, PCNA und p21^{cip1} guaternäre Komplexe, deren Aktivität vom stöchiometrischen Anteil der einzelnen Bestandteile abhängig ist [ZHANG et al., 1994]. Nur bei verstärkter Expression von p21^{cip1} und/oder durch Absenken der zellulären CDK/Cyclin-Konzentrationen kommt es zur Inaktivierung der Enzym-Komplexe [PURI et al., 1999]. Eine weitere Rolle von p21^{cip1} beruht auf der direkten Interaktion mit PCNA, die möglicherweise die PCNA-vermittelte Aktivierung der DNA-Polymerase δ und somit die DNA-Replikation inhibiert [ZHANG et al., 1994; WAGA et al., 1994]. Die Regulation der Expression von p21^{cip1} im Verlauf des Zellzyklus erfolgt auf transkriptioneller Ebene. Unter der Einwirkung genotoxischer Stressfaktoren wird p21^{cip1}

durch Bindung des Tumporsuppressors p53 an den cip1/WAF1-Promotor induziert [LEVINE, "Abpuffern" 1997] und blockiert durch ein der CDK/Cyclin-Aktivität die Zellzyklusprogression zum Zwecke der DNA-Reparatur [EL DEIRY et al., 1993]. Auch die normale Kopplung von S- und M-Phase wird durch p21^{cip1} und p53 gewährleistet, d.h. die Einleitung eines neuen Replikationszyklus vor Abschluss der laufenden Zellteilung (M-Phase) wird unterbunden. Zu einer p53-unabhängigen Expression von p21^{cip1} kommt es hingegen während der Seneszenz und terminalen Differenzierung verschiedener Zelllinien, u.a. bei murinen Muskelzellen [PARKER al., 1995].

Im Verlauf der atherosklerotischen Plaque-Progression kommt es in fortgeschrittenen Läsionen zu erhöhten zellulären p21^{cip1}-Konzentrationen. Dies deutet darauf hin, dass dieser CKI eine wichtige Rolle als endogener Regulator der VSMC-Proliferation im Rahmen von Reparaturprozessen in der Gefäßwand spielt [TANNER et al., 1998]. Die besondere Bedeutung von p21^{cip1} bei der Entstehung von (IS-)Restenosen unterstreicht eine Studie mit humanen Atherektomie-Präparaten. Im Vergleich zu Proben aus primären Stenosen enthalten restenotische Gewebe nach 367±61 Tagen signifikant erhöhte p21^{cip1}-Konzentrationen und belegen sowohl eine vorausgegangene VSMC-Proliferation als auch eine intakte Feedback-Inhibition derselben [BRAUN-DULLAEUS et al., 2003].

1.4.2.2 p27^{kip1}

Die Entdeckung von p27^{kip1} als Regulator des Eintritts in die S-Phase fand in kontaktinhibierten bzw. in durch TGF- β in G₁ arretierten humanen Zellen statt, die trotz der Präsenz von CDK2/Cyclin E-Komplexen keine Cyclin E-assoziierte Kinaseaktivität aufwiesen [POLYAK et al., 1994]. Mit einer Homologie von 44% besitzt p27^{kip1} eine ähnliche N-terminale (inhibitorische) Domäne wie p21^{cip1} und bindet ebenfalls die in der G₁-Phase präsenten CDK/Cyclin-Komplexe. Eine Überexpression von p27^{kip1} führt in vielen Zelllinien zum Arrest in der G₁-Phase, vermittelt durch die Bindung und Inaktivierung verschiedener Cycline [TOYOSHIMA und HUNTER, 1994]. Der Mechanismus der CDK-Inhibition durch p27^{kip1} wurde 1996 anhand der Struktur des ternären Komplexes aus p27^{kip1}/CDK2/Cyclin A aufgeklärt. Durch die Bindung von p27^{kip1} kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase-Untereinheit und daraufhin zu einer reduzierten Affinität zum Substrat ATP [Russo et al., 1996]. Dieses Modell gilt möglicherweise auch für die Hemmung weiterer Kinasen durch p27^{kip1} sowie für die anderen Mitglieder der cip/kip-Familie [PURI et al., 1999].

Zelluläre p27^{kip1}-Proteinkonzentrationen sind der Aktivität von CDK2/Cyclin E-Komplexen umgekehrt proportional und somit eine kritische Determinante für die G₁/S-Phase-Transition.

In einer Vielzahl von Zelllinien akkumuliert p27^{kip1} bei Quieszenz, bei mitogener Stimulation kommt es zu einer raschen Degradation des Proteins, während die mRNA-Konzentration im Verlauf des Zellzyklus häufig konstant bleibt [POLYAK et al., 1994]. Die antiproliferative Wirkung von Rapamycin (vgl. Kapitel 1.3.2.2) beruht auf der Prävention des mitogeninduzierten Abbaus von p27^{kip1} [SHERR und ROBERTS, 1995]. Im Gegensatz zu p21^{cip1} erfolgt die Regulation von p27^{kip1} also nicht in erster Linie auf transkriptioneller Ebene. Zum einen wird eine Regulation zellulärer p27^{kip1}-Konzentrationen auf der Ebene der Translation beschrieben [HENGST und REED, 1996]. Zum anderen wird das Molekül durch Ubiquitinylierung für einen raschen Abbau markiert und an Proteosomen gebunden, wo es durch effiziente Degradation zu einer Verminderung der HWZ kommt (post-translationelle Regulation). Die spezifische p27^{kip1}-Proteolyse ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus der CDK-Aktivität [PAGANO et al., 1995].

In gesunden Gefäßen wird p27^{kip1} konstitutiv exprimiert. Im porcinen Modell kommt es nach einer Verletzung zur Reduktion des Proteinspiegels und zu einer proliferativen VSMC-Antwort im betroffenen Gefäßabschnitt. Später steigen die p27^{kip1}-Konzentrationen wieder an und die proliferative Phase ist beendet [TANNER et al., 1998]. Der verletzungsinduzierte Abbau von p27^{kip1} führt zu einer erhöhten CDK2-Aktivität und ist damit ein wichtiger endogener Regulator des Eintritts glatter Gefäßmuskelzellen in die G₁-Phase des Zellzyklus [WEI et al., 1997].

1.4.3 Therapeutische Zielstrukturen

Die Modulation der CDK-Aktivität ist ein interessanter Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention in die Progression des Zellzyklus. Strategien zur direkten Hemmung dieser wichtigen Enzymkomplexe bedienen sich chemischer/synthetischer Inhibitormoleküle, die exakt an die ATP-Bindungsstelle der Kinase-Untereinheit passen [MEIJER und KIM, 1997]. Andere therapeutische Ansätze konzentrieren sich auf die Inhibition regulatorischer Signaltransduktionswege und beeinflussen die Aktivität der CDK's z.B. durch Regulation ihrer Expression oder der von Cyclinen und/oder inhibitorischen Molekülen (CKI). Durch Modulation der CDK-Phosphorylierung bzw. durch Inhibition der CDK-aktivierenden Kinase (CDK7) wird die Aktivität vorhandener Enzymkomplexe, durch Manipulation der Proteolyse dagegen ihr Abbau und somit die zelluläre Konzentration beeinflusst [SENDEROWICZ und SAUSVILLE, 2000]. Strukturelle Analysen der enzymatischen Zielstrukturen ermöglichen eine rasche Entwicklung über das Design immer effizienterer Inhibitormoleküle, die sowohl über eine kompetitive Hemmung der Bindung von ATP als auch über die Induktion von Konformationsänderungen am Enzym wirken [NOBLE et al., 2004].

1.4.4 CDK-Inhibition durch Flavopiridol (alvocidib, HMR1275, L86-8275)

Die Effizienz der CKI-vermittelten Inhibition zellulärer CDK/Cyclin-Komplexe führt zu der Hypothese, dass auch synthetische, nicht endogen in der Zelle vorkommende CDK-Inhibitoren in der Lage sein können, die pathologische Proliferation von Zellen zu inhibieren. Aufgrund des strukturellen Unterschieds der ATP-Bindungsstelle von CDK's (verglichen mit der anderer Kinasen) ist die spezifische Inhibition dieser wichtigen Enzyme eine der interessantesten Strategien zur therapeutischen Zellzyklusinhibition [GAY et al., 1999]. Flavopiridol ist der erste CDK-Inhibitor, der im Rahmen klinischer Studien getestet wird [SHAPIRO, 2004]. In der klinischen Onkologie wird Flavopiridol bereits erfolgreich

angewandt, die orale Applikation des Wirkstoffs in der experimentellen Kardiologie zur Inhibition der Neointimahyperplasie dagegen ist eine vergleichsweise neue Strategie [RUEF et al., 1999].

1.4.4.1 Präklinische und klinische Erkenntnisse

Flavopiridol ist ein potenter synthetischer, hochspezifischer CDK-Inhibitor, der sowohl in die Regulation der G_1 /S-Phase als auch der G_2 /M-Phase eingreift und in vielen Tumorzelllinien zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in G_1 bzw. G_2 führt [PATEL et al., 1998]. Der Mechanismus beruht auf einer kompetitiven Inhibition der Bindung von ATP ans aktive Zentrum der CDK's 1, 2, 4, 6 und 7 [DE AZEVEDO et al., 1996].

Präklinische Studien belegen die Inhibition der Proliferation von 60 Tumorzelllinien mit einem mittleren IC₅₀ von 66 nM bei einer Inkubation von 48 Stunden sowie eine potente CDK-Inhibition durch Flavopiridol mit IC₅₀-Werten zwischen 20 und 600 nM [SEDLACEK, 2001]. Als IC₅₀ bezeichnet man diejenige Wirkstoffkonzentration, bei deren Anwendung 50% der maximalen Wirkung einer Substanz erreicht werden. Eine Übersicht über verschiedene IC₅₀-Werte der Enzyminhibition durch Flavopiridol gibt Tabelle 1.2. Die Selektivität bezüglich der CDK's bestätigen die mehr als 10fach höheren IC₅₀-Werte für andere wichtige Kinasen wie z.B. ERK-1 und PKC [SEDLACEK, 2001; CHAO und PRICE, 2001].

In humanen MCF-7-Brustkrebszellen reduziert Flavopiridol die Cyclin D₁-mRNA-Synthese und induziert den Arrest der Zellen in G_1 bzw. an der G_2 /M-Transition [CARLSON et al., 1999].

Enzym/Komplex	IC ₅₀ [nM]
CDK1/Cyclin B	300-400
CDK2/Cyclin A	100
CDK2/Cyclin E	100
CDK4/Cyclin D	20-40
CDK6/Cyclin D	600
CDK7/Cyclin H	110-300
ERK-1	16 000
РКС	6 000

Tab. 1.2:Flavopiridol: IC50-Werte für verschiedeneCDK/Cyclin-Komplexe und andere Kinasen [verändert nachSEDLACEK, 2001]

ERK-1 = extrazellulär regulierte Kinase 1; PKC = Proteinkinase C

Das Wachstum verschiedener humaner Karzinomzellen wird durch Flavopiridol mit einem IC_{50} von 43-83 nM inhibiert. Zudem kommt es in diesen Zelllinien *in vitro* zur Induktion von Apoptose sowie im Mausmodell zu einer Reduktion der Größe entsprechender Tumoren von bis zu 70% nach 5 Tagen [PATEL et al., 1998].

In verschiedenen hämatopoetischen Tumorzelllinien der B-Zell- (SUDHL-4) oder T-Zell-Leukämien (Jurkat) kommt es durch die Wirkung von Flavopiridol ebenfalls zur Induktion von Apoptose [PARKER et al., 1998]. Diese ist jedoch stark abhängig von der behandelten Zelllinie sowie deren Proliferationsstatus [SENDEROWICZ und SAUSVILLE, 2000]. Im Rattenmodell beobachtet man 24 Stunden nach experimentell induzierter cerebraler Ischämie und Reperfusion unter der Wirkung hoher Flavopiridol-Dosen (bis 500 μ M) sogar eine signifikant reduzierte Zahl apoptotischer neuronaler Zellen [OSUGA et al., 2000].

Phase I-Studien mit intravenöser Flavopiridol-Verabreichung zeigen bei gleichzeitiger Therapie auftretender Diarrhöe und Hypotension eine tägliche maximal tolerierte Dosis (MTD) von 50-78 mg/m². Bei einer mittleren Halbwertszeit (HWZ) von 11,6 Stunden werden biologisch aktive Plasmakonzentrationen von 271-344 nM erreicht und bei einigen Patienten mit Prostata- und Nierenkrebs zeigt sich über einen Zeitraum von 6 Monaten eine Reduktion der Tumormasse [SENDEROWICZ und SAUSVILLE, 2000]. Aufgrund der leichten Membrangängigkeit des Moleküls ist davon auszugehen, dass unter diesen Umständen intrazelluläre Flavopiridol-Konzentrationen von über 300 nM erreicht werden [SEDLACEK et al., 2001].

Zusätzliche Phase I-Studien zur Optimierung des Applikationsrhythmus und zur Gabe als Kombinationstherapie mit anderen Cytostatika sowie klinische Phase II-Studien deuten eine synergistische Wirkung von Flavopiridol und Taxanen an [SHAPIRO et al., 2001]. Neuere Studien belegen die synergistische Wirkung von Flavopiridol gegen Magenkrebszellen in Kombination mit Docetaxel [MOTWANI et al., 2003] bzw. eine verstärkte Strahlenempfindlichkeit von Ovar-Krebszellen unter zusätzlicher Flavopiridol-Behandlung [RAJU et al., 2003].

25

1.4.4.2 Flavopiridol in der Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen

Flavopiridol hemmt die bFGF- und Thrombin-induzierte Proliferation humaner SMC der Aorta *in vitro* bereits in niedrigen Konzentrationen (75 nM) ohne messbare Beeinträchtigung der zellulären Viabilität [RUEF et al., 1999]. In einem murinen Angiogenese-Modell (Matrigel-System) kommt es unter der Wirkung von Flavopiridol zu einer verminderten Gefäßbildung und in der Folge zu verlangsamtem Tumorwachstum [KERR et al., 1999]. Bereits nanomolare Konzentrationen führen zu einer abgeschwächten Induktion des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF unter hypoxischen Bedingungen durch verminderte Stabilität der VEGF-mRNA in Monozyten [MELILLO et al., 1999]. Bei oraler Verabreichung einer Dosis von 5 mg/kg reduziert Flavopiridol *in vivo* die Neointimaformation 7-14 Tage nach einer Carotis-Verletzung im Rattenmodell um 35-39% [RUEF et al., 1999]. Neuere Untersuchungen belegen zusätzlich anti-inflammatorische Wirkungen von Flavopiridol u.a. durch Hemmung der Tumornekrosefaktor-induzierten NF-κB-Aktivierung [TAKADA und AGGARWAL, 2004].

Über die Wirksamkeit oraler oder lokaler Flavopiridol-Therapien zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen beim Menschen gibt es bislang keine publizierten Daten.

1.5 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)

Die wichtigsten Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen sind bekannt: Alter, Geschlecht und genetische Prädisposition sind im Gegensatz zum Rauchen, Dyslipidämien und Diabetes Mellitus nicht beeinflussbar. Etwa ein Viertel der Herzinfarkte und Schlaganfälle ist durch die Behandlung zu hoher Blutcholesterinwerte über eine regelmäßige Einnahme von Statinen vermeidbar. Dies ist die Aussage einer großen Plazebo-kontrollierten Studie (HPS = Heart Protection Study), die den Effekt von Simvastatin auf über 20000 KHK-Risikopatienten im Alter von 40-80 Jahren untersuchte (COLLINS et al., 2002). Selbst Probanden mit normalen Cholesterinwerten profitieren nachweislich von der Statintherapie [Packard et al., 1998].

1.5.1 Cholesterin-Biosynthese

Die Biosynthese des Cholesterins beginnt mit der Bildung von Acetoacetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA durch die enzymatische Wirkung der Thiolase (Acetyl-CoA-Acetyltransferase). Durch die Reaktion mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA kommt es zur Bildung von HMG-CoA (β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA), katalysiert durch HMG-CoA-Synthase. Im darauffolgenden Schritt wird das entstehende HMG-CoA durch die Wirkung von HMG-CoA-Reduktase unter Verbrauch von 2 NADPH zu Mevalonsäure reduziert. Später entsteht Cholesterol über die Zwischenstufen 5-Phosphomevalonat, 5-Pyrophosphomevalonat, Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat, Geranylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat, Squalen, Squalenepoxid und Lanosterin. Abb. 1.3 zeigt ein vereinfachtes Schema dieses Biosyntheseweges sowie die Hemmung der Mevalonat-Synthese durch die Wirkung von Statinen (vgl. Kapitel 1.5.2).



Die gerahmt dargestellten Intermediate Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) liefern Seitenketten zur posttranslationalen Modifikation wichtiger GTP-bindender Proteine (s. Kapitel 1.5.3). Durch die substratanaloge Wirkung von Statinen kommt es zur Inhibition der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion des Biosyntheseweges und in der Folge zu einer Hemmung der Bildung von Cholesterin sowie verschiedener Isoprenoide (u.a. FPP und GGPP).

1.5.2 Wirkung von Statinen auf die Cholesterin-Biosynthese

Der Cholesterin-Biosyntheseweg kann in einem frühen Stadium durch die kompetitive Inhibition des Schlüsselenzyms HMG-CoA-Reduktase unterbrochen werden.

Statine (= HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) wirken hierbei als Substratanaloga, die mit β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA um die Bindung ans aktive Zentrum reversibel konkurrieren. Die Inhibition des Enzyms führt nicht nur zur Reduktion der Endprodukte (Cholesterin und Cholesterinester), sondern auch zur verringerten Verfügbarkeit aller Zwischenprodukte des Syntheseweges, die jenseits der inhibierten Reaktion liegen. Viele dieser Intermediate sind Bestandteile zellulärer Signaltransduktionswege, während Cholesterin selbst die Expression zahlreicher Gene über SREBP's (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins = cholesterinregulierte Transkriptionsfaktoren) beeinflusst [BROWN und GOLDSTEIN, 1999].

Statine gelten als Mittel erster Wahl zur medikamentösen Cholesterinsenkung bei Patienten mit Hypercholesterinämie und/oder KHK. Klinische Studien zur Primärprävention mit Pravastatin (WOSCOPS = West Of Scotland COronary Prevention Study) sowie Lovastatin (AFCAPS/TexCAPS = Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study) belegen eine Reduktion von LDL und Cholesterin im Plasma sowie eine signifikante Abnahme koronarer Ereignisse in Patienten mit Hypercholesterinämie und Atherosklerose [SHEPHERD et al., 1995; DOWNS et al., 1998]. Diese Lipid-abhängigen Effekte verlangsamen die Atherosklerose-Progression, die zumindest teilweise von der Aufnahme modifizierten LDL's in den Plaque abhängig ist [Ross, 1993].

1.5.3 Isoprenylierte Proteine

Die Isoprenylierung durch FPP oder GGPP ermöglicht eine kovalente Bindung des modifizierten Proteins an die Zellmembran über den Isoprenoidrest als Lipidanker und somit eine präzise Regulation der intrazellulären Lokalisierung [ADAMSON et al., 1992]. Substrate dieser Reaktionen sind u.a. Mitglieder der Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine, die in die Ras-, Rho- und Ran-Familien unterteilt werden. Dabei fungieren Proteine der Ras-Familie als Transkriptionsfaktoren, Rho-Proteine beeinflussen sowohl die Expression als auch die Reorganisation von Proteinen des Cytoskeletts, während die Mitglieder der Ran-Familie nucleocytoplasmatische Transportprozesse während des Zellzyklus regulieren [HALL, 1998; TAKAI et al., 2001]. Jedes einzelne Mitglied übt in der Zelle eine spezielle Funktion aus, meist über die Induktion spezifischer Gene zur Steuerung der Proliferation, Migration, Differenzierung, Morphologie und Apoptose [TAKAI et al., 2001].

Für kardiovaskuläre Erkrankungen scheint Rho eine bedeutende Rolle zu spielen. Viele cholesterinunabhängige Statin-Effekte beruhen auf der Hemmung der Geranylgeranylierung dieses Proteins, das unter normalen Umständen die Expression des vasokonstriktiv wirksamen

Faktors Endothelin-1 induziert [LAUFS und LIAO, 2000]. Eine intraperitoneale Verabreichung des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 hemmt im Rattenmodell die Neointimaformation nach Gefäßverletzung, wahrscheinlich durch Apoptoseinduktion und Hemmung der Migration glatter Gefäßmuskelzellen, ohne negativen Einfluss auf Vorgänge der Reendothelialisierung. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der kleinen GTP-bindenden Proteine in der Pathogenese der Neointimahyperplasie [SHIBATA et al., 2001].

1.5.4 Pleiotrope Statineffekte

Auch KHK-Patienten mit durchschnittlichem Serum-Cholesterinspiegel profitieren von einer Langzeit-Behandlung mit Pravastatin und haben im Vergleich zu gleichaltrigen Plazebo-Rezipienten ein verringertes Risiko koronarer Ereignisse, nachgewiesen z.B. im Rahmen der WOSCOPS- und CARE- (= Cholesterol And Recurrent Events) Studien [PACKARD et al., 1998; SACKS et al., 1996]. Im Rahmen der MIRACL-Studie (= Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) kam es im Verlauf einer nur viermonatigen hochdosierten Therapie mit Atorvastatin bei den behandelten Patienten zu einer signifikanten Reduktion ischämischer Ereignisse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Ergebnis kann aufgrund der kurzen Dauer der Behandlung nicht auf eine therapeutisch relevante Reduktion der Plasma-Cholesterinspiegel zurückgeführt werden, sondern beruht auf pleiotropen, cholesterinunabhängigen Effekten des Statins [SCHWARTZ et al., 2001; KINLAY et al., 2003]. Die Studien belegen einen protektiven Effekt von Statinen, der nicht allein auf der Reduktion des Serum-Cholesterinspiegels, sondern zusätzlich auf anderen Wirkungen dieser Substanzklasse beruht. Diese Erkenntnisse eröffnen den Statinen eine bedeutendere Bandbreite der therapeutischen Applikation, als bisher angenommen, manche sprechen sogar vom "neuen Aspirin" [VEILLARD und MACH, 2002].

Pleiotrope Statineffekte werden über die Hemmung der Bildung wichtiger Isoprenoid-Zwischenstufen der Cholesterin-Biosynthese, z.B. Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) vermittelt [GOLDSTEIN und BROWN, 1990].

Ein positiver Einfluss auf die Endothelfunktion, eine proliferationsinhibierende Wirkung sowie anti-aggregatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften sind wohl die wichtigsten direkten Effekte dieser Substanzklasse, die alle auf einer fehlenden oder reduzierten Isoprenylierung intrazellulärer Signalmoleküle, v.a. Rho, Ras und Rac beruhen [TAKEMOTO und LIAO, 2001].

29

Das vaskuläre Endothel dient als wichtiges autokrines und parakrines Organ, das die kontraktile Funktion der Gefäßwand reguliert. Endotheliale Dysfunktion ist eines der frühesten Anzeichen von Atherosklerose, das vor den ersten klinischen Symptomen auftritt [LIBBY et al., 1997]. Sie äussert sich in einer verminderten Synthese und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), das im gesunden Gefäß wichtige Funktionen erfüllt. NO sorgt für die Gefäßrelaxation, hemmt sowohl Plättchenaggregation als auch VSMC-Proliferation und -Migration und verhindert die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten [IGNARRO et al., 1988; GARG und HASSID, 1989; RADOMSKI et al., 1992; GAUTHIER et al., 1995]. Statine erhöhen die NO-Bioverfügbarkeit durch Induktion und Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) [LAUFS et al., 1998]. Die Induktion des Enzyms erfolgt dabei u.a. über eine Rho-abhängige Stabilisierung der eNOS-mRNA [LAUFS und LIAO, 1998].

Die Rolle inflammatorischer Vorgänge bei der Entstehung der ISR ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Ihre Bedeutung für die Pathogenese der ISR verglichen mit der primären Atherosklerose scheint jedoch geringer zu sein. Eine Untersuchung humaner Atherektomie-Präparate aus IS-Restenosen und primären atherosklerotischen Läsionen zeigt eine verminderte Präsenz von Makrophagen in restenotischem Gewebe (24%) im Vergleich zur primären Atherosklerose (60% der Proben) [SKOWASCH et al., 2004]. Das vereinzelte Auftreten von Makrophagen im Bereich der Stent-Streben wird mit inflammatorischen Reaktionen auf die Gefäßverletzung und/oder das Stent-Material in Verbindung gebracht [MORENO et al., 1999; FARB et al., 1999].

Statine besitzen anti-inflammatorische Wirkungen und führen zu einer reduzierten Präsenz von Makrophagen und T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques [VAUGHAN et al., 2000]. Im Rahmen großer klinischer Studien (z.B. CARE, AFCAPS/TexCAPS) zeigte sich zudem eine Reduktion des Plasmaspiegels von hs-CRP (high sensitive C-Reactive Protein), einem Marker für systemische Inflammation [RIDKER et al., 2001].

Diese Ergebnisse belegen eine effektive Verminderung vaskulärer sowie systemischer Entzündungsreaktionen durch die Wirkung von Statinen, die v.a. im Bereich der Stent-Streben positive Auswirkungen auf den Heilungsprozess haben könnte.

1.5.5 Cerivastatin (Lipobay[®], Baycol[®], BAYw6228)

Die Geschichte der Statine begann 1987 mit der Genehmigung der klinischen Anwendung des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin in den USA [The Lovastatin Study Group II, 1986]. Die Nobelpreisgewinner des Jahres 1985 BROWN und GOLDSTEIN erkannten die
Bedeutung der Statine für die Behandlung von Hypercholesterinämie-Patienten [GOLDSTEIN und BROWN, 1990]. Im Jahr 1997 kam mit dem vollsynthetischen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cerivastatin das sechste Mitglied dieser Substanzklasse auf den Weltmarkt (Firma Bayer AG, Leverkusen).

Dieses Statin ist ein Pyridin-Derivat, liegt als Natriumsalz in der physiologisch aktiven, offenen Ringform vor und hat die Summenformel C₂₆H₃₄FNO₅Na bei einem Molekulargewicht von 481,5 g/Mol [BISCHOFF et al., 1998]. Cerivastatin ist sehr gut wasserlöslich (> 195 g/l bei 25°C) und wird vom Körper zu über 98% sofort absorbiert. Maximale Plasmakonzentrationen treten 2-3 Stunden nach oraler Einnahme auf, die HWZ im Körper beträgt 2-3 Stunden. Der Abbau erfolgt oxidativ über Cytochrom P₄₅₀ in der Leber [MUCK, 2000]. Neben der breiten therapeutisch wirksamen Konzentrationsspanne ist eine hohe Bioverfügbarkeit von ca. 60% der wichtigste Vorteil der Substanz [PLOSKER et al., 2000]. Cerivastatin ist durch seine hohe Affinität zur HMG-CoA-Reduktase etwa 100fach potenter als andere bekannte Statine. Die HMG-CoA-Reduktase einer nativen Mikrosomenfraktion aus Rattenleber wird durch Cerivastatin mit einem K_i-Wert von 1,3·10⁻⁹ mol/l inhibiert (K_i für Lovastatin: 150·10⁻⁹ mol/l) [BISCHOFF et al., 1997].

Neben lipidsenkenden Eigenschaften durch Hemmung der Cholesterin-Biosynthese besitzt Cerivastatin eine Reihe cholesterinunabhängiger (pleiotroper) Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene (vgl. Kapitel 1.5.4). Das Medikament ist in der Lage, die Endothelfunktion zu verbessern, wirkt anti-inflammatorisch, antioxidativ, anti-koagulierend, anti-thrombotisch, antiproliferativ, Plaque-stabilisierend sowie immunmodulatorisch [SIEGEL-AXEL, 2003].

Zahlreiche große randomisierte Studien mit oralen Cerivastatin-Gaben zwischen 0,1 und 0,4 mg/Tag demonstrieren eine dosisabhängige Reduktion der Plasma-LDL-Cholesterin-Konzentration um 14,2-36,1% [STEIN, 1998; BETTERIDGE, 1999]. Damit ist Cerivastatin bislang der wirksamste und zudem kostengünstigste HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor [BETTERIDGE, 1999; MCPHERSON et al., 2001]. Im August 2001 wurde Cerivastatin aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Lipidsenker Gemfibrozil (= Lopid[®]), der ebenfalls über Cytochrom P₄₅₀ abgebaut wird, vom Markt zurückgezogen. Aufgrund dieser Entscheidung ist bis heute eines der potentesten zellulär und molekularbiologisch wirksamen Medikamente weder in den USA noch in Europa zur systemischen Therapie von Hyperlipidämien zugelassen [Siegel-Axel, 2003].

Die Ziele der wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation sind (vgl. Abb. 1.4):

- Analyse der zellzyklusinhibitorischen Wirkung zweier auf dem Gebiet der Stent-Beschichtung neuartiger Medikamente mit dem Ziel der Aufklärung relevanter Wirkmechanismen in humanen koronaren glatten Gefäßmuskelzellen sowie koronaren Endothelzellen.
- Definition der therapeutischen Breite dieser Wirkstoffe über Untersuchungen zur Toxizität und Apoptoseinduktion in den relevanten Zelllinien.
- *In vitro*-Analyse eines beschichteten Stent-Systems zur Ermittlung kinetischer Freisetzungsdaten sowie Beurteilung der biologischen Effekte freigesetzter Substanzmengen.
- Untersuchung der Sicherheit der Anwendung dieses Stent-Systems im Tiermodell sowie dessen Effizienz zur Verminderung der Neointimahyperplasie als pathoanatomische Grundlage der In-Stent Restenose.



Abb. 1.4: Vorgehensweise und Ziele der Dissertation

2 MATERIAL & METHODIK

2.1 Humane Zelllinien und deren Kultivierung

Humane koronare arterielle glatte Muskelzellen (CASMC; #CC-2583) und humane koronare arterielle Endothelzellen (CAEC; #CC-2585) wurden von der Firma Cambrex, East Rutherford, NJ bezogen. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um Primärzellen, welche die Situation im humanen Gefäß und deren molekulare Grundlagen in vitro bestmöglich simulieren. Die Zellen werden firmenbestimmt in Passage 3 geliefert und für die vorliegende Arbeit in Passagen bis maximal 8-10 verwendet. CASMC wurden in Smooth Muscle cell Basal Medium derselben Firma (SmBM[®], #CC-3181) kultiviert, CAEC in Endothelial cell Basal Medium (EBM-2[®], #CC-3156). Die Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit speziellen Wachstumsfaktoren, Antibiotikum sowie FCS supplementiert (SmGM[®], #CC-4149 bzw. EGM-2[®], #CC-4176). Die Bestandteile der Supplement-Kits werden von der Herstellerfirma qualitativ bekanntgegeben: SmGM[®] enthält Insulin, hFGF-B, Gentamycin und hEGF sowie FCS (25 ml, f.c. 5%), EGM-2[®] beinhaltet Hydrocortison, hFGF-B, VEGF, modifiziertes IGF (R³-IGF), Ascorbinsäure, hEGF, Gentamycin, Heparin und 10 ml FCS (f.c. 2%). Die Dauer eines Zellzyklus wird vom Hersteller für CASMC mit 15-48 Stunden, für CAEC in der logarithmischen Wachstumsphase mit ca. 17 Stunden angegeben [Quelle: MSDS, Cambrex]. Alle 2-3 Tage erfolgte routinemäßig ein Mediumwechsel, bei Erreichen von ca. 80-90% iger Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet. Hierzu wurden der Zellrasen mit HBSS (Hepes-gepufferte Saline-Lösung) gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C ca. 1 Minute inkubiert und die Trypsinierungsreaktion mittels Zugabe eines äquivalenten Volumens TNS (= Trypsin-neutralisierende Lösung) gestoppt. Die Suspension wurde mit 1000 rpm 5 Minuten bei RT zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Kendro, Asheville, NC; Ausschwingrotor, #7570E, Heraeus), die Zellen in 5-10 ml SmBM[®] resuspendiert und ausplattiert. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind bei der Firma Cambrex erhältlich (Reagent Pack, #CC-5034). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in HeraCell-Brutschränken (Kendro, #51008331).

Das Einfrieren der Zellen erfolgte unter Zugabe von 10% DMSO im NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene/Nunc-International, Rochester, NY, #5100-0001) bei −70°C (24 Stunden), danach wurden die Zellen bei −196°C gelagert.

2.2 Testsubstanzen: Eigenschaften und Lagerung

2.2.1 Flavopiridol (alvocidib, HMR1275, L86-8275)



Abb. 2.1: Flavopiridol

Flavopiridol (= [(-)Cis-5,7-dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8[4-(3hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-Benzopyran-4-on]; Abb. 2.1) ist ein synthetischer, hochspezifischer CDK-Inhibitor der Firma Hoechst (#HMR1275, Marion Roussel, Aventis, Strasbourg, France) der strukturell eng mit einem natürlich vorkommenden Pflanzenalkaloid aus der Rinde des indischen Baumes *Dysoxylum binectariferum* (Meliaceae) verwandt ist [SEDLACEK, 2001]. Bei

einem Molekulargewicht von 438 g/Mol enthält es zwei asymmetrische Kohlenstoffatome, sodass die Synthese, ausgehend von 1,3,5-Trimethoxybenzol stereoselektiv ablaufen muss. Die chemische Synthese ist im Kilogramm-Maßstab möglich. Flavopiridol ist gut wasserlöslich (< 71 mg/ml) und sehr stabil: Sauerstoff, Licht oder Temperaturen bis 75°C sowie pH-Werte von 2,0 bis 8,0 haben keinen Einfluss auf die Integrität der Substanz. Die Lagerung erfolgte geschützt vor Feuchtigkeit bei RT (Feststoff) bzw. bei -20°C (10 mM Stammlösung in sterilem H₂O).

2.2.2 Cerivastatin (Lipobay[®], Baycol[®], BAYw6228)



Abb. 2.2: Cerivastatin

Cerivastatin (Abb. 2.2) ist ein synthetischer, hochpotenter, enantiomerenreiner HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor der Firma Bayer AG, Leverkusen mit einem Molekulargewicht von 481,5 g/Mol und der chemischen Formel (+)-(3R,5S,6E)-7-[4-(p-Fluorphenyl)-2,6diisopropyl-5-(methoxymethyl)-3-pyridyl]-3,5-dihydroxy-

6-Heptenoat. Die Substanz ist fast unbegrenzt in Wasser löslich (> 50 mg/ml), sehr hygroskopisch und wurde daher geschützt vor Feuchtigkeit bei RT (Feststoff) bzw. bei -20° C (10 mM Stammlösung in H₂O) aufbewahrt.

2.2.3 Weitere Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Andere verwendete Chemikalien, Reagenzien und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO bezogen:

BSA (= Bovines Serumalbumin, #T844.3, Roth, Karlsruhe), Dimethylsulfoxid (#D-8418), DTT (= 1,4-Dithio-DL-threitol, 1 M wässrige Lösung, #43816, Merck), EDTA (= Ethylendiamin-Tetraessigsäure, #E-9884), EGTA (= Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, #E-4378), Farnesyl-Pyrophosphat (= FPP, #F-6892), FeSO₄- (#F-7002), Geranylgeranyl-Pyrophosphat (= GGPP, #G-6025), Glycerol (#G-7757), Glycin (#G-8790), H₂O₂ (30% ige Lösung = Perhvdrol[®], #1.07210, Merck, Darmstadt), H₂SO₄ (1M, #1.09072. Kristallviolett (= Hexamethyl-p-Rosanilinchlorid, Merck), #C-6158), Magermilchpulver (#A0830, AppliChem, Darmstadt), Methanol (#8045, J.T. Baker, Deventer, Holland), Na-Bromphenolblau (#12370, United States Biochemical Corp., Cleveland, OH), NaCl (#378860, Merck), NaF (#450022, Merck), Na₄P₂O₇ (#P-8010), Na₃VO₄ (= Na-Orthovanadat, #450243, Merck), NP-40 (= Nonidet[®]P-40, #74385, Fluka), PBS (#D-8537), PDGF (= Platelet Derived Growth Factor, #P-3201), PMSF (= Phenylmethylsulfonylfluorid, #P-7626), Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC, #P-8340), SDS (20% wässrige Na-Dodecylsulfat-Lösung, #54661, Biomol, Hamburg), Tris-Base (= Trizma[®] BASE, #T-1503), Tris-HCl (= Trizma[®] Hydrochloride = $C_4H_{11}NO_3$ ·HCl, #T-3253), TritonX-100 (#X-100), Tween[®]20 (= Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat, #P-1379), VEGF (= Vascular Endothelial Growth Factor, Bestandteil aus EGM-2[®], #CC-4176, Cambrex, East Rutherford, NJ).

2.3 Quantifizierung der Proliferationrate

In dieser Arbeit wurden zur Quantifizierung der zeit- bzw. konzentrationsabhängigen Inhibition der Zellteilung sowohl cytologisch-visuelle als auch molekularbiologische Methoden angewandt. Die Zellzyklusdistribution wurde durch FACS-Analyse ermittelt.

2.3.1 Proliferationsassay und Zellzählung

Die Zählung vitaler Zellen ist eine der zuverlässigsten Methoden, die Proliferation sowie morphologische Veränderungen der Zellen über die Zeit zu dokumentieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür 60000 CASMC bzw. CAEC in 6well Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag in voll supplementiertem Medium mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen inkubiert. Zur Bestimmung einer zeitlichen Abhängigkeit der Proliferationsinhibition durch den Wirkstoff wurden die Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden mikroskopiert, 4 Zufallsansichten pro Ansatz fotodokumentiert (Kamera: AxioCam, Zeiss, #412-312; Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss; Vergrößerung: 100x) und die adhärenten Zellen manuell ausgezählt. Zur Analyse morphologischer Veränderungen wurden die Zellen am Ende des Experiments mit 1,5% Kristallviolett in PBS 10 Minuten gefärbt.

2.3.2 BrdU-Inkorporations-ELISA

Basierend auf der Quantifizierung der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen mittels Messung der Inkorporation des Thymidin-Analogons BrdU (= 5-Brom-2'-deoxyuridin) wurde die Proliferationsrate von CASMC und CAEC auf molekularer Ebene bestimmt. Der kolorimetrische Immunoassay wurde 1985 von PORSTMANN entwickelt [PORSTMANN et al., 1985], ist heute bei Roche, Mannheim erhältlich (Colorimetric Cell Proliferation ELISA, #1647229) und wurde weitgehend nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Bestimmung der prozentualen Inhibition der Proliferation wurden 1000 CASMC bzw. 2000 CAEC pro well in 96well-Platten ausgesät und am nächsten Tag bei etwa 20% iger Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Alle Inkubationen erfolgten in voll supplementiertem Medium. Ansätze ohne Zugabe der Testsubstanz mit und ohne mitogener Stimulation dienten als Kontrollen. Nach 24 Stunden Vorinkubation erfolgte die Zugabe von BrdU (f.c. = 10μ M) zur Markierung der neusynthetisierten DNA über einen Zeitraum von 16 Stunden (BrdU-Puls). Nach der Markierungsphase wurde die zelluläre DNA denaturiert und fixiert (30 Minuten, RT) und das anstelle von Thymidin integrierte BrdU durch Bindung des monoklonalen anti-BrdU-POD-Antikörpers markiert (1 Stunde). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe der Substratlösung (TMB = Tetramethylbenzidin) für 5-10 Minuten. Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von ¹/₄ v/v 1M H₂SO₄ gestoppt, die Messung im ELISA-Reader (Biotrak II visible plate reader version 1.3, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, #80-2115-80) erfolgte sofort bei einer Absorptions-Wellenlänge von 450 nm (Ref. λ = 690 nm). Zur Quantifizierung der Proliferationsinhibition wurden die Werte (abzüglich Hintergrund, d.h. Kontrollansatz ohne BrdU) in % der mitogen stimulierten Kontrolle angegeben.

2.3.3 FACS-Zellzyklusanalyse

Die FACS-basierte Analyse der Zellzyklusdistribution unter dem Einfluss verschiedener Wirkstoffe wurde als Dreifachbestimmung im 6well-Maßstab durchgeführt. Das supplementierte SmBM[®]/EBM-2[®] wurde zusätzlich mit 10 ng/ml PDGF (CASMC) bzw. 1 μ l/ml VEGF (CAEC) angereichert. Proliferierende, nicht synchronisierte Zellen wurden für 24 Stunden unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. Die Zellernte erfolgte

durch Trypsinieren (analog Kapitel 2.1), die Pellets wurden mit HBSS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.

Zur Zellzyklusanalyse wurde der CycleTESTTM PLUS Reagent Kit von Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, #340242) nach den Herstelleranweisungen benutzt. Nach dem Auftauen wurden die Zellpellets in Citratpuffer gewaschen und in 200 µl Trypsin-haltigem Detergens-Puffer (Lösung A) resuspendiert. Während der 10minütigen Inkubation bei RT wurden durch das nichtionische Detergens die Zellmembranlipide solubilisiert und durch das enthaltene Trypsin das Cytoskelett sowie nukleäre Proteine eliminiert. Die zelluläre RNA wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge Lösung B (Trypsin-Inhibitor und Ribonuklease A in Citratpuffer) enzymatisch degradiert (10 Minuten, RT). Das nukleäre Chromatin wurde während beider Reaktionen durch Spermin-Tetrahydrochlorid stabilisiert. Im letzten Schritt wurden 100 µl Propidium Iodid (PI) in Citratpuffer (Lösung C) zugegeben (f.c. 125 µg/ml) und während einer 10minütigen Inkubation (4°C, lichtgeschützt) stöchiometrisch an die gereinigten, isolierten Zellkerne gebunden, die dann durchflusszytometrisch gemessen wurden (FACSCalibur; CELLQuestTM-Software, Version 3.3, Becton Dickinson). PI-gefärbte Zellkerne emittieren Fluoreszenzsignale zwischen 580 und 650 nm, die vom Cytometer über den FL2-Kanal (585/42 Bandpass-Filter) aufgezeichnet werden können. Nach der Messung von 10000 Zellen pro Ansatz erfolgte die Software-basierte quantitative Auswertung der FL2-DNA-Histogramme unter Verwendung von ModFit*LT*[™] 3.0, Verity, Topsham, ME.

2.4 Untersuchung der Migration

Die zelluläre Migration ist ein fundamentaler Prozess, der im Organismus bei der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Wundheilung, Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt. Auslöser für migratorische Ereignisse können verschiedene Faktoren sein, darunter Proteine der extrazellulären Matrix (ECM). Ein solches Matrixprotein ist das hochmolekulare Glykoprotein Fibronektin (FN), das sowohl in der ECM als auch im Blutplasma vorhanden ist. Für Tumorzellen ist bekannt, dass erhöhte Zellmigration im Boyden-Kammer-System mit einer Steigerung der invasiven Aktivität in vivo korreliert [KLEMKE et al., 1998]. Da bei der Entstehung der Neointimahyperplasie die Migration von CASMC eine bedeutende Rolle spielt, wurde der inhibitorische Einfluss der Testsubstanzen auf deren migratorische Aktivität in vitro getestet. Demgegenüber sollte die Migration von CAEC möglichst nicht negativ beeinflusst werden, da der Vorgang der Reendothelialisierung auf der Migration (und Proliferation) dieser Zellen beruht.

2.4.1 Boyden-Kammer-Assay

Die Untersuchungen zur Hemmung der Migration durch die Testsubstanzen wurden in einem Boyden-Kammer-System der Firma Chemicon, Temecula, CA (QCMTM-FN Quantitative Cell Migration Assay, #ECM500) durchgeführt. Der Kit beinhaltet FN-beschichtete 24well-Platten sowie Boyden-Kammern (vgl. Abb. 2.3), die auf der Unterseite mit einer porösen Membran verschlossen sind (Porengröße: 8 µm). Die Zellen haben in ausplattiertem Zustand einen mittleren Durchmesser von ca. 20-80 µm, quieszente, langgestreckte CASMC können bei



einer Breite von ca. 15 μm auch bis zu 120 μm lang sein [Information Firma Cambrex]. Zellen beider Linien sind in der Lage, durch Poren ab 3 μm Durchmesser zu migrieren.

Analog zur Zellgröße wurden je 30000 CASMC bzw. 50000 CAEC in serumreduziertem Medium ins Innere der Boyden-

Kammern ausplattiert und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen inkubiert. Der FN-Gradient regt die Zellen zur Transmigration an (Haptotaxis). Nach 18 Stunden wurden die nicht migrierten Zellen (im Innern der Boyden-Kammer) durch Wischen mit einem Wattestäbchen entfernt und die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran 30 Minuten mit Kristallviolett-Lösung (Cell Stain Solution, #20294) selektiv gefärbt.

2.4.2 Zellzählung

Nach der Färbung wurden die Boyden-Kammern in ddH₂O gewaschen, die Zellen auf jeder Membran wurden fotodokumentiert (vier Zufallsansichten; Vergrößerung: 100x) und manuell ausgezählt. Die Migrationsrate wurde in % der unbehandelten Kontrolle (ohne Testsubstanz) angegeben.

2.4.3 Fotometrische Messung

Zur fotometrischen Quantifizierung der Migrationsrate wurden die Membranen in je 300 µl Extraktionspuffer (#20295; Gemisch aus Methyl-, Ethyl- und Isopropyl-Alkohol; Auskunft

Firma Chemicon) entfärbt und die optische Dichte von je vier 50 μ l Proben ermittelt ($\lambda = 550$ nm). Die Absorption korreliert dabei direkt mit der Anzahl der migrierten Zellen. Die Migrationsrate wurde in % der unbehandelten Kontrolle (ohne Testsubstanz) angegeben.

2.5 Cytotoxizität und Apoptose

Cytotoxische Effekte führen zu einer Verletzung der Zellintegrität, zu einer sukzessiven Freisetzung cytosolischer Komponenten und in der Folge zum Verlust zellulärer Funktionen bis hin zum Zelltod. Die Verletzung der Cytoplasmamembran kann sehr einfach durch den Nachweis verschiedenster freigesetzter Substanzen (u.a. Enzymaktivitäten) quantifiziert werden und ist dem Ausmaß des Zelltods direkt proportional. Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein stabiles cytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt und nach Beschädigung der Zellmembran rasch in den Überstand freigesetzt wird.

Anders als der cytotoxisch bedingte Zelltod ist die Apoptose ein im vielzelligen Organismus auch unter natürlichen Bedingungen ablaufender Vorgang. Unter Apoptose versteht man den genetisch von der Zelle autonom kontrollierten "programmierten Zelltod" als Reaktion auf entsprechende Signale. Morphologisch zeichnen sich apoptotische Zellen u.a. durch eine Komprimierung des Chromatins, die Fragmentierung der DNA und die Bildung von Apoptose-Körperchen aus.

2.5.1 LDH-Freisetzung

Zur Quantifizierung potenziell toxischer Eigenschaften der getesteten Wirkstoffe wurde ein kolorimetrischer LDH-Aktivitätstest eingesetzt (Colorimetric Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche, Mannheim, #1644793). Überstände der mit den Testsubstanzen über einen breiten Konzentrationsbereich inkubierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 Minuten, 4°C) zellfrei gemacht und bis zur Durchführung des Tests bei 4°C gelagert. Bei dieser Temperatur bleibt die LDH-Aktivität über mehrere Tage erhalten. Dieselbe Anzahl Zellen wurde durch kurze Behandlung mit 1% (v/v) TritonX-100 lysiert und die LDH-Freisetzung als maximal (100%) angenommen.

100 μ l des zellfreien Überstands wurden mit 100 μ l Reaktionsmix inkubiert. Im Reaktionsmix enthalten ist NAD⁺, das bei der Oxidation von Lactat zu Pyruvat (durch LDH) als Cofaktor dient und im selben Schritt zu NADH + H⁺ reduziert wird. In einem zweiten Reaktionsschritt (katalysiert durch das bakterielle Enzym Diaphorase) wird H/H⁺ von NADH + H⁺ auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen und reduziert dies zu einem roten Formazansalz, das fotometrisch nachgewiesen werden kann ($\lambda = 492$ nm, Ref. $\lambda = 620$ nm). Die Bildung von Formazan ist der LDH-Aktivität im Überstand direkt proportional.

2.5.2 Apoptose

Potenziell apoptoseinduzierende Effekte der Testsubstanzen wurden unter Verwendung des ssDNA-Apoptose-ELISA Kits der Firma Chemicon, Temecula, CA (#APT225), weitgehend nach vorliegendem Standardprotokoll untersucht.

Das Prinzip des Testsystems beruht auf der selektiven Denaturierung von DNA in apoptotischen (nicht in nekrotischen) Zellen nach Behandlung mit Formamid. Die erhöhte Formamid-Sensitivität der DNA apoptotischer Zellen beruht in erster Linie auf der charakteristischen Veränderung des Chromatins durch Kondensation sowie durch den Abbau stabilisierender Proteine. Die denaturierte DNA wurde über die Bindung eines monoklonalen Antikörpers gegen Einzelstrang-DNA und eines HRP-gebundenen sekundären anti-Maus IgM (Antikörper-Mix) markiert. Die Detektion erfolgte nach Zugabe der gepufferten Substratlösung enzymatisch durch die Umsetzung von ABTS. Die Linearität des Assays ist zwischen 500 und 5000 Zellen garantiert. Die Sensitivität der Methode wird für medizinische Wirkstoff-Screenings als ausreichend bezeichnet [FRANKFURT und KRISHAN, 2001].

Zur Untersuchung apoptoseinduzierender Effekte der Testsubstanzen wurden 2500 CASMC bzw. 5000 CAEC pro well in Mikrotiterplatten ausgesät und bei ca. 40% iger Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen in voll supplementiertem Medium inkubiert (42 Stunden). Nicht adhärente Zellen wurden durch 5minütige Zentrifugation bei 1000 rpm (= 200 g; #CR3-12, Jouan, Saint Nazaire, France) in das Experiment eingeschlossen, in der 96well-Platte durch Zugabe von 200 µl/well 80% Methanol in PBS fixiert (30 Minuten, RT) und nach Absaugen des Fixativs bei 37°C 20 Minuten zur vollständigen Adhäsion der Zellen getrocknet. Nach Zugabe von 50 µl/well Formamid (10 Minuten, RT) wurden die Mikrotiterplatten zur selektiven Denaturierung der DNA apoptotischer Zellen 10 Minuten auf exakt 75°C im zirkulierenden Wasserbad erhitzt. Die Denaturierungsreaktion wurde durch 5minütige Inkubation bei 4°C gestoppt und das restliche Formamid abgesaugt. Vor der Inkubation mit dem Antikörper-Mix (100 µl/well, 30 Minuten, RT) wurden unspezifische Bindungsstellen unter Verwendung einer 3%igen wässrigen Magermilchlösung (v/w) blockiert (1 Stunde, 37°C). Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl/well ABTS-Substratlösung zugegeben und 15-60 Minuten inkubiert (RT). Die fotometrische Messung erfolgte nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Stop-Reagenz bei $\lambda = 405$ nm ohne Referenzwellenlänge. Als positive Kontrolle dienten Zellen, die zur

artifiziellen Apoptose-Induktion mit 100 mM $FeSO_4$ / 100 mM H_2O_2 in HBSS inkubiert wurden (2 Stunden, 37°C, 5% CO₂).

2.6 Proteinbiochemische Methoden

Zur Aufklärung beteiligter Mechanismen der Zellzyklusinhbition wurde die Expression verschiedener zellzyklusrelevanter Proteine untersucht.

2.6.1 Zellernte und Lyse

Zur Bestimmung der Expressionsmuster verschiedener Proteine unter dem Einfluss der Testsubstanzen wurden die Zellen nach der Inkubation wie in Kapitel 2.1 beschrieben abtrypsiniert, zur Entfernung von Serumresten und Trypsin mit HBSS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –70°C.

2.6.1.1 Totallysate mit NP-40

Die Zellpellets wurden durch auf- und abpipettieren in einer geeigneten Menge (50-150 µl) kaltem Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Lysepuffer:	NT-Puffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris-Base pH 7,4
	1%	Nonidet [®] P40 (NP-40, Tergitol [®])
	0,1%	Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC) *

* Proteaseinhibitor-Cocktail: AEBSF (104 mM), Aprotinin (0,08 mM), Leupeptin (2 mM), Bestatin (4 mM), Pepstatin A (1,5 mM), E-64 (1,4 mM). Zugabe kurz vor Gebrauch des Puffers.

Zur Vervollständigung der Lyse wurden die Zellsuspensionen 10 Sekunden gevortext und 10 Sekunden im kalten Ultraschallbad (SonorexSuper #RK103, Brandelin Electronic, Berlin) inkubiert. Zelldebris wurde 20 Minuten bei 13000 rpm (4°C) abzentrifugiert und die geklärten Überstande bei –70°C gelagert.

2.6.1.2 Lysate für pRb-ELISA

Zur Bestimmung der zellulären Konzentration an hyperphosphoryliertem Retinoblastoma-Protein (pRb) wurden die Zellen zunächst für 72 Stunden serumfrei kultiviert, um vollständige Quieszenz und eine Minimierung des pRb-Anteils zu erreichen. Bei gleichzeitiger mitogener Stimulation wurden die Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert, die Zellernte erfolgte durch Abtrypsinieren (vgl. Kapitel 2.1). Die Zellpellets wurden in eiskaltem HBSS gewaschen, schockgefroren und bei –70°C gelagert. Die Lyse erfolgte eisgekühlt unter Verwendung eines speziellen Phosphatase- und Proteaseinhibitor-haltigen Puffers:

Lysepuffer:	10 mM	Tris (pH 7,4)	2 mM	Na ₃ VO ₄ (aktiviert) **
	100 mM	NaCl	1%	TritonX-100
	1 mM	EDTA	10%	Glycerol
	1 mM	EGTA	0,1%	SDS
	1 mM	NaF	1 mM	PMSF
	20 mM	$Na_4P_2O_7$	0,1%	PIC *

** Aktivierung des Phosphatasinhibitors Na-Orthovanadat (100 mM) durch Mischen mit wässriger H₂O₂-Lösung (3,7%) im Verhältnis 9:1. * Proteaseinhibitor-Cocktail (s.o.)

Nach Resuspension von 1×10^5 Zellen in 100 µl eisgekühltem Lysepuffer und 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate 10 Sekunden gevortext und durch Zentrifugation geklärt (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Die Überstände wurden nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration sofort mittels pRb-ELISA analysiert (s. Kapitel 2.6.7).

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde gemäß einer modifizierten Methode nach LOWRY mit dem kolorimetrischen DC (Detergent Compatible) Protein Assay Kit von BioRad, Hercules, CA (#500 0116) gemessen (Doppelbestimmung) [LOWRY et al., 1951]. Die Reagenzien sind kompatibel mit dem verwendeten Detergens (< 2% NP-40). Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe in NT-Puffer (0,16 bis 1,29 mg/ml). 5 µl Probe wurden unverdünnt, 1:5 und/oder 1:10 verdünnt vorgelegt. Nach Zugabe von 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B wurde 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Absorption bei λ = 750 nm im ELISA-Reader (MR5000, #DL1000, Dynatech, Guernsey, UK) gemessen.

2.6.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Zur Denaturierung wurden äquivalente Gesamtproteinmengen mit 5x Lämmli-Puffer (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 30% Glycerol; 6% SDS; 0,005% Bromphenolblau; 250 mM DTT) im Verhältnis 1:5 gemischt und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. In Gegenwart von SDS sind die Proteinmoleküle negativ geladen und bleiben solubilisiert. Die Auftrennung wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE-Gradientengelelektrophorese (Novex[®] Tris-Glycin-Gele, 4-20%, Invitrogen, Carlsbad, CA; #EC6028BOX) durchgeführt. Die Gele wurden mit 40-60 µg Protein pro Tasche beladen, die Elektrophorese erfolgte im Novex[®] XCell *SureLock*[™] Mini-Cell-System (#EI9001) für 90-120 Minuten bei 125 Volt (Laufpuffer: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3). Als Molekulargewichtsmarker wurden 15 µl SeeBlue Plus2-Proteinstandard aufgetragen (Invitrogen; #LC5925).

2.6.4 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blot (Blot-Modul: Invitrogen; #EI9051) im "Wet-Blot-Verfahren" auf Hybond ECL Nitrocellulose-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge; #RPN 303D) übertragen. Die negativ geladenen Proteine wandern aus dem Gel auf die in Richtung Kathode liegende Membran.

Der <u>Transferpuffer</u> (12 mM Tris-Base; 96 mM Glycin; pH 8,3) enthielt zur besseren hydrophoben Bindung der Proteine an die Membran 20% v/v Methanol. Der Transfer erfolgte bei RT in Abhängigkeit von der Größe der zu detektierenden Proteine zwischen 90 und 120 Minuten bei 30 Volt (entsprechend ca. 200 mA/cm²).

2.6.5 Proteindetektion

Die Effizienz des Transfers und die Gleichmäßigkeit der Ladung wurden durch unspezifische Färbung der Proteine mittels PonceauS (Sigma; #P-7170; 0,1% in 5% Essigsäure) überprüft und fotodokumentiert. Die Entfärbung erfolgte durch kurze Inkubation in <u>TBS-T</u> (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween[®]20). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen in 5% Magermilch/TBS-T mindestens 1 Stunde bei RT (bei unspezifischen Antikörpern über Nacht, 4°C) inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers (vgl. Tabelle 2.1; Verdünnungen in 1% Magermilch/TBS-T) erfolgte auf dem Schüttler in Abhängigkeit von seiner Spezifität etwa eine Stunde (RT) oder über Nacht (4°C).

Antikörper	Bestell-Nr.	Verd.	Spezies	kD	Funktion des Proteins
p21 ^{cip1}	BD 6110233	1:500	Maus	21	CDK-Inhibitor
p27 ^{kip1}	BD 6110241	1:500	Maus	27	CDK-Inhibitor
p53 (DO1)	sc-126	1:500	Maus	53	Tumorsuppressor
MDM2	BD 556353	1:250	Maus	95	p53-Inhibitor, Onkogen
PCNA (PC10)	sc-56	1:1000	Maus	36	Proliferationsmarker
IRF-1	sc-497	1:1000	Kaninchen	50	Aktivator der Transkription
Cyclin A_1/A_2 (H432)	sc-751	1:200	Kaninchen	50-60	Cycline der S-Phase
Cyclin D_1 (A12)	sc-8396	1:100	Maus	38	Cyclin der G ₁ /S-Phase
Cyclin E (C19)	sc-198	1:200	Kaninchen	55-60	Cyclin der G ₁ /S-Phase
Actin (I-19)	sc-1616	1:500*	Ziege	42	Strukturprotein

Tab. 2.1:Primäre Antikörper (Western Blot)

BD = Firma Becton Dickinson, sc = Firma Santa Cruz Biotechnology, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, Verd. = Verdünnung; * = Verdünnung in 5% Magermilch/TBS-T

Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten in TBS-T, RT) wurden die Membranen mit HRPkonjugiertem sekundärem Antikörper eine Stunde bei RT (Schüttler) inkubiert (Tab. 2.2). Alle sekundären Antikörper wurden 1:2000 in 1% Magermilch/TBS-T verdünnt. Die Lagerung der verdünnten primären und sekundären Antikörper erfolgte bei –20°C.

Tab. 2.2:	Sekundäre Antikörper	(Western Blot)
-----------	----------------------	----------------

Antikörper	Bestell-Nr.	Verdünnung	Spezies
anti-Maus-IgG-HRP	sc-2005	1:2000	Ziege
anti-Kaninchen-IgG-HRP	sc-2313	1:2000	Esel
anti-Ziege-IgG-HRP	sc-2350	1:2000	Rind

IgG = Immunglobulin G, HRP = Horse Raddish Peroxidase (Meerrettichperoxidase), sc = Firma Santa Cruz Biotechnology

Nach weiteren drei Waschschritten (je 10 Minuten in TBS-T) wurde zur Beseitigung von Tween[®]20 kurz mit TBS gewaschen und die Membranen mit je 1,5 ml ECL (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2048 "Enhanced Chemiluminescent Detection"; Lösung A/Lösung B = 1/1 v/v) für eine Minute inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen ECL-Reagenz wurden die Membranen zwischen zwei Kopierfolien gelegt und Fuji Super RX NIF 13x18 cm Röntgenfilme der Firma Siemens, Erlangen (#03221355) belichtet. Danach wurden die Membranen gewaschen (TBS-T, ddH₂O), getrocknet und bei RT gelagert.

Zur Detektion weiterer Proteine wurden noch gebundene Antikörper durch Inkubation der (rehydrierten) Membranen mit 10 ml Stripping-Lösung (Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit, Chemicon; #2500-S) 5-10 Minuten bei RT entfernt. Danach wurde zwei Mal 10 Minuten in Blocking Reagenz (5% Magermilch/TBS-T) gewaschen und erneut mit primärem Antikörper inkubiert.

2.6.6 Digitalisierung und Quantifizierung der Western Blots

Zur weiteren Bearbeitung und Analyse wurden die belichteten Röntgenfilme am Densitometer (Calibrated Densitometer GS 800, #170-7980, BioRad, Hercules, CA) eingescannt. Der Vergleich der Intensität der Banden erfolgte über visuelle Analyse der Schwärzung im Bandenbereich bzw. in Einzelfällen durch Software-basierte densitometrische Quantifizierung (Quantity One 4.1, BioRad).

2.6.7 pRb-ELISA

Das Retinoblastoma-Protein (Rb, 110 kD) ist ein bedeutender Regulator zellulärer Proliferation und Differenzierung. Die zentrale Rolle von Rb als Tumorsuppressor besteht in seiner Fähigkeit, den Zellzyklus in der G₁-Phase zu stoppen. Hypophosphoryliertes Rb bindet und inaktiviert Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F-1) und verhindert so die Transkription von Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus durch die G₁- bis hin zur S-Phase notwendig sind. Durch Phosphorylierungsreaktionen, die von CDK-Cyclin-Komplexen (u.a. CDK4/Cyclin D₁) katalysiert werden, wird Rb in einen hyperphosphorylierten Zustand (pRb) versetzt und verliert seine zellzyklusinhibitorische Funktion. Rb enthält mindestens 16 Konsensussequenzen für Ser/Thr-Proteinkinasen, wobei bekannt ist, dass u.a. die Phosphorylierung am Threoninrest 821 oder 826 die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie unterbindet [KNUDSEN und WANG, 1997]. Über eine Dephosphorylierungs-Reaktion, katalysiert durch einen multimeren Enzymkomplex (Protein-Phosphatase Typ I = PP1), wird pRb wieder in seinen aktiven, wachstumsinhibierenden Status versetzt.

Das ELISA-Kit-System von BioSource, Camarillo, CA (human Rb [pT821] Immunoassay Kit, #KHO0021) ermöglicht die Quantifizierung des an Threonin 821 phosphorylierten pRb(Thr821).

Das Prinzip der Methode beruht auf der spezifischen Bindung von pRb(Thr821) an einen monoklonalen Antikörper, der auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist ("capture antibody"). Danach erfolgt die Bindung eines zweiten, Biotin-konjugierten Antikörpers ("detection antibody") an das immobilisierte pRb(Thr821), gefolgt von der Zugabe von HRP-gebundenem Streptavidin (SAV-HRP), das seinerseits an den Detektions-Antikörper bindet. Nach Zugabe der HRP-Substratlösung (Tetramethylbenzidin = TMB) kommt es zur einer Farbreaktion, deren Intensität der Menge an pRb(Thr821) direkt proportional ist. Über die mitgeführte Eichreihe ist eine Berechnung der absoluten Mengen in Units/ml [U/ml] möglich.

45

2.7 BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent-System

Der BiodivYsio[™]-Matrix DD (= Drug Delivery) Stent, Galway, Ireland (#DDH-10200SV; CE0086) ist ein flexibler, mittels Ballon expandierbarer Stent aus rostfreiem Chromnickelstahl, der asymmetrisch mit Phosphorylcholin (PC) beschichtet ist (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: BiodivYsio[™]-Matrix DD (= Drug Delivery) Stent. [A] Schematische Darstellung einer Stent-Strebe im Querschnitt; [B] Aufnahme eines BiodivYsio[™]-Stents vor Inflation. PC = Phosphorylcholin

Der Stent ist auf ein Ballonkatheter-Trägersystem montiert und mit verschiedenen Durchmessern und in unterschiedlichen Längen verfügbar. Die PC-Matrix eignet sich zur Aufnahme und Elution von Pharmazeutika mit einem Molekulargewicht bis 1200 kD. Die Beschichtung soll nach Angaben des Herstellers durch Eintauchen (> 5 Minuten) in die substanzhaltige Lösung erfolgen. Dabei ist die vom Stent aufgenommene Wirkstoffmenge von der Konzentration der Lösung abhängig [Gebrauchsanleitung BiodivYsio[™]-Matrix DD Intrakoronarstent, 2004]. Die Beschichtung erfolgt durch Einlagern der Wirkstoffmoleküle in die Poren der Matrix. Dabei ist die PC-Matrix auf der Lumenseite dünner als auf der Seite, die an der Gefäßwand liegt. Hierdurch wird eine optimale Abgabe der Substanz in die Gefäßwand bei minimiertem Verlust durch Auswaschen in den Blutstrom angestrebt.

2.7.1 Beschichtung der Stents

BiodivYsio[™]-Matrix DD Stents (Länge: 10,0 mm, Durchmesser: 2,0 mm) wurden durch Eintauchen (10 Minuten) in wässrige Flavopiridol-Lösung (25 mg/ml) bzw. 5 mg/ml wässrige Cerivastatin-Lösung beschichtet und anschließend 10 Minuten unter sterilen Bedingungen luftgetrocknet. Mittels hydrostatischen Drucks (Inflation Syringe BASIX[™] 25, #IN3125, Merit Medical, South Jordan, UT) wurden die Stents 10 Sekunden mit 12 atm inflatiert, vom Ballon abgelöst und bei 4°C nicht länger als 24 Stunden gelagert.

2.7.2 In vitro-Freisetzungskinetik

Zur Ermittlung der Kinetik der Freisetzung wurden die beschichteten, inflatierten Stents (n = 2/Testsubstanz) in 2 ml voll supplementiertem Medium (SmBM[®] + SmGM[®]) bei 37°C ohne Agitation inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Medium vollständig entfernt, durch frisches ersetzt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Dieser Vorgang wurde bis zum Ende der Freisetzung stündlich wiederholt. Die Überstände wurden sowohl zur HPLC-basierten Konzentrationsbestimmung als auch zur Messung der biologischen Aktiviät der pro Stunde freigesetzten Substanzmengen über BrdU-Inkorporations-ELISA eingesetzt.

2.7.2.1 HPLC/uv-Konzentrationsbestimmung

Alle HPLC (= High Performance Liquid Chromatography)-basierten Konzentrationsbestimmungen wurden im Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern, Münchnen von Dr. Michael Vogeser durchgeführt.

Die Messung der freigesetzten Flavopiridol-Menge erfolgte aus den Überständen der beschichteten Stents unter Verwendung einer etablierten Methode zur Bestimmung von Flavopiridol-Konzentrationen in humanem Blutplasma [ZHAI et al., 2002]. Hierzu wurden 50 μ l Flavopiridol-haltiges Medium (Stent-Überstand) durch 5minütiges Schütteln mit einem äquivalenten Volumen Acetonitril gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C) wurden 20 μ l des Überstands zur HPLC-basierten Auftrennung injiziert. Diese erfolgte über eine Waters Nova-Pak[®] C₁₈-Säule (Waters, Millford, MA) unter Verwendung eines Gradienten aus Ammoniumacetat und Methanol als mobile Phase. Die Quantifizierung erfolgte mittels uv-Detektion bei $\lambda = 268$ nm, die Retentionszeit der Substanz betrug 9,8 Minuten.

Zur Bestimmung der Cerivastatin-Konzentrationen wurden 100 µl Überstand mit 100 µl Acetonitril/40% Essigsäure (90/10 v/v) durch vortexen gemischt. Die Mischung wurde in eiskaltem Wasser 10 Minuten inkubiert und 10 Minuten mit 13000 g zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte über HPLC unter Verwendung von 800 ml 10 mM NH₄/Ac/HAc (pH 4,0) und 200 ml Acetonitril als Fließmittel. Die verwendeten Reprosil[®]-Pur RP-C8 HPLC-Säulen stammten von Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen (125 x 3,5 µm, #r15.8e). Bei einem Injektionsvolumen von 25 µl wurde eine Flussrate von 0,7 ml/Minute gewählt. Die uvbasierte Detektion erfolgte bei $\lambda = 243$ nm. Die Retentionszeit für Cerivastatin lag bei 10,5 Minuten. Die Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Stentlänge normalisiert und die Substanzmengen in µg/cm² Stentoberfläche angegeben. Bei dem verwendeten Stentdurchmesser (2,0 mm) entspricht 1 cm Stentlänge einer Oberfläche von 1 cm².

2.7.2.2 Biologische Wirkung (BrdU-ELISA)

Die Untersuchung der biologischen Wirkung der pro Stunde freigesetzten Substanzmengen erfolgte sowohl für Cerivastatin- als auch für Flavopiridol-haltige Überstände beschichteter Stents mittels BrdU-Inkorporations-ELISA. Die proliferationsinhibierende Wirkung auf CASMC wurde unter den in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Bedingungen quantifiziert. Anstelle der bekannten Wirkstoffkonzentrationen wurden die Zellen mit den Überständen unbekannter Konzentration inkubiert und die Ergebnisse vergleichend ausgewertet.

2.7.3 In vivo-Experimente (Ratte)

Der therapeutische Effekt der beschichteten Stents auf die Entstehung der Neointimahyperplasie wurde anhand des gut etablierten Carotis-Verletzungsmodells der Ratte studiert. Die Operationen sowie die weitere Aufarbeitung der Präparate und deren morphometrische Auswertung wurden von Dr. med. vet. Franziska Wegener und Dr. med. vet. Cornelia Michaelis unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes (Neufassung vom 25.05.1998) sowie nach behördlicher Genehmigung der Tierexperimente durchgeführt.

2.7.3.1 Anästhesie und präoperative Vorbereitung

450 bis 500 g schwere Sprague-Dawley Ratten wurden mit einer vollständig antagonisierbaren Injektinosanästhesie bestehend aus Midazolam (DORMICUM[®], 2 mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (DOMITOR[®], 0,15 mg/kg) und Fentanyl (FENTANYL[®], 0,005 mg/kg) durch intramuskuläre Injektion narkotisiert. Nach Eintritt des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Tiere am Hals rasiert, desinfiziert und auf einer mit einem sterilen Tuch abgedeckten Wärmeplatte in Rückenlage gebracht. Die Atmung erfolgte spontan über eine sauerstoffgesättigte Kopfkammer. Zur Überwachung wurde an einer Hintergliedmaße ein Pulsoxymeter angebracht.

2.7.3.2 Operationstechnik des Carotis-Verletzungsmodells

Oberhalb des Manubrium sterni wurde unter dem Dissektionsmikroskop in einem Mittellinienschnitt die Halsregion bis auf Höhe des Ansatzes des M. masseter eröffnet. Nach stumpfer Präparation und Anschlingen (USP 3/0 Vicryl[®]) des M. sternohyoideus, M. sternohyoideus, M. sternohyreoideus, M. digastricus (venter caudalis) und dem Zungenbeinast erfolgte die Präparation und Darstellung der Arteria carotis externa (ACE) sowie der abgehenden Arterien A. thyreoidea und A. occipitalis. Die ACE wurde in der Nähe

der Bifurkation angeschlungen und weit distal permanent ligiert (USP 6/0 Prolene[®]). Die A. thyreoidea sowie die A. occipitalis wurden gleichermaßen permanent ligiert.

Um eine akute Thrombosierung zu verhindern, wurden vor Durchführung der PTCA 200 IE Heparin subkutan appliziert. Gleichzeitig wurde körperwarme Ringer-Lösung subkutan injiziert, um den entstehenden Blutverlust auszugleichen.

Nach der distalen permanenten Ligation der ACE wurde die Arteria carotis communis (ACC) mit einem Fangfaden temporär unterbunden und die Arteria carotis interna (ACI) mittels Gefäßklemme temporär verschlossen. Die ACC wurde nun unter Verwendung eines Mikrodissektors eröffnet. Über diesen Zugang erfolgte das Einführen eines 2French Fogarty®-Embolektomiekatheters (BOSTON SCIENTIFIC) bis in die proximale ACC, wo der Ballon inflatiert wurde. Zur Induktion der Gefäßverletzung wurde der Ballon in diesem Zustand drei Mal von proximal nach distal bis in die ACE zurückgezogen, bevor er deflatiert und entfernt wurde.

2.7.3.3 Stentimplantation und postoperative Behandlung

Die in Kapitel 2.7.3.2 beschriebene Verletzung der proximalen ACC ermöglicht im Tiermodell die Simulation einer Denudierung des Endothels [CLOWES et al., 1983]. Nach erfolgter Vorverletzung wurden über denselben Zugang (ACE) die wirkstoffbeschichteten, auf einen Katheter vormontierten BiodivYsio[™] Matrix DD Stents (Länge: 10 mm) in die ACC eingeführt, dort platziert und für 10 Sekunden entsprechend dem Gefäßdurchmesser inflatiert (ca. 10 atm). Nach Deflation des Ballons und Entfernen des Katheters wurde nun der Fangfaden an der ACE permanent ligiert und die Gefäßklemme an der ACI wieder geöffnet, um eine Perfusion der ACC zu gewährleisten. Die Operationswunde wurde subkutan mit fortlaufenden Nähten verschlossen (4/0 Vicryl[®]) und kutan unter Verwendung von 3/0 Prolene[®] zugenäht. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch subkutane Verabreichung von Flumazenil (ANTISEDAN[®], 0,2 mg/kg KG) und Atipamezol (ANEXATE[®], 0,75 mg/kg Körpergewicht). Da die Schmerzen des Tieres nach dem Eingriff als gering einzustufen sind, wurde zur postoperativen Analgesie einmalig eine Dosis von 0,1 mg/kg Buprenorphin (TEMGESIC[®]) subkutan verabreicht.

Die Lage der Ligaturen sowie des Stents nach Abschluss der Operation zeigt Abb. 2.5.

2.7.3.4 Opferung, Herstellen der Präparate und histomorphometrische Analyse

14 Tage nach der Stentimplantation wurden die Tiere euthanasiert und die ACC wurde in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet [MILZ und PUTZ, 1994].



Abb. 2.5:Schematische Darstellung des gestenteten Gefäßbereiches
(Carotis-Verletzungsmodell der Ratte)

Nach Aushärtung des Materials wurden unter Verwendung eines Säge-Mikrotoms der Firma Leitz, Benzheim (#SP1600) 100 µm dünne Schnitte der gestenteten Gefäßbereiche gesägt, mittels Gallamin-Giemsa [XAUBET et al., 1991] gefärbt und geschliffen. Das Scannen der gefärbten Präparate erfolgte an einem Zeiss Axiovert 100-System.

Die morphometrische Quantifizierung wurde unter Verwendung der SigmaScan Pro 5.0 Software durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, IL).

Die quantitative Bewertung der Reendothelialisierung erfolgte an Paragon-gefärbten Schnitten (n = 3/Stent) einer Dicke von 10 μ m [BURNS et al., 1979] anhand einer Einteilung in Kategorien nach CARTER [CARTER et al., 2004]. Dabei entsprachen Schnitte mit einer Reendothelialisierung von > 25% des Gefäß-Lumens Kategorie I, bei 25-75% Endothelialisierung wurden sie Kategorie II und bei über 75% Kategorie 3 zugeordnet.

2.7.3.5 Immunhistochemische Färbung

Methanol-fixierte explantierte Stents (n = 3 Stents/Gruppe) dienten als Material zur spezifischen Analyse der Reendothelialisierung. Strut-assoziierte Gewebeproben wurden durch Mikrodissektion gewonnen, über Nacht in 5% Sucrose/PBS inkubiert und im Kryoverfahren 12 μ m dünn geschnitten. Die spezifische Markierung der Endothelzellen

erfolgte über einen primären Antikörper gegen Faktor VIII (von Willebrand Faktor) der Firma Serotec, Düsseldorf (#MCA127), als Kontrolle dienten Präparate ohne primären Antikörper. Die Detektion erfolgte über ein Avidin/Biotin-System von Vectastain (Vectastain ABC Elite Avidin/Biotin Peroxidase Kit, Vector Labs, Burlingame, USA).

2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte plus/minus Standardabweichung. Die Signifikanzen der Variabilität zwischen den Mittelwerten wurden durch ANOVA ("one/two way analysis of variance") unter der Verwendung der SPSS für WINDOWS V10.0 Software bestimmt. Unterschiede zwischen einzelnen experimentellen Ansätzen/Gruppen wurden (wenn nicht anders angegeben) bei P<0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 In-vitro Untersuchungen (Flavopiridol)

Zur Vorbereitung der Stent-Beschichtungsexperimente sowie als Voraussetzung zur optimalen Planung des tierexperimentellen Teils der Arbeit dienten *in vitro*-Experimente zur Bestimmung der Therapeutischen Breite (Dosis, Toxizität) unter Verwendung der an der Pathogenese der Restenose beteiligten Primärzelllinien. Weitere Analysen, v.a. auf Ebene der Proteinexpression, wurden zur Klärung der molekularen Wirkungsweise des CDK-Inhibitors in diesen speziellen Zellsystemen durchgeführt.

3.1.1 Flavopiridol hemmt die mitogeninduzierte Proliferation humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die Proliferation koronarer glatter Gefäßmuskelzellen (CASMC) ist eine der Hauptursachen für die pathologische Neointimaformation bei der Entstehung von In-Stent Restenosen (ISR). Über die Inhibition der für die Zellzyklusprogression essenziellen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's) wirkt Flavopiridol in verschiedenen Zelllinien antiproliferativ [KAUR et al., 1992]. Die Quantifizierung der Proliferationsinhibition erfolgte zum einen visuell durch Zellzählung zu verschiedenen Zeitpunkten, zum anderen über die Messung der BrdU-Inkorporationsrate. Dabei wurden alle Zellen (mit Ausnahme der nicht stimulierten Kontrolle) wie in Kapitel 2.1 beschrieben mitogen stimuliert.



Abb. 3.1: Proliferationsinhibierende Wirkung verschiedener Flavopiridol-Konzentrationen (Zellzählung); Vergrößerung: 100x

Im Rahmen der Zellzahlbestimmung zeigte sich im Analysezeitraum von 0-72 Stunden bereits im nanomolaren Bereich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferationsrate Flavopiridol-behandelter CASMC. verglichen mit der mitogen Kontrolle stimulierten ohne Flavopiridol (Abb. 3.1).

Konzentrationen ab 75 nM führten zu einer vollständigen Hemmung der Zellteilung, vergleichbar mit nicht mitogen stimulierten (quieszenten) Zellen. Interessanterweise beeinflusste Flavopiridol nicht nur die Teilungsrate, sondern auch die Morphologie der Zellen. Unter dem Einfluss mitogener Stimulation besaßen CASMC in Kultur einen dedifferenzierten Phänotyp, der sich durch flächige, synthetisch tätige Zellen auszeichnet. Zum Ende der Inkubationszeit (72 Stunden) zeigten die Flavopiridol-behandelten Zellen eine langgestreckte, spindelförmige Morphologie, die dem redifferenzierten, kontraktilen Phänotyp quieszenter Zellen entspricht (Abb. 3.2).



Abb. 3.2: CASMC-Morphologie nach 72 Stunden Inkubation mit Flavopiridol (0, 10, 50, 75, 100 nM) im Vergleich zu quieszenten Kontrollzellen; Vergrößerung: 200x

Über die Messung der DNA-Synthese mittels BrdU-Inkorporations-ELISA wurde die proliferationsinhibierende Wirkung exakt quantifiziert. Bei gleichzeitiger mitogener



Abb. 3.3: BrdU-Inkorporation unter dem Einfluss verschiedener Flavopiridol-Konzentrationen; prolif. = proliferierend, quiesz. = quieszent

Stimulation verminderte Flavopiridol konzentrationsabhängig die BrdU-Inkorporation in CASMC, gleichbedeutend mit einer limitierten S-Phase-Progression der Zellen (Abb. 3.3).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zellzählung wurde ab 50 nM Flavopiridol eine signifikante Reduktion der DNA-Syntheserate gemessen. Die Konzentration, bei der es im Vergleich zu mitogen stimulierten Zellen zu einer etwa 50% igen Proliferationsinhibition kam (IC_{50}) , lag im Bereich von 75 nM (58,6%), zu einer vollständigen Hemmung kam es ab einer Konzentrationen von 250 nM Flavopiridol.

3.1.2 Flavopiridol führt zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase sowie in G₂/M

Zur Analyse der Zellzyklusdistribution wurde der DNA-Gehalt Flavopiridol-behandelter Zellen mittels FACS-Messung bestimmt. Nach Isolation und PI-Färbung der Zellkerne gibt deren relative Größe Aufschluss über die Zellzyklusphase, in welcher sich die Zelle im Moment der Zellernte befand und damit über den Punkt, an welchem Flavopiridol das Fortschreiten des Zellzyklus in CASMC inhibiert. Die FACS-Analyse bestätigte eine dosisabhhängige Unterbrechung des Zellzyklus, die sich durch die Abnahme der Subpopulation in der S-Phase befindlicher Zellen nach einer Flavopiridol-Inkubation von 24 Stunden manifestierte (Abb. 3.4).



Abb. 3.4: FACS-Analyse der Zellzyklusdistribution unter der Wirkung von 0, 100 und 500 nM Flavopiridol im Vergleich zu quieszenten Kontrollzellen: roter Peak links = G_0/G_1 -Phase, blauer Bereich = S-Phase, roter Peak rechts = G_2/M -Phase

Die Zellen, die sich in der G_0/G_1 -Phase befinden, werden durch den linken roten Peak repräsentiert (DNA-Gehalt = 2n), Zellen der G_2/M -Phase entsprechend durch den rechten roten Peak (DNA-Gehalt = 4n). Zwischen beiden Peaks liegen die Zellkerne mit einem intermediären DNA-Gehalt (während der Replikation). Bereits 100 nM Flavopiridol führten trotz gleichzeitiger mitogener Stimulation zu einer Reduktion der S-Phase-Subpopulation (blau dargestellt) sowie zu einer Verbreiterung (Zunahme) des G_0/G_1 -Peaks. Durch die Wirkung von 500 nM Flavopiridol wurde der Eintritt in die S-Phase nahezu vollständig verhindert und es kam darüber hinaus zu einem signifikanten Anstieg der G_2/M -Subpopulation. Abb. 3.5 zeigt die Software-basierte Quantifizierung des S-Phase-Anteils. Unter dem Einfluss von Flavopiridol kam es nach 24stündiger Inkubation zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung des Anteils der in der S-Phase befindlichen Zellen.



Tab. 3.1:Quantitative Auswertung der einzelnenZellzyklusphasen(24StundenInkubation)Flavopiridol-

Flavopiridol	G_0/G_1	S	G ₂ /M
[nM]	[%]	[%]	[%]
0	60,3	31,9	7,8
100	67,3	16,4	16,3
500	56,4	6,6	37,0
quieszent	90,9	2,9	6,2

Abb. 3.5: Quantitative Auswertung des S-Phase-Anteils in CASMC nach 24 Stunden Flavopiridol-Inkubation

Aus Tabelle 3.1 ist ersichtlich, dass die Zellen dabei sowohl in der G_1 -, als auch in der G_2 -Phase arretiert wurden. Interessanterweise kam es durch die Wirkung von 100 nM Flavopiridol in erster Linie zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in G_0/G_1 (Anstieg um 7,0% auf 67,3%), während die relativ hohe Konzentration von 500 nM zusätzlich die Zellen verstärkt in G_2/M arretierte (Anstieg um 29,2% auf 37,0%). Der Rückgang der in der S-Phase befindlichen Zellen war jedoch für beide Testkonzentrationen signifikant.

3.1.3 Flavopiridol hemmt die Fibronektin-induzierte Migration von CASMC in vitro

Neben der Proliferation ist die Migration von CASMC in die Neointimaregion einer der zentralen Mechanismen für die Entstehung einer Neointimahyperplasie. Beide Vorgänge sind über die gemeinsame Induktion durch mitogene und (pro-)inflammatorische Mediatoren eng verknüpft. Die Analyse der Fibronektin-induzierten Migration von CASMC erfolgte *in vitro* mittels modifiziertem Boyden-Kammer-Assay unter reduzierter mitogener Stimulation und synchroner Flavopiridol-Inkubation. Die migratorische Aktivität in diesem Modell kann mit einer invasiven Kapazität der Zellen *in vivo* gleichgesetzt werden [KLEMKE et al., 1998].

Flavopiridol führte unter diesen experimentellen Bedingungen zu einer dosisabhängigen Inhibition der Fibronektin-induzierten Migration von CASMC nach 18 Stunden Inkubationszeit (Abb. 3.6). Die Resultate der Zählung selektiv angefärbter migrierter CASMC [A] sowie die nach Entfärbung dieser Zellen bestimmte OD (A₅₅₀) [B] waren diesbezüglich übereinstimmend.



Abb. 3.6: Quantitative Auswertung der Migration nach 18 Stunden Inkubation: [A] Zellzählung (n = 4 Zufallsansichten; Vergrößerung: 100x); [B] Fotometrische Messung nach Entfärben der migrierten Zellen (A₅₅₀); [C] gefärbte migrierte CASMC auf der Membranunterseite (200x)

Abb. 3.6 [C] zeigt repräsentative Ansichten migrierter CASMC auf der Unterseite der Membran. Bereits niedrige Konzentrationen (10 nM) ohne detektierbaren Effekt auf die Proliferation führten zu einer sichtbaren Inhibition der Migration. Innerhalb des Versuchszeitraums kam es zu keiner Veränderung der Zellzahl durch die Wirkung der Testsubstanz.

3.1.4 Sicherheit der Anwendung: Keine detektierbaren cytotoxischen oder proapoptotischen Effekte in CASMC und CAEC

Die Sicherheit der Anwendung eines Medikaments ist v.a. bei der lokalen Applikation über beschichtete Stents von großer Bedeutung. Keine der im Gefäß lokal oder temporär auftretenden Konzentrationen sollte auf die Zellen der Gefäßwand cytotoxisch und/oder proapoptotisch wirken. Daher können nur Medikamente mit großer "therapeutischer Breite" im Bereich der Stent-Beschichtung Anwendung finden. Diese ist ein Maß für die Sicherheit eines Medikaments und gibt die Spanne zwischen therapeutischer und toxischer Dosis an. Je größer diese Spanne ist, desto sicherer ist die Anwendung. Die Definition über den therapeutischen Quotienten ist eine vergleichende Betrachtung und Bewertung der therapeutisch effizienten (ED) und der letalen Dosis (LD) der Substanz (therapeutische Breite = LD_{25}/ED_{75}).

Die Schädigung endothelialer Zellen (CAEC) führt zu einer verlangsamten oder unvollständigen Reendothelialisierung der Gefäßwand nach einer interventionsbedingten

ERGEBNISSE

Verletzung. Bei gleichzeitiger Stentimplantation kann es in der Folge zur Bildung von Thrombosen an den (frei liegenden) Stentstreben kommen. Das Absterben von CASMC innerhalb des Gefäßes kann über die Freisetzung von Cytokinen inflammatorische Reaktionen auslösen, wodurch die Wundheilung verlangsamt und die Restenosebildung verstärkt wird [PHILLIPS et al., 2003]. Eine cytotoxische Wirkung sowohl auf CASMC als auch auf CAEC sollte im Rahmen der pharmakologischen Restenoseprävention vermieden werden. Gerade bei gleichzeitiger mitogener Stimulation kann das Auftreten apoptotischer Ereignisse unter der Wirkung von Zellzyklusinhibitoren nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde Flavopiridol *in vitro* in einem weiten Konzentrationsbereich auf mögliche toxische oder Apoptose-auslösende Wirkungen getestet.



Abb. 3.7: Keine toxische Wirkung von Flavopiridol auf CASMC und CAEC nach 48 Stunden Inkubation (LDH-Assay)



Abb. 3.8: Keine signifikante Apoptose-Induktion durch Flavopiridol in CASMC und CAEC nach 48 Stunden Inkubation (ssDNA-Apoptose-ELISA)

Abb. 3.7 zeigt bis hin zu hohen Konzentrationen nach 48 Stunden keine messbare cvtotoxische Wirkung einer Inkubation mit Flavopiridol, weder in CASMC noch in CAEC. Als Kontrolle dienten TritonX-100 behandelte Lysate derselben Anzahl entsprechender Zellen. Die höchste Testkonzentration (1000 nM) wurde über zehnfach höher gewählt als die effizienten Inhibition zur von Proliferation und Migration in einer vergleichbaren Inkubationszeit notwendigen 50-100 nM Flavopiridol.

Apoptotische Ereignisse in beiden Zelllinien wurden im selben Konzentrationsbereich nach 48 Stunden Inkubationsdauer über ssDNA-ELISA detektiert. einen Trotz der hohen Empfindlichkeit Testsystems konnte durch des Flavopiridol-Konzentrationen bis 1000 nM in beiden Zelllinien keine signifikante Apoptoseinduktion detektiert werden (Abb. 3.8). Als Kontrolle diente eine gleiche Anzahl $H_2O_2/FeSO_4$ -behandelter Zellen. Interessanterweise lagen die Messwerte für CAEC insgesamt höher als die gleich behandelter CASMC, wobei auch hier keine tendenziell ansteigende Apoptoserate bei höheren Flavopiridol-Konzentration zu beobachten war. Dies spricht für einen unspezifischen Effekt durch die artifizielle Kultivierung der Zellen, der sich auch bei unbehandelten CAEC einstellt.

3.1.5 Flavopiridol führt zu einer distinkten Regulation der Konzentrationen wichtiger zellzyklusrelevanter Proteine

Die Bedeutung proliferativer Prozesse bei der Entstehung der ISR gilt als evident. Der Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke aller mitogenen Signaltransduktionswege ist daher ein optimaler therapeutischer Ansatzpunkt zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen. Voraussetzung für die therapeutische Applikation einer zellzyklusinhibitorischen Strategie ist ein höchstmögliches Verständnis der molekularen Wirkungsweise der Testsubstanz.

3.1.5.1 Flavopiridol hemmt die Phosphorylierung von Rb

Der Vorgang der Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb) ist ein wichtiger Kontrollpunkt am Übergang von der G_1 - zur S-Phase (vgl. Kapitel 1.4.1). Der Phosphorylierungsstatus von Rb unter dem Einfluss verschiedener Flavopiridol-Konzentrationen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels ELISA-Technik ermittelt.



Abb. 3.9: pRb(Thr821)-Konzentration in % der Kontrolle (unbehandelte CASMC) nach 24 Stunden Flavopiridol-Inkubation

Abb. 3.9 zeigt die Ergebnisse des quantitativen pRb(Thr821)-Nachweises von Flavopiridol-behandelten im Vergleich zu proliferierenden Zellen. Zur Normalisierung der Experimente wurden äquivalente Gesamtproteinmengen untersucht und das in maximal proliferierenden CASMC gemessene pRb(Thr821) als maximal (100%) angenommen. Unter diesen Umständen korreliert eine hohe Konzentration an pRb(Thr821) mit einer hohen Zellteilungsaktivität.

ERGEBNISSE

Durch die Inkubation mit Flavopiridol bei synchroner mitogener Stimulation kam es in CASMC nach 24 Stunden zu einer dosisabhängigen Reduktion der hyperphosphorylierten Form des Rb-Proteins. Alle getesteten Konzentrationen führten zu einer deutlichen Reduktion der zellulären pRb(Thr821)-Fraktion. Der Wert der höchsten Konzentration (250 nM) lag mit 28,8% der stimulierten Kontrolle im Bereich der in quieszenten CASMC detektierten 30,7%.

3.1.5.2 Hemmung der Expression von Cyclinen durch Flavopiridol

Die zentrale Bedeutung der Cycline als aktivierende Untereinheiten der CDK's für die Regulation der Zellzyklusprogression sowie als medizinisch interessante Zielstrukturen zur Behandlung proliferativer Erkrankungen ist allgemein anerkannt [PARDEE, 1989].

Mit dem Ziel einer frühen Zellzyklusunterbrechung noch vor Überschreitung des R-Punktes (G_1 -Arrest) waren Typ D und A Cycline (G_1 /S-Cycline) im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse. Der Einfluss von Flavopiridol auf die Cyclin-Expression wurde mittels Western Blot analysiert. Mit 100 nM wurde eine Konzentration gewählt, die in CASMC zu einer etwa 50%igen Proliferationsinhibition führt. Unter dem Einfluss dieser Flavopiridol-Konzentration kam es in mitogen stimulierten CASMC bereits nach 18 Stunden zu einer zeitabhängigen Reduktion beider A-Typ-Cycline (Cyclin A₁ und A₂) und damit zu einer Verlangsamung oder vollständigen Unterbrechung der S-Phase-Progression (Abb. 3.10 [A]).



Abb. 3.10: Cyclin-Konzentrationen in Flavopiridol-behandelten CASMC (100 nM): [A] Cyclin A_1/A_2 ; [B] Cyclin D_1

Auch Cyclin D_1 , das sehr früh im Zellzyklus CDK2-aktivierend wirkt, wurde auf Proteinebene durch Flavopiridol (100 nM) zu Beginn der Inkubation deutlich reduziert [B]. Der initialen Reduktion folgte in diesem Fall ein Wiederanstieg der zellulären Proteinkonzentration beginnend nach 18 Stunden Inkubationszeit.

3.1.5.3 Erhöhte Expression von CKI der cip/kip-Familie

Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKI) der cip/kip-Familie sind wichtige endogene CDK-Inhibitoren, die an CDK/Cyclin-Holoenzyme komplex binden und deren Aktivität hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Induktion von Mitgliedern dieser speziellen CKI-Familie für eine erfolgreiche Therapie der Neointimahyperplasie ausschlaggebend ist [BRAUN-DULLAEUS et al., 1998]. Im Gegensatz hierzu scheint eine Induktion von CKI der ink4-Familie therapeutisch weniger effizient zu sein [TANNER et al., 1998]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Flavopiridol-abhängige Expression von Proteinen der cip/kip-Familie (p21^{cip1}, p27^{kip1}) untersucht. Abb. 3.11 [A] zeigt eine zeitabhängige Induktion von p21^{cip1} in mitogen stimulierten CASMC durch die Wirkung von Flavopiridol (100 nM) 12-18 Stunden nach Beginn der Inkubation.



Abb. 3.11:Zeitabhängige CKI-Induktion durch Flavopiridol (100 nM): $[A] p21^{cip1}$; $[B] p27^{kip1}$

Nach etwa 18 Stunden kam es unter denselben experimentellen Bedingungen zu einer deutlichen Induktion von p27^{kip1} mit einem maximalen Expressionslevel nach 36 Stunden [B]. Flavopiridol war demnach bereits in einer relativ niedrigen Konzentration zur Induktion beider CKI der wichtigen cip/kip-Familie in der Lage.

3.1.5.4 Induktion des Tumorsuppressorproteins p53

Bei dem Tumorsuppressorprotein p53 handelt es sich um ein nukleäres Phosphoprotein, das die Transkription wichtiger zellzyklusregulatorischer Gene induziert [LEVINE, 1997]. Fehlt das Protein, so kann dies über eine erhöhte VSMC-Proliferation verstärkt zu Atherosklerose führen [GUEVARA et al., 1999]. Im Femoralis-Verletzungsmodell der Maus (p53^{-/-}) kommt es durch die Abwesenheit von p53 sowohl zu einer Erhöhung der VSMC-Proliferation (Tag 14) als auch zu einer verstärkten Neointimahyperplasie (Tag 28) im Vergleich zu p53^{+/+}-Tieren [SATA et al., 2003]. Diese Ergebnisse signalisieren eine essenzielle Bedeutung von p53 bei der pathologischen Antwort auf eine Gefäßverletzung.

Das Protein befindet sich im Zellkern, kann jedoch durch seinen negativen Regulator MDM2 ins Cytoplasma transloziert werden. MDM2 ist eine Ubiquitin-Ligase, die durch aktives p53 induziert wird und dann das Protein durch Ubiquitinylierung zum Abbau durch Proteosomen markieren kann [ASHCROFT et al., 1999]. In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster von p53 und seinem Inhibitorprotein MDM2 unter der Wirkung von Flavopiridol genau analysiert. Während p53 in mitogen stimulierten Zellen nicht zu detektieren war, kam es bereits 6 Stunden nach Flavopiridol-Zugabe (100 nM) in CASMC zu einem signifikanten Anstieg des Tumorsuppressors auf Proteinebene (Abb. 3.12 [A]).



Die höchsten p53-Konzentrationen wurden nach 12 Stunden erreicht und überschritten sogar die in ruhenden Kontrollzellen gemessenen. Selbst nach 48 Stunden war p53 in Flavopiridolbehandelten Zellen noch auf einem ähnlichen Level nachweisbar wie unter Quieszenz. Dem raschen Anstieg des Tumorsuppressors folgte die Induktion des Inibitormoleküls MDM2, die 12 Stunden nach Flavopiridol-Zugabe begann (Abb. 3.12 [B]) und auch nach 48 Stunden noch nachzuweisen war. Der durch MDM2 induzierte Abbau von p53 ist vermutlich der Grund für den von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich abnehmenden p53-Proteinlevel.

3.2 In-vitro Untersuchungen (Cerivastatin)

Die biologische Wirkung von Cerivastatin wurde zum Zweck der Dosisfindung und zur Vorbereitung der Stent-Beschichtungsexperimente zunächst *in vitro* analysiert.

Pleiotrope Effekte der Statine beinhalten u.a. die Inhibition der CASMC-Proliferation und vaskulärer Entzüngungsreaktionen sowie positive Auswirkungen auf die Funktion des Gefäß-Endothels. Systemische Therapien mit dieser Substanzklasse limitieren die Restenose im Menschen jedoch nicht [CHAN et al., 2003]. Durch die Implantation antiproliferativ beschichteter Stents (z.B. Rapamycin, Paclitaxel) kommt es zu einer signifikanten Reduktion der ISR-Rate im Patienten [MOSES et al., 2003; STONE et al., 2004]. Diese Substanzen inhibieren sowohl die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen als auch die endotheliale Zellproliferation [VINALS et al., 1999]. Erste klinische Fallbeispiele geben Hinweis auf eine späte Entstehung von Thrombosen in Rapamycin-beschichteten Stents [LOSORDO et al., 2003]. Eine optimale Substanz zur Beschichtung der nächsten Generation intravaskulärer Stent-Systeme sollte nach deren Implantation zu einer effektiven Inhibition der CASMC-Proliferation ohne negativen Einfluss auf die proliferative Aktivität endothelialer Zellen führen [LOSORDO et al., 2003; KIPSHIDZE et al., 2004]. Aufgrund ihrer diversen pleiotropen Effekte sind die Vertreter der Statine aussichtsreiche Kandidaten zur Etablierung einer therapeutischen Strategie der differenziellen Proliferationsinhibition.

3.2.1 Differenzielle Inhibition der mitogeninduzierten CASMC-Proliferation durch Cerivastatin

Der proliferationsinhibierende Effekt des wirksamsten bekannten Statins (Cerivastatin) wurde im Hinblick auf einen möglichen differenziellen Charakter vergleichend in glatten Gefäßmuskelzellen und endothelialen Zellen untersucht. Die visuelle Analyse von CASMC unter dem Einfluss von Cerivastatin (1-100 nM) mittels Zellzählung anhand fotodokumentierter Zufallsansichten (Vergrößerung: 200x) zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl nach 48 Stunden in behandelten versus unbehandelten Ansätzen (Abb. 3.13).



Abb. 3.13: Quantifizierung der proliferationsinhibierenden Wirkung verschiedener Cerivastatin-Konzentrationen mittels Zellzählung: CASMC versus CAEC

Bereits durch die Wirkung von 5 nM Cerivastatin kam es nach 48 Stunden zu einer signifikanten Inhibition der CASMC-Proliferation (IC₅₀ = 5-10 nM). Konzentrationen ab 50 nM führten unter diesen Versuchsbedingungen zu einer vollständigen Proliferationsinhibition. Die Hemmung der CAEC-Proliferation im Rahmen korrespondierender Experimente fand auf einem – verglichen mit CASMC – deutlich reduzierten Niveau statt. Nach 48stündiger Inkubation war bis zu 50 nM Cerivastatin kein substanzieller Unterschied der Proliferationsrate zu beobachten. Bis hin zur höchsten Testkonzentration (100 nM) kam es bei CAEC zu keiner vollständigen Inhibition, während dieselbe Konzentration proliferative Prozesse in CASMC gänzlich inhibierte.

Aus den Ergebnissen der Zellzählung konnte für mitogen stimulierte Zellen die durchschnittliche Dauer eines Zellzyklus bestimmt werden. Diese lag für CASMC bei 24,5 Stunden und für CAEC im Mittel bei 31,2 Stunden.



Zur Präzisierung der näherungsweise bestimmten IC₅₀-Werte für Cerivastatin wurden unter Verwendung beider Zelllinien BrdU-Inkorporations-ELISAs durchgeführt.

In Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Zellzählung kam es auch hier zu einer präferenziellen Inhibition der CASMC- versus CAEC-Proliferation (Abb. 3.14). Eine 24stündige Vorinkubation mit

Cerivastatin führte ab einer Konzentration von 5 nM zu einer statistisch signifikanten und ab 50 nM zur vollständigen Inhibition der CASMC-Proliferation. Wieder war die Hemmung bei CAEC mit einem IC_{50} von 100 nM deutlich schwächer, zu einer vollständigen Proliferationsinhibition kam es in keinem der untersuchten Ansätze.

3.2.2 Cerivastatin führt zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in CASMC

Eine detaillierte Zellzyklusanalyse mittels FACS-Messung nach PI-Färbung der Zellkerne zeigte deutliche Veränderungen in der Zellzyklusdistribution bei CASMC nach 24stündiger Cerivastatin-Behandlung (Abb. 3.15 [A]).

Der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen (hellgrau dargestellt) lag in mitogen stimulierten Ansätzen im Mittel bei 31,9±2,8% und wurde durch Cerivastatin konzentrationsabhängig verringert. Unter dem Einfluss von 10 nM Cerivastatin betrug der Prozentsatz (S-Phase) 12,1±0,6, bei 50 nM Cerivastatin nur noch 6,9±0,5%. Offensichtlich induziert Cerivastatin in glatten Gefäßmuskelzellen einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase, deutlich zu sehen am konzentrationsabhängigen Anstieg dieser Subopulation im linken Diagramm von 60,3±1,8% (unbehandelte Zellen) auf 82,9±1,5% (50 nM Cerivastatin). Eine signifikante Zunahme der G₂/M-Phase (dunkelgraue Balken) war in CASMC nicht nachzuweisen.



Abb. 3.15: Quantitative Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen nach 24 Stunden Cerivastatin-Inkubation: CASMC [A] versus CAEC [B] (FACS-Analyse nach PI-Färbung der Zellkerne)

Unter dem Einfluss derselben Cerivastatin-Konzentrationen zeigte sich in CAEC nur ein partieller inhibitorischer Effekt (Abb. 3.15 [B]). Nach 24stündiger Inkubation mit 50 nM Cerivastatin lag der S-Phase-Anteil der Zellen mit $15,0\pm0,9\%$ im Bereich der mitogen stimulierten Kontrolle ohne Cerivastatin ($15,5\pm2,0\%$) und damit deutlich über dem im quieszenten Kontrollansatz ($5,6\pm0,8\%$).

Zur Aufklärung des Mechanismus der Zellzyklusinhibition in CASMC wurde die Analyse der Zellzyklusdistribution nach Cerivastatin-Behandlung unter synchroner Gabe von 5 μ M Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) bzw. 5 μ M Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) durchgeführt. Beide Substanzen sind Intermediate der Cholesterin-Biosynthese (vgl. Kapitel 1.5.1), die über die Isoprenylierung wichtiger signaltransduzierender Proteine deren intrazelluläre Lokalisierung und Funktionalität beeinflussen.

Abb. 3.16 zeigt die Reduktion der S-Phase Subpopulation (blau) durch die Wirkung von 50 nM Cerivastatin nach 24 Stunden von 14,2% (0 nM Cerivastatin) auf 3,0% (50 nM). Durch die Wirkung von GGPP, nicht aber durch FPP wurde dieser Effekt fast vollständig aufgehoben.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf einen Rho-abhängigen pleiotropen Charakter der proliferationsinhibierenden Wirkung von Cerivastatin, da die posttranslationale Modifikation dieses Proteins von GGPP abhängig ist [HUGHES, 1995].





3.2.3 Cerivastatin inhibiert selektiv die Migration von CASMC

Neben der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen repräsentiert die Fibronektin-induzierte Migration dieser Zellen in die Neointimaregion einen weiteren wichtigen Schlüsselmechanismus der ISR. Im Gegensatz hierzu ist die Migration von Endothelzellen für



Abb. 3.17:Quantitative Auswertung der Migration nach 18 Stunden Inkubation, CASMC versus CAEC:
Zellzählung (n = 4 Zufallsansichten; Vergrößerung: 100x)

die Reendothelialisierung und damit das "Einheilen" der Stentstreben in die Gefäßwand essenziell. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das Migrationsverhalten beider Zelllinien unter dem Einfluss von Cerivastatin vergleichend untersucht.

In CASMC führte Cerivastatin im experimentellen Boyden-Kammer-System dosisabhängig zu einer effizienten Hemmung der Fibronektin-induzierten Migration (Abb. 3.17).

Im Gegensatz zu CASMC hatten die getesteten Cerivastatin-Konzentrationen keinen detektierbaren Einfluss auf die Migration von CAEC.

3.2.4 Keine detektierbare cytotoxische oder apoptotische Zellschädigung durch Cerivastatin

Ausschlaggebend für die Sicherheit der Anwendung beschichteter Stents ist eine große therapeutische Breite des Wirkstoffs. Zellschädigende Konzentrationen sollten an jedem Punkt der Gefäßwand zu jeder Zeit ausgeschlossen werden können. Im Rahmen der Dosisfindung wurden mit beiden relevanten Zelllinien in einem weiten Konzentrationsrahmen Experimente zur Toxizität sowie zu potenzieller Apoptoseinduktion durchgeführt.

Sowohl in CASMC als auch in CAEC kam es auch durch hohe Cerivastatin-Konzentrationen (bis 500 nM) zu keiner detektierbaren Induktion cytotoxischer Effekte (Abb. 3.18). Die Inkubationszeit von 48 Stunden lag dabei in einem Bereich, in dem eine proliferationsinhibierende Wirkung bereits deutlich erkennbar war (vgl. Abb. 3.13 und 3.14).





Die maximale Testkonzentration wurde mit 500 nM über 50fach höher gewählt, als der ermittelte IC_{50} -Wert für CASMC (5-10 nM) bzw. mindestens 10fach höher als der entsprechende Wert für CAEC (10-50 nM). Die Messung erfolgte im Vergleich zu TritonXbehandelten Zellen, deren freigesetzte LDH-Aktivität als maximal (100%) angenommen werden konnte, da die Zellen bei dieser Behandlung vollständig lysiert waren und alle cytoplasmatischen Komponenten in den Überstand freigesetzt hatten. Überraschenderweise
lagen die maximale Werte für CAEC in diesem Assay mit einer LDH-Freisetzung von 8,2% der Kontrolle (bei 500 nM Cerivastatin) sogar noch unter dem von CASMC (14,5%).

Ebenfalls nach 48 Stunden Inkubation konnte eine bedeutende Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) bis zu Konzentrationen von 500 nM Cerivastatin ausgeschlossen werden (Abb. 3.19).



Abb. 3.19: Keine signifikante Apoptose-Induktion durch Cerivastatin in CASMC [A] und CAEC [B] nach 48 Stunden Inkubation (ssDNA-Apoptose-ELISA)

Dabei dienten H₂O₂/FeSO₄-behandelte Zellen als Kontrolle (100% Apoptose). Der maximale Prozentsatz apoptotischer Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen betrug für CASMC 14,1% und für CAEC 12,1%. Bezeichnend ist, dass diese maximalen Werte weder in CASMC noch in CAEC unter der Wirkung der maximalen Cerivastatin-Konzentration sondern bei Zugabe von 50 nM bzw. ohne Cerivastatin auftraten.

3.2.5 Cerivastatin beeinflusst die Expression und Aktivität wichtiger Zellzyklusregulatoren auf Proteinebene

Um molekulare Mechanismen der selektiven Proliferationsinhibition durch Cerivastatin zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen wichtiger Proliferationsmarker in CASMC und CAEC auf Proteinebene durchgeführt. Die für die inhibierende Wirkung in CASMC verantwortlichen molekularen Wirkmechanismen wurden über den Nachweis weiterer zellzyklusregulatorischer Proteine mittels Western Blot-Technik näher untersucht.

3.2.5.1 Einfluss von Cerivastatin auf die Expression wichtiger Proliferationsmarker in CASMC versus CAEC

Der molekulare Nachweis einer Unterbrechung des Zellzyklus erfolgte über die Analyse von Proliferationsmarkern aus dem Proteom der Zellen. Wichtige Markerproteine zellulärer Proliferation sind v.a. die Enzyme des DNA-Syntheseapparates, deren Cofaktoren sowie Transkriptionsfaktoren sowie deren Aktivatoren und Repressoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PCNA als aktivierende Untereinheit der DNA-Polymerase δ als Prolferationsmarker sowie der Vorgang der Hyperphosphorylierung von Rb als wichtiger Kontrollpunkt am Übergang zur S-Phase untersucht.

Der zelluläre Proliferationsmarker PCNA, ein DNA-Polymerase δ - assoziierter Faktor, tritt während des Zellzyklus vorrangig in der späten G₁- sowie während der S-Phase auf.

Die signifikante Abnahme der zellulären PCNA-Konzentration in CASMC 36 bis 48 Stunden nach Cerivastatin-Zugabe (50 nM) ist ein Hinweis auf eine zeitabhängig reduzierte proliferative Aktivität (Abb. 3.20 [A] und [C]).



Abb. 3.20: Analyse der Expression des Proliferationsmarkers PCNA in CASMC [A] versus CAEC [B] im zeitlichen Verlauf unter der Wirkung von 50 nM Cerivastatin; [C] Quantitative Auswertung nach densitometrischer Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse

Die PCNA-Konzentration in Cerivastatin-behandelten glatten Gefäßmuskelzellen lag dabei zum Ende der Inkubationszeit sogar noch unter der in ruhenden Kontrollzellen. Anders als in CASMC führte dieselbe Cerivastatin-Konzentration in CAEC zu keiner signifikanten Reduktion der zellulären PCNA-Konzentrationen (Abb. 3.20 [B] und [C]).

Der Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma-Proteins (Rb) ist ein Maß für die proliferative Aktivität innerhalb einer Zellpopulation. Aktives, nicht phosphoryliertes Rb inhibiert u.a. Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und führt zu einem Zellzyklusarrest vor dem Eintritt in die S-Phase. Hyperphosphoryliertes Rb (pRb) repräsentiert die inaktive, nicht inhibierende Form des Proteins, deren Präsenz eine Progression des Zellzyklus in die S-Phase zur Folge hat. Die Ergebnisse der ELISA-basierten spezifischen Detektion des hyperphosphorylierten Rb-Proteins nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Cerivastatin-Konzentrtion zeigt Abb. 3.21.



Abb. 3.21: pRb(Thr821)-Konzentration in CASMC versus CAEC nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Cerivastatin-Konzentrationen

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die pRb(Thr821)-Konzentration in mitogen stimulierten, nicht mit Cerivastatin behandelten Zellen gleich 100% gesetzt. Nach Zugabe von 100 nM Cerivastatin kam es in CASMC nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion des pRb-Spiegels auf 68,6% der Kontrolle, während in CAEC unter denselben Bedingungen keine Reduktion nachweisbar war. Eine detektierbare Inhibition des Zellzyklus in CASMC war also bereits durch geringe Cerivastatin-Konzentrationen möglich, während eine essenzielle Beeinflussung der Rb-abhängigen Endothelzell-Proliferation unter denselben Bedingungen nicht nachweisbar war.

3.2.5.2 Cerivastatin führt zu einer Abnahme der Konzentration verschiedener Cycline

Die Cycline A, E und D sind die wichtigsten regulatorischen Proteine während der frühen Zellzyklusprogression durch die G_1 - und S-Phase.

Durch die Wirkung von Cerivastatin (50 nM) kam es bei gleichzeitiger mitogener Stimulation bereits nach 18 Stunden zu einer Verminderung der zellulären Verfügbarkeit der Cycline A_1 und A_2 in glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 3.22 [A]). Die Konzentration dieser beiden Enzyme blieb unter Fortsetzung der Cerivastatin-Behandlung bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt (48 Stunden) auf niedrigem Niveau, vergleichbar mit nicht mitogen stimulierten Kontrollzellen.



Während die Cyclin E-Konzentration sowohl unter dem Einfluss von 50 nM Cerivastatin als auch nach Entzug der mitogenen Stimulation konstant blieb [C], kam es unter denselben Bedingungen in CASMC zu einer signifikanten zeitabhängigen Abnahme von Cyclin D₁, beginnend nach 18 bis 24 Stunden [B]. Zum Ende der Inkubationszeit lag die Konzentration dieses Cyclins sogar unter der in nicht mitogen stimulierten Kontrollzellen.

Die gleichzeitige Verminderung der Konzentration von Typ-A- und D-Cyclinen ist Hinweis auf eine nahezu vollständige Unterbrechung der Zellzyklusprogression unter diesen experimentellen Bedingungen.

3.2.5.3 Induktion wichtiger CKI der cip/kip-Familie durch Cerivastatin

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's) sind die wichtigsten Enzyme zur Steuerung des eukaryonten Zellzyklus und unterliegen daher einer komplexen Regulation durch verschiedene Mechanismen. Zum einen werden sie durch das oszillatorische Auftreten ihrer regulatorischen Untereinheiten (Cycline) aktiviert, zum anderen können endogene CDK-Inhibitoren (CKI) zu einer Inaktivierung bereits gebildeter Enzymkomplexe führen. Die pharmakologische Induktion v.a. von CKI der cip/kip-Familie spielt eine Schlüsselrolle bei der erfolgreichen Behandlung der Neointimahyperplasie [BRAUN-DULLAEUS et al., 1998].

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die zellulären Konzentrationen von $p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$ unter dem Einfluss von Cerivastatin genau untersucht.

Die Inkubation mitogen stimulierter CASMC mit 50 nM Cerivastatin führte zu einer raschen Induktion des CKI p21^{cip1} sowie einer leicht verzögerten Induktion von p27^{kip1} (Abb. 3.23 [B] und [C]).



Maximale Proteinkonzentrationen wurden nach 12 bis 18 Stunden (p21^{cip1}) bzw. zwischen 18 und 36 Stunden (p27^{kip1}) erreicht und lagen in beiden Fällen höher als die in nicht mitogen stimulierten Kontrollzellen nachweisbare Konzentration.

Die Induktion von p 21^{cip1} kann durch den Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1) induziert werden, der in CASMC eine wachstumshemmende Wirkung hat [WESSELY et al., 2003]. Abb. 3.23 [A] zeigt, dass durch die Wirkung von Cerivastatin (50 nM) die zelluläre IRF-1-Konzentration während des gesamten Beobachtungszeitraums (6-48 Stunden) gegenüber unbehandelten, mitogen stimulierten Kontrollzellen erhöht war. Diese Tatsache spricht für eine zumindest partielle Induktion von p 21^{cip1} durch die Wirkung von IRF-1 nach Cerivastatin-Behandlung.

3.3 In vitro-Experimente mit beschichteten Stents

Zur Bestimmung der Kapazität des BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent-Systems sowie zur Charakterisierung der Freisetzungskinetik beider Testsubstanzen wurden *in vitro*-Experimente mit beschichteten Stents durchgeführt. Firmenseitige Informationen über diese wichtigen Parameter lagen nicht vor. Neben der Gesamtmenge der in der Matrix eines Stents bestimmter Länge bzw. Oberfläche gespeicherten Substanz interessierte im Hinblick auf die *in vivo*-Experimente in erster Linie die innerhalb einer definierten Zeiteinheit freigesetzten Substanzmengen sowie deren biologische Wirkung auf die Zellen der Gefäßwand.

3.3.1 Dauer der Freisetzung und Quantifizierung der Freisetzung pro Stunde

Die wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben gewonnenen Stent-Überstände (Flavopiridol- bzw. Cerivastatin-haltiges, voll supplementiertes SmBM[®]-Medium) wurden zur Quantifizierung der pro Stunde freigesetzten Substanzmengen einer HPLC-basierten Analytik unterzogen.



Abb. 3.24: Kinetik der Freisetzung von Flavopiridol aus der Matrix des BiodivYsio[™] Stent-Systems (HPLC-Konzentrationsbestimmung)

Wie Abb. 3.24 zeigt, wurde das in der PC-Matrix gespeicherte Flavopiridol bei ruhender Inkubation (37°C) bereits innerhalb der ersten drei Stunden vollständig an das umgebende Medium abgegeben.

Die Angabe der pro Stunde freigesetzten Substanzmenge erfolgte normalisiert auf die Stentlänge in μ g/cm². Dabei besitzt ein Stent der Länge 10 mm etwa eine Oberfläche von 1 cm². Die stündlich freigesetzte

Flavopiridolmenge/cm² ergab sich somit durch Multiplikation der Konzentration im Überstand (μ g/ml) mit dem eingesetzten Volumen (2 ml) dividiert durch die Stentoberfläche (1 cm²). Eine Berechnung der Flavopiridol-Gesamtmenge pro Stent als Maß für dessen Kapazität war durch Addition dieser Einzelwerte näherungsweise möglich. Sie ergab für die in 25 mg/ml Flavopiridol-haltiger Lösung beschichteten Stents insgesamt 85 µg (± 43,4). Bei dieser Konzentration der Beschichtungslösung entspricht die berechnete Gesamtkapazität einem Flüssigkeitsvolumen von 3,4 µl, das in den Poren der Matrix gespeichert wurde.

Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Stents beruhen dabei auf der im ersten Zeitintervall direkt nach der Beschichtung freigesetzten Substanzmenge von 107,2 μ g (Stent 1) bzw. 47,6 μ g (Stent 2) und sind ein Hinweis auf eine methodisch bedingte Uneinheitlichkeit der Beschichtung. Da während des Vorgangs der Implantation bereits Flavopiridol aus der Matrix ausgewaschen wird, ist davon auszugehen, dass solche Differenzen *in vivo* weitgehend ausgeglichen werden.

Die Freisetzung von Cerivastatin aus dem BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent-System erfolgte ebenfalls rasch (Abb. 3.25). Aufgrund der guten Löslichkeit in Wasser (> 50 mg/ml) wurde

die in der Matrix gespeicherte Substanz bereits innerhalb der ersten drei Stunden vollständig an das umgebende Medium abgegeben.



Abb. 3.25: Kumulative Freisetzungskinetik von Cerivastatin aus der Matrix des BiodivYsio[™] Stent-Systems (HPLC-Konzentrationsbestimmung)

Danach konnte mittels HPLC kein Cerivastatin mehr im Überstand detektiert werden.

Die Gesamtmenge (Kapazität) der Stents ergab sich durch Addition der pro Zeiteinheit freigesetzten Einzelmengen zu 12,0 μ g (Stent 1) und 10,2 μ g (Stent 2). Dies entspricht bei einer Konzentration der Beschichtungslösung von 5 mg/ml einer in den Poren der PC-Matrix gespeicherten mittleren Flüssigkeitsmenge von 2,2 μ l.

3.3.2 Biologische Wirkung der Stent-Überstände

Neben der Quantifizierung der pro Stunde freigesetzten Substanz sowie der daraus resultierenden Bestimmung der Gesamtmenge (Kapazität), interessiert im Hinblick auf die medizinische Applikation in erster Linie die biologische Aktivität der Medikamente in den abgegebenen Konzentrationen. Zur wirksamen Prävention der Neointimahyperlasie sollte die



Abb. 3.26: Biologische Wirkung Flavopiridol-haltiger Stent-Überstände auf CASMC (BrdU-Inkorporations-ELISA)

in der Gefäßwand erreichte Konzentration die CASMC-Proliferation effizient hemmen.

Die in voll supplementiertem SmBM[®] gewonnenen Stent-Überstände wurden daher im Rahmen von BrdU-Inkorporations-Messungen getestet. Wie in Kapitel 2.7.2.2 beschrieben, wurden CASMC für 24 Stunden mit den Überständen inkubiert, gefolgt von einer BrdU-Inkorporationsphase von 16 Stunden. Die Flavopiridol-haltigen Stent-Überstände des ersten Zeitintervalls (0-1 h) hatten eine vollständige Hemmung der CASMC-Proliferation zur Folge (Abb. 3.26). Stent-Überstande nach 1-2 Stunden führten zu einer Hemmung von 70%, nach 2-3 Stunden noch 25% verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (0% Inhibition, nicht dargestellt). Nach 3-4 Stunden kam es durch die freigesetzte Flavopiridol-Menge in diesem experimentellen System zu keiner messbaren Hemmung der CASMC-Proliferation mehr.

Analoge Untersuchungen wurden mit Überständen Cerivastatin-beschichteter Stents durchgeführt. Da die proliferationsinhibierende Wirkung von Cerivastatin im nanomolaren Bereich liegt, wurden die Überstände in voll supplementiertem Medium 1:10 verdünnt.



Abb. 3.27: Biologische Wirkung Cerivastatin-haltiger Stent-Überstände (Verdünnung 1:10) auf CASMC (BrdU-Inkorporations-ELISA)

Wie Abb. 3.27 zeigt, wurden innerhalb der ersten drei Intervalle Substanzmengen freigesetzt, die in vitro selbst nach Verdünnung in voll supplementiertem SmBM[®] (1:10) zu einer nahezu vollständigen Inhibition der CASMC-Proliferation (\geq 84%) führten. Der Überstand nach (3-)4 Stunden führte ausschliesslich unverdünnt zu einer Inhibition der **BrdU-Inkorporation** 10,5% von (Daten nicht gezeigt).

Später entnommene Überstände hatten trotz einer verlängerten Intervalldauer von 3 Stunden auch in unverdünnter Form keine signifikante Inhibition der CASMC-Proliferation zur Folge (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Einordnung der Ergebnisse

Zur weiteren Bewertung der Ergebnisse wurde die biologische Aktivität der Stent-Überstände dem inhibitorischen Potential definierter Wirkstoffkonzentrationen sowie den Ergebnissen der HPLC-basierten Konzentrationsbestimmung gegenübergestellt.

Die Umrechnung der HPLC-basierten Messwerte über das Molekulargewicht von Flavopiridol (438 g/Mol) und das Volumen des Überstands (2 ml) ergab für das erste

Zeitintervall eine mittlere Konzentration von $88,4 \mu M$ im Stent-Überstand. Die Konzentration, die während des zweiten Intervalls gemessen wurde, lag im Mittel bei 7,8 μM .

Zeitraum [h]	[µg/ml] HPLC/uv	[µM] HPLC/uv	% Inhibiton (CASMC) [*]	[µM] BrdU-ELISA ^{**}
0-1	$77,398 \pm 42,132$	88,354 ± 48,096	100 ± 0	> 0,25
1-2	$6,84 \pm 1,349$	$7,808 \pm 1,540$	$70 \pm 3,5$	> 0,1
2-3	$0,344 \pm 0,127$	$0,393 \pm 0,145$	$25 \pm 4,0$	0,05 - 0,75
3-4	$0,108 \pm 0,059$	$0,123 \pm 0,068$	$0 \pm 8,0$	< 0,05
4-5	$0,04 \pm 0,057$	$0,046 \pm 0,065$	$0 \pm 2,5$	< 0,05

 Tab. 3.2:
 Flavopiridol-Konzentrationen in Stent-Überständen

* Inhibition der CASMC-Proliferation durch die Wirkung von Flavopiridol im Stent-Überstand (vgl. Abb. 3.26)
 ** n\u00e4herungsweise bestimmte Konzentration in Anlehnung an die zellzyklusinhibitorische Wirkung (BrdU-Inkorporations-ELISA, vgl. Kapitel 3.1.1, Abb. 3.3)

Der Vergleich mit BrdU-Experimenten unter dem Einsatz definierter Flavopiridol-Konzentrationen (vgl. Abb. 3.3) ermöglichte eine näherungsweise Konzentrationsbestimmung über das Maß der biologischen Aktivität (Tab. 3.1). So entsprach der Überstand nach 0-1 Stunden einer Konzentration von > 0,25 μ M Flavopiridol (entsprechend 100% Inhibition der BrdU-Inkorporation). In den meisten Zeitintervallen lag die über die biologische Wirkung geschätzte Flavopiridol-Konzentration klar unter der durch HPLC/uv bestimmten. Im Rahmen der Messgenauigkeit biologischer Systeme stimmen die ermittelten Daten hinsichtlich der Dimension jedoch gut mit den HPLC-basierten Ergebnissen überein.

Die Umrechnung der Cerivastatin-Konzentrationen über das Molekulargewicht von 481,5 g/Mol erfolgte analog. Sie ergab zu Beginn der Freisetzung z.T. hohe nanomolare Konzentrationen, die in Tabelle 3.2 aufgelistet sind.

Zeitraum [h]	[µg/ml] HPLC/uv	[µM] HPLC/uv	1:10	[nM]	% Inhibiton (CASMC) [*]	[nM] BrdU-ELISA**
0-1	6,8	7,06	+	706	100	> 100
1-2	3,0	3,12	+	312	100	> 100
2-3	1,4	0,7	+	70	83,9	10 - 50
3-4	0	0	+/-	0	0 / 10,5	< 5
4-7	0	0	+/-	0	0 / 0	< 5

Tab. 3.3:Cerivastatin-Konzentrationen in Stent-Überständen (Verdünnung 1:10)

* Inhibition der CASMC-Proliferation durch die Wirkung von Cerivastatin im Stent-Überstand (vgl. Abb. 3.27)

^{**} näherungsweise bestimmte Konzentration in Anlehnung an die zellzyklusinhibitorische Wirkung (BrdU-Inkorporations-ELISA, vgl. Kapitel 3.2.1, Abb. 3.14)

ERGEBNISSE

Im Vergleich mit den *in vitro* unter Einsatz definierter Cerivastatin-Konzentrationen gewonnenen Daten (s. Abb. 3.14) konnte die Konzentration der Stent-Überstände auf der Basis ihrer biologischen Wirksamkeit eingeschätzt werden. Dabei besaßen die verdünnten Überstände nach 0-1 sowie nach 1-2 Stunden eine Konzentration > 100 nM (100% Inhibition), nach 2-3 Stunden lag die geschätzte Konzentration zwischen 10 und 50 nM (ca. 84% Hemmung). In allen späteren Zeitintervallen lagen die geschätzten Konzentrationen selbst in unverdünnten Überständen ≤ 5 nM, gleichbedeutend mit 0-10,5% Inhibition der Proliferation in CASMC. Bemerkenswert ist, dass in diesem Konzentrationsbereich die biologische Detektion sensitiver ist, als die Bestimmung mittels HPLC-basierter Methodik. Eine gute Übereinstimmung der auf verschiedenen Wegen ermittelten Daten ist eindeutig erkennbar.

3.3.4 Limitation des experimentellen in vitro-Ansatzes

Die *in vitro*-Simulation der Freisetzung von Substanzmolekülen aus der Stent-Matrix unter Verwendung einer ruhenden Flüssigkeit spiegelt die Situation *in vivo* nur unzulänglich wider. Auswaschvorgänge durch das den Stent umspülende Blut während der Implantation können nur unzureichend simuliert werden, spielen jedoch bei dem verwendeten Stent-System aufgrund der asymmetrischen Beschichtung wahrscheinlich eine vernachlässigbare Rolle. Die Beurteilung der *in vivo*-Situation nach der Implantation ist nicht einfach. Die Freisetzung von Medikamenten am Zielort selbst in die Gefäßwand folgt sicher anderen Gesetzen, als in einer ruhenden, gepufferten Lösung. Zudem sind biologische Effekte einer Substanz *in vitro* nicht unter allen Umständen mit deren Aktivität *in vivo* gleichzusetzen [SCHWARTZ und EDELMAN, 2002]. Da firmenseitige Informationen zu diesen Eigenschaften der Stents jedoch nicht vorlagen, ist dieser einfache Versuchsansatz eine gute Möglichkeit zur näherungsweisen Charakterisierung der Kinetik der Freisetzung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten cytotoxische und pro-apoptotische Effekte in humanen CASMC und CAEC für beide Testsubstanzen bis hin zu hohen Konzentrationen ausgeschlossen werden. Da die Freisetzungskinetik *in vivo* durch die Simulationen *in vitro* nur näherungsweise charakterisiert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass im Gewebe temporär höhere Substanzkonzentrationen erreicht werden, als in den Stent-Überständen. Im tierexperimentellen Teil der Studie wurden jedoch weder eine erhöhte Thromboserate noch die Bildung nekrotischen Gewebes im Stent-Bereich beobachtet (s. Kapitel 3.4).

3.4 In vivo-Experimente (Carotis-Verletzungsmodell der Ratte)

Neben den *in vitro*-Experimenten zur Dosisfindung und Definition der therapeutischen Breite (Kapitel 3.1 und 3.2) sowie ersten Hinweisen auf das Freisetzungsverhalten des untersuchten Stent-Systems (Kapitel 3.3) sind letztendlich die tierexperimentellen Daten ausschlaggebend für den Erfolg weiterer Forschungsarbeiten mit dem Ziel der klinischen Anwendung.

Nur der Nachweis einer sicheren und effizienten Applikation des Systems im Kleintier (Ratte) legitimiert dessen weiterführenden Einsatz im Großtier (z.B. Schwein) sowie im Rahmen initialer klinischer Studien. Die im tierexperimentellen Teil beschriebenen Ergebnisse können somit als die zentrale Aussage dieser Arbeit gelten, deren sorgfältige Vorbereitung durch umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen jedoch als unbedingte Voraussetzung anzusehen ist.

3.4.1 Hemmung der Neointimaformation durch lokale CDK-Inhibition (Flavopiridol)

Die Hemmung der Zellzyklusprogression glatter Gefäßmuskelzellen durch die Wirkung des synthetischen CDK-Inhibitors Flavopiridol wurde im Rahmen der *in vitro*-Experimente beschriebenen. Die Frage nach der Übertragbarkeit dieses Prinzips auf die Hemmung proliferativer Vorgänge im verletzten Gefäß sollte im tierexperimentellen Teil der Studie untersucht werden.

Ein Vergleich der Wirkung einer lokalen Flavopiridol-Freisetzung auf der Basis beschichteter BiodivYsioTM-Matrix DD Stents (n = 15) mit unbeschichteten Kontrollstents (n = 17) erfolgte über die Quantifizierung der neointimalen Fläche (abzüglich der Fläche der Stentstreben) 14 Tage nach der Implantation.



Abb. 3.28: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte); Vergrößerung: 50x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Flavopiridol-beschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent (Konzentration der Beschichtungslösung: 25 mg/ml)

Trotz der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Dauer der Freisetzung von nur ca. drei Stunden kam es *in vivo* zu einer signifikanten Inhibition der Neointimaformation (Abb. 3.28).

Repräsentative Schnitte im Bereich gestenteter Gefäßabschnitte zeigten eine sichtbare Reduktion der neointimalen Fläche durch die Wirkung des CDK-Inhibitors Flavopiridol [B] verglichen mit unbeschichteten Stents derselben Art [A].



Abb. 3.29: Quantitative Auswertung der neointimalen Fläche (Tag 14 *post operationem*). ** P<0,01

Das Ergebnis der quantitativen Auswertung zeigt Abb. 3.29. Durch die Wirkung von im Mittel ca. 85 µg Flavopiridol pro Stent (vgl. Kapitel 3.3.1) kam es *in vivo* nach einer Implantationsdauer von 14 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der neointimalen Fläche (P<0,01) verglichen mit unbeschichteten Stents.

Die Fläche der Media blieb dabei nahezu unverändert (Daten nicht gezeigt).

Die Sicherheit der Anwendung war im Tiermodell für beschichtete und unbeschichtete Stents gleichermaßen gegeben. Sie äusserte sich in einer allgemein niedrigen Stent-Thromboserate von n = 3/15 in Flavopiridol-eluierenden versus n = 4/17 in Kontroll-Stents (P = n.s.) 14 Tage nach der Operation.

3.4.2 Reduktion der Neointimahyperplasie durch pleiotrope Wirkungen von lokal freigesetztem Cerivastatin

Die Effektivität einer lokalen Freisetzung des hochwirksamen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Cerivastatin zur Hemmung der Neointimahyperplasie wurde durch Implantation beschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stents in zuvor verletzte Ratten-Gefäße analysiert.

Durch Eintauchen in 5 mg/ml wässrige Cerivastatin-Lösung wurden 14 Stents beschichtet und mit 17 unbeschichteten Kontroll-Stents verglichen. Nach 14 Tagen zeigten beide Gruppen eine vergleichbare In-Stent Thromboserate von n = 3/14 bei Cerivastatin-beschichteten versus n = 4/17 bei Kontroll-Stents (P = n.s.).

Trotz einer Freisetzungsdauer von nur wenigen Stunden (vgl. Kapitel 3.3.1) kam es in Cerivastatin-beschichteten Stents zu einer sichtbar verminderten Ausbildung der Neointima und somit der ISR.



Abb. 3.30: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte); Vergrößerung: 50x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatin-beschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent (Konzentration der Beschichtungslösung: 5 mg/ml)

Abb. 3.30 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Gefäß-Querschnitte 14 Tage nach der Stent-Implantation.

Im unbeschichteten System [A] ist eine ausgeprägte Neointima zu erkennen, die von den Stentstreben ausgehend

das Gefäßlumen verengt. Die Streben im rechten, beschichteten Stent-System [B] dagegen sind ohne Lumenverlust in die Gefäßwand eingewachsen.



Abb. 3.31: Quantitative Auswertung der neointimalen Fläche (Tag 14 *post operationem*). * P<0,05

Die Berechnung der Neointimafläche erfolgte nach Vermessung aller Einzelflächen (SigmaScan Pro 5.0 Software) durch Subtraktion der Fläche der Stentstreben von der Gesamt-Neointimafläche (Abb. 3.31).

Durch die Implantation Cerivastatin-beschichteter Stents kam es *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion der

Neointimafläche verglichen mit unbeschichteten Kontrollstents (P<0,05).

3.4.3 Cerivastatin führt nicht zu einer Inibition des Reendothelialisierungs-Prozesses

Der Vorgang einer raschen und vollständigen Reendothelialisierung der Gefäßwand im Stent-Bereich ist ein wichtiger prädiktiver Faktor für den klinischen Erfolg der Intervention. Statine haben im Rahmen ihrer pleiotropen (cholesterinunabhängigen) Wirkungsweisen u.a. endothelprotektiven Charakter (vgl. Kapitel 1.5.4). Die Analyse der histologischen Präparate gestenteter Gefäßbereiche unter hoher Vergrößerung (200x) ließ eine vollständige Einheilung der Stent-Streben sowohl im unbeschichteten [A] als auch im Cerivastatin-beschichteten System erkennen (Abb. 3.32).



Abb. 3.32: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte). Vergrößerung: 200x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatin-beschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent

Zur weiteren Analyse des Reendothelialisierungs-Prozesses, v.a. im Bereich der Stent-Streben, wurden von n = 3 Tieren pro Gruppe (Cerivastatin-beschichtete versus unbeschichtete Stents) 14 Tage nach der Implantation Gewebeproben aus dem Stentbereich entnommen. Nach immunhistochemischer Färbung gegen einen etablierten Marker für endotheliale Zellen (von Willebrand Faktor) war die Endothelzellschicht auf der Lumenseite spezifisch dunkel gefärbt zu erkennen. Abb. 3.33 zeigt repräsentative Schnitte im Bereich Strut-assoziierter Geweberegionen im unbeschichteten [A] sowie im Cerivastatinbeschichteten [B] Stent-System.



Abb. 3.33: Immunhistochemisch gefärbte Schnitte Strut-assoziierter Gewebebereiche aus gestenteten Gefäßen 14 Tage nach Implantation (Ratte). Vergrößerung: 200x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatinbeschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent

Eine Quantifizierung des Ausmaßes der Reendothelialisierung im Stent-Bereich war nach Visualisierung der Endothelzellschicht über eine Einteilung in Kategorien (nach CARTER) möglich [CARTER et al., 2004]. Dabei entsprachen Schnitte mit einer Reendothelialisierung von < 25% des Gefäß-Lumens Kategorie I, bei 25-75% Kategorie II und bei über 75%



Abb. 3.34: Quantitative Auswertung der Reendothelialisierung im Stent-Bereich (n = 3 Stents/Gruppe; n = 3 Schnitte/Stent) über die Einteilung in Kategorien (I-III) nach CARTER.

Kategorie 3. Das Ergebnis der quantitativen Auswertung von n = 3 Schnitten pro Stent zeigt Abb. 3.34.

Das Ausmaß der Reendothelialisierung war in den mit Cerivastatin beschichteten Stents 14 Tage nach der Implantation geringfügig höher, als im unbeschichteten Stent-System. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die Cerivastatin-Beschichtung führt in diesem Modell über die Hemmung von CASMC-Migration und Proliferation zu

einer signifikanten Inhibition der Neointimahyperplasie. Gleichzeitig hat das Medikament in der applizierten Dosis jedoch keine Beeinträchtigung der Wundheilung und Reendothelialisierung zur Folge.

3.4.4 Limitation des experimentellen in vivo-Ansatzes (Tiermodell)

Im Rahmen humaner Studien mit systemischer Anwendung verschiedener zellzyklusinhibitorisch wirksamer Medikamente konnte bislang keine signifikante Reduktion der ISR-Rate nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.3.1.1). Beschichtete Stent-Systeme sind durch die hohen lokal erreichbaren Konzentrationen bei minimalen oder keinen Nebenwirkungen gegenüber der systemischen Anwendung im Vorteil. Klinische Studien zeigen, dass beschichtete Stents die Neointimaformation und somit die ISR im Menschen effektiv hemmen können. Dabei werden mit dem Mitosehemmer Paclitaxel (Taxol) und dem G₁-Inhibitor Rapamycin (Sirolimus) verschiedenen Strategien zur Limitierung der humanen ISR bereits mit Erfolg angewandt [COLOMBO et al., 2004; MOSES et al., 2003].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der therapeutische Nutzen Flavopiridol- bzw. Cerivastatin-freisetzender Stent-Systeme im Carotis-Verletzungsmodell der Ratte analysiert. Es steht ausser Frage, dass es kein ideales Tiermodell zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit beschichteter Stent-Systeme zur Prävention der ISR gibt [TEIRSTEIN, 2001].

Sowohl die Verteilung eines Medikaments als auch dessen pharmakologische Wirkung sind von der Morphologie des Gefäßes und der Läsion abhängig [SCHWARTZ und EDELMAN, 2002]. Die Übertragung tierexperimentell ermittelter Daten auf den humanen Organismus

81

ERGEBNISSE

bzw. die klinische Anwendung ist daher nur unter Vorbehalt möglich. Zwar ist der Ablauf der Heilung nach der Intervention im Tier (v.a. im Schwein oder Kaninchen) ähnlich wie im Menschen, eklatante Differenzen existieren jedoch im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Heilungsstadien [VIRMANI et al., 2003]. Beim Menschen wird in der Regel die Atherosklerose in der 5. bis 6. Lebensdekade manifest, während die tierexperimentellen Erkenntnisse meist an jungen Tieren ohne atherosklerotische Gefäßveränderungen gewonnen werden. Auch diese Tatsache kann zur verzögerten Heilung im Menschen beitragen [FARB et al., 1999].

Die Neointimahyperplasie gilt als Ursache der ISR und kann als deren pathophysiologische Grundlage betrachtet werden [GORDON et al., 1993]. Die Freisetzung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren nach Verletzung des Gefäßes führt zur Aktivierung der Proliferation und Migration in erster Linie von vaskulären glatten Muskelzellen [RECTENWALD et al., 2000]. Der Zellzyklus ist die gemeinsame Endstrecke komplexer, teilweise redundanter mitogener Signaltransduktionswege und bietet somit attraktive Zielstrukturen gleichermaßen für die Prävention der Neointimahyperplasie als auch zur Therapie anderer vaskuloproliferativer Erkrankungen wie z.B. der Transplantatvaskulopathie.

humaner Studien basierend Im Rahmen auf einer systemischen Applikation zellzyklusinhibitorischer Medikamente konnte bislang nur in Einzelfällen eine signifikante Reduktion der ISR-Rate nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 1.3.1.1.). Beschichtete Stent-Systeme sind durch die hohen lokal erreichbaren Konzentrationen bei minimalen oder keinen Nebenwirkungen gegenüber der systemischen Anwendung im Vorteil. Klinische Studien zeigen, dass beschichtete Stents die Neointimaformation und somit die ISR im Menschen effektiv hemmen können. Dabei werden mit dem Mitosehemmer Paclitaxel (Taxol) und dem mTOR-Inhibtior Rapamycin (Sirolimus) verschiedene Strategien zur Prävention der humanen ISR bereits mit Erfolg angewandt [COLOMBO et al., 2004; MOSES et al., 2003].

Randomisierte Studien unter Verwendung Paclitaxel-freisetzender NIRx-Stent-Systeme zeigen eine Reduktion der ISR-Rate nach 6 Monaten von 11 auf 0% [GRUBE et al., 2002]. Eine aktuelle Studie (TAXUS V) zur Prüfung der Effizienz dieses Systems bei der Behandlung der ISR in unbeschichteten Stents zeigt eine Reduktion der angiographischen Restenoserate nach 9 Monaten [STONE et al., 2006].

Die Implantation Rapamycin-beschichteter Bx-Velocity-Stents in native Koronargefäße im Rahmen der initialen RAVEL-Studie führte zu einer klinischen Restenoserate von 0%. Die spätere SIRIUS-Studie, zu deren Teilnehmern auch Patienten mit einem erhöhten Restenose-Risiko zählten, zeigte eine Reduktion der ISR-Rate von 35,4 auf 3,2% [MOSES et al., 2003]. Derzeit wird im Rahmen klinischer Studien die Effizienz Rapamycin-freisetzender Stents zur Restenoseprävention bei der Implantation in komplizierte Läsionen, an Bifurkationen und bei Diabetikern sowie zur Behandlung der ISR selbst weiter untersucht. Erste Ergebnisse bestätigen die Sicherheit der Implantation im Hinblick auf akute und subakute kardiale Ereignisse. Nach 6 Monaten weisen die gestenteten Gefäße von 57 Hochrisiko-Patienten bei angiographischer Untersuchung in nur 8% der Fälle ISR auf [RUIZ-NODAR et al., 2004]. Langzeit-Untersuchungen liegen hier jedoch noch nicht vor.

Trotz des positiven Einflusses der medikamentösen Beschichtung kann die Problematik der ISR nicht als vollständig gelöst angesehen werden. Subgruppenanalysen im Rahmen der SIRIUS-Studie zeigen ein Jahr nach der Stent-Implantatin trotz der Beschichtung eine erhöhte Restenoserate bei Patienten mit Diabetes sowie in Gefäßen mit geringem Durchmesser und in langen Läsionen [HOLMES et al., 2004; MOSES et al., 2003].

Obwohl es sich bei Rapamycin um ein potentes immunsuppressives Medikament handelt, wird die Fähigkeit zur effizienten Reduktion der ISR in erster Linie mit seiner direkten antiproliferativen Funktion in Verbindung gebracht [SUZUKI et al., 2001]. Diese Tatsache rechtfertigt die Evaluierung weiterer zellzyklusinhibitorisch wirksamer Therapiestrategien zur lokalen Applikation via Stent-Beschichtung.

4.1 Prävention der ISR durch selektive CDK-Inhibition - Flavopiridol

Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's), die während der Progression durch den Zellzyklus über die Assoziation mit Cyclinen aktive heterodimere Komplexe bilden, sind die Schlüsselmoleküle der Zellzyklusregulation [SHERR, 2000]. Während der G₁-Phase ist die Aktivierung der CDK's 4 und 6 sowie wahrscheinlich CDK3 erforderlich [EKHOLM und REED, 2000], während die Aktivität von CDK2 v.a. die G₁/S-Phase-Transition steuert [REED, 1997].

Synthetische CDK-Inhibitoren wie Flavopiridol sind in der Lage, ohne signifikante Hemmung anderer wichtiger Kinasen gezielt verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe effektiv zu inhibieren und so den Zellzyklus zu stoppen. Im Rahmen onkologischer Phase-III-Studien wurden mit Flavopiridol, 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) und Roscovitin bereits drei synthetische CDK-Inhibitoren klinisch getestet. Die IC₅₀-Werte für die Inhibition verschiedener Cyclinabhängiger Kinasekomplexe differieren in unterschiedlichen Zelllinien, liegen für Flavopiridol mit 300-400 nM (CDK1/Cyclin B), 100 nM (CDK2/Cyclin E) und 20-40 nM (CDK4/Cyclin D) jedoch sehr niedrig. Erst eine mindestens 10fach höhere Flavopiridol-Dosis hemmt andere Kinasen wie z.B. ERK-1 (16 000 nM) und PKC (6000 nM) [SEDLACEK, 2001]. Die Substrate, die von aktivierten CDK/Cyclin-Komplexen durch Phosphorylierung modifiziert werden, sind ihrerseits wichtige Faktoren der Zellzyklusprogression, u.a. Tumorsuppressorproteine (z.B. Rb, p53) und Transkriptionsfaktoren wie E2F und RNA-Polymerase II [KIM et al., 2000]. Die CDK's bilden demnach eine interessante Zielstruktur innerhalb der frühen Zellzyklusmaschinerie und sind durch die Wirkung bereits geringer Flavopiridol-Konzentrationen äusserst selektiv inaktivierbar.

Der Transfer von Phosphatgruppen auf die Substrate der CDK's ist ATP-abhängig und bewirkt i.d.R. die Aktivierung downstream liegender Signalmoleküle [SEDLACEK, 2000]. Die kompetitive Bindung von Flavopiridol an die ATP-Bindungsstelle der CDK's ist wahrscheinlich der wichtigste Mechanismus der Inhibition [DE AZEVEDO et al., 1996]. Bislang ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die antiproliferative Wirkung von Flavopiridol ausschließlich auf der CDK-Inhibition oder zumindest partiell auf einer prinzipiellen Hemmung der Transkription über die Inaktivierung von CDK9/Cyclin T-Komplexen beruht. Über diesen Mechanismus scheint die Substanz *in vitro* die Propagierung des humanen Immundefizienzvirus (HIV) zu verhindern und ist daher auch aus virologischer Sicht eine interessante Therapieoption [CHAO und PRICE, 2001].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die molekularen und zellulären Effekte von Flavopiridol in den für die Entstehung der ISR relevanten Primärzellen (CASMC und CAEC) untersucht.

Flavopiridol verhindert *in vitro* die bFGF/Thrombin-induzierte Proliferation humaner arterieller Muskelzellen (ASMC) [RUEF et al. 1999]. Der IC₅₀ von 75 nM konnte für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen koronaren glatten Gefäßmuskelzellen (CASMC) bei gleichzeitiger mitogener Stimulation durch Insulin, hFGF-B und hEGF exakt bestätigt werden. Die Blockierung der Zellzyklusprogression erfolgte dabei sowohl in der G₁-Phase als auch an der G₂/M-Transition. Verglichen mit Rapamycin oder Paclitaxel, die den Zyklus jeweils ausschließlich in der G₁- bzw. während der M-Phase unterbrechen, können zwei Angriffspunkte der Inhibition einen wichtigen Vorteil darstellen. In nicht synchron proliferierenden Zellpopulationen können so auch Zellen, die bereits den Restriktionspunkt überschritten haben und in ihrer Teilungsaktivität nun vom mitogenen Stimulus unabhängig sind, an der bevorstehenden Mitose gehindert werden.

Auf molekularer Ebene wird der Flavopiridol-induzierte Zellzyklusarrest in CASMC durch die verminderte Expression der Cycline A₁, A₂ sowie D₁ manifest. Cycline des A-Typs phosphorylieren nach komplexer Bindung an CDK2 u.a. Histon H1 [PINES und HUNTER, 1990], während CDK4- bzw CDK6/Cyclin D-Kinasekomplexe für die Phosphorylierung von Rb essenziell sind [HARBOUR et al., 1999]. Ähnlich wie in MCF-7 Karzinomzellen [CARLSON et al., 1999] führte Flavopiridol in humanen CASMC zu einer Reduktion der zellulären

Konzentrationen von Cyclin D₁ sowie der Cycline A₁ und A₂ auf Proteinebene und in der Folge zu einer Inhibition der mitogeninduzierten Rb-Phosphorylierung. Diese wird initial durch Cyclin D-, später durch Cyclin E- sowie Cyclin A-abhängige Kinasen katalysiert und gilt als essenzielle Voraussetzung für den S-Phase-Übergang der Zelle [MITTNACHT, 1998]. Die Überschreitung des Restriktionspunkts ist mit einer Entkopplung des Zellzyklus von mitogener Stimulation verbunden und daher die ultimative Entscheidungsstelle für die Zellteilung. Das in dieser Arbeit verwendete Rb-Testsystem erkennt spezifisch die am Threoninrest 821 phosphorylierte Form des Retinoblastoma-Proteins, die neben anderen für die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus der komplexen Rb-Bindung essenziell ist [KNUDSEN und WANG, 1997].

Auch das Tumorsuppressorprotein p53 unterliegt einer Regulation durch CDK-abhängige Phosphorylierung [KIM et al., 2000] und steuert sowohl proliferative als auch apoptotische Prozesse – beides grundlegende Vorgänge bei der Entstehung von Atherosklerose [Ross, 1993]. In einem p53-defizienten Modell der Maus kommt es durch das Fehlen des Tumorsuppressors zu einer erhöhten Proliferationsrate vaskulärer SMC und in Folge dessen zu einer beschleunigten Atheroskleroseprogression [GUEVARA et al., 1999]. Eine erhöhte Expression von p53 ist darüberhinaus mit einer attenuierten Neointimabildung im Femoralis-Modell der Maus assoziiert [SATA et al., 2003]. Die Induktion von p53 kann u.a. über strahlungsinduzierte DNA-Schäden, aber ebenso durch die Wirkung verschiedener Cytostatika und Proteinkinase-Inhibitoren ausgelöst werden [VOGELSTEIN et al., 2000]. Untersuchungen zur p53-Expression in CASMC im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten kurz nach der Zugabe von Flavopiridol eine rasche Induktion des Proteins, gefolgt von einem Anstieg der Konzentration seines wichtigsten Inhibitors MDM2. Die darauf folgende Abnahme der p53-Proteinkonzentration beruht auf einer Induktion der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse durch die Wirkung von MDM2. Die Regulation zellulärer p53-Konzentrationen folgt einer Feedback-Schleife: Zunächst bindet p53 an regulatorische Regionen des MDM2-Gens und aktiviert dessen Transkription. Neusynthetisierte MDM2-Moleküle bilden ihrerseits Komplexe mit p53 und induzieren über die Anlagerung von Ubiquitinmolekülen dessen beschleunigten Abbau [ASHCROFT und VOUSDEN, 1999]. In einer Feedback-Regulation sorgt die so verminderte p53-Konzentration dann wiederum für abnehmende Konzentrationen des Inhibitors. In normalen Zellen wird ein gegenläufig oszillatorisches Verhalten der beiden Proteine beobachtet, das einem feinen Gleichgewicht unterliegt [BAR-OR et al., 2000]. Unter diesen Voraussetzungen ist es wahrscheinlich, dass unter kontinuierlicher Flavopiridol-Inkubation nach Abnahme der MDM2-Konzentration ein erneuter Anstieg von p53 folgt. Die

Bindung von MDM2 erfolgt erst nach Phosphorylierung von p53 am N-terminalen Ende [VOGELSTEIN et al., 2000]. Eine verringerte Aktivität verschiedener Cyclin/CDK-Komplexe unter dem Einfluss von Flavopiridol kann diese Phosphorylierung und somit die Bindung von MDM2 und den beschleunigten Abbau von p53 verhindern. Dies ist möglicherweise der Grund für den unvollständigen Abbau des Tumorsuppressorproteins, das in CASMC trotz der Präsenz von MDM2 auch noch 48 Stunden nach Flavopiridol-Zugabe nachweisbar war.

Weitere molekulare Grundlagen der proliferationsinhibierenden Wirkung von Flavopiridol beruhen auf einer raschen Induktion der CKI p21^{cip1} und p27^{kip1}, die im Rahmen dieser Arbeit in CASMC nachgewiesen werden konnte. Die CKI der cip/kip-Familie gelten als wichtige endogene Regulatoren der G₁/S-Phase-Transition in vaskulären Muskelzellen. Sie sind für die Prävention der ISR von besonderem Interesse, da sie im Unterschied zu den CKI der ink-Familie proliferative Prozesse des arteriellen Heilungsprozesses nach Gefäßverletzung kontrollieren [TANNER et al., 1998]. Die molekulare Basis des Erfolges Rapamycinbeschichteter Stent-Systeme beruht in erster Linie auf der direkten antiproliferativen Wirkung des Medikaments über die Hemmung des mitogeninduzierten Abbaus von p27^{kip1} [SUZUKI et al., 2001]. Dabei bindet Rapamycin zunächst an seinen intrazellulären Rezeptor FK506 Binding Protein (FKBP12). Durch diesen Vorgang kommt es zu einer Inhibition der Kinase TOR (Target Of Rapamycin) und über erhöhte intrazelluläre p27^{kip1}-Level schliesslich zur Unterbrechung des Zellzyklus in der G₁-Phase [MARX et al., 1995; MARX und MARKS, 2001]. Die Beobachtung, dass eine Rapamycin-Resistenz in murinen BC3H1-Zellen mit ungewöhnlich niedrigen p27^{kip1}-Konzentrationen korreliert [Luo et al., 1996], untermauert die obige Aussage. In diesem Zusammenhang wird die Notwendigkeit der klinischen Evaluierung weiterer Medikamente deutlich, die erhöhte zelluläre p27^{kip1}-Konzentrationen über einen von Rapamycin verschiedenen Mechanismus erreichen. Unter Verwendung entsprechend beschichteter Stent-Systeme können zukünftig möglicherweise auch Patienten mit einer nachgewiesenen Resistenz gegen die Wirkung von Rapamycin erfolgreich therapiert werden. In Fachkreisen existieren kontroverse Ansichten über die Rolle von p27^{kip1} als (einzigem) Mediator der Rapamycin-Wirkung. In einer Studie von ROQUE hat Rapamycin in murinen glatten Gefäßmuskelzellen trotz p27^{kip1}-Defizienz wachstumsinhibitorische Effekte und führt p27^{kip1}-defizienten in einem Mausmodell einer abgeschwächten auch zu Neointimahyperplasie nach Gefäßverletzung [ROQUE et al., 2001]. In der Literatur werden p27^{kip1}-abhängige und -unahbängige Mechanismen der Prolferationsinhibition durch Rapamycin beschrieben.

87

Eine essenzielle Funktion von p27^{kip1} für die migrationsinhibierende Wirkung von Rapamycin ist dagegen unumstritten [SUN et al., 2001]. Sie kann als die molekulare Grundlage auch der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Hemmung der Fibronektin-induzierten Migration Gefäßmuskelzellen durch Flavopiridol betrachtet werden. glatter Die gewählte Migrationsdauer von 18 Stunden fällt zeitlich exakt mit dem beginnenden Anstieg zellulärer p27kip1-Konzentrationen zusammen. Da die zelluläre Migration durch verschiedene Serum-Bestandteile aktiviert wird, wurden die Experimente in serumreduziertem Medium durchgeführt. Die Inkubationsdauer wurde zudem so gewählt, dass sie die experimentell bestimmte Dauer eines Zellzyklus von 30,5 Stunden für CASMC deutlich unterschritt, um die Unahbhängigkeit des Experiments von einer durch Flavopiridol bedingten Differenz der Zellzahl in den unterschiedlichen Ansätzen zu gewährleisten.

Im Unterschied zu Rapamycin beinhaltet die Wirkungsweise des synthetischen CDK-Inhibitors Flavopiridol neben dem p27^{kip1}-vermittelten Effekt noch weitere Mechanismen. Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten eine eindrucksvolle Induktion eines zweiten Mitglieds der wichtigen cip/kip-Familie (p21^{cip1}) bereits 12 Stunden nach Beginn der Flavopiridol-Inkubation. Dies kann, besonders hinsichtlich einer möglichen Rapamycin-Resistenz, für die Prävention der ISR einen wichtigen Vorteil darstellen.

Die Induktion von p21^{cip1} erfolgt u.a. über eine Aktivierung der Transkription durch p53 [VOGELSTEIN et al., 2000]. Das zeitversetzte Auftreten maximaler zellulärer Konzentrationen von p53 (6-12 Stunden) und p21^{cip1} (12-18 Stunden) nach Beginn der Flavopiridol-Inkubation spricht für diese Art der Regulation.

Der Begriff "therapeutische Breite" fasst die Aspekte der Effizienz bzw. Wirksamkeit sowie die Sicherheit der Anwendung eines Medikaments zusammen und ist v.a. bei der Untersuchung beschichteter Stents von ausserordentlicher Bedeutung. Durch die chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs (v.a. der Lipophilie) sowie durch minimale Differenzen in der Beschichtung kann es im gestenteten Gefäßabschnitt lokal zu undefinierten Konzentrations-Unterschieden kommen, die in keinem Fall negative Auswirkungen auf den Vorgang der Reendothelialisierung haben dürfen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte selbst bei hohen Flavopiridol-Konzentrationen, welche in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer vollständigen Hemmung der DNA-Replikation ausreichend sind, in CASMC genau wie in CAEC kein cytopathischer

Effekt nachgewiesen werden. Zudem wurde eine signifikante Apoptoseinduktion in beiden Zelllinien innerhalb des gesamten getesteten Konzentrationsbereichs sicher ausgeschlossen. In diesem experimentellen System lagen die Apoptoseraten für endotheliale Zellen höher als für gleich behandelte CASMC. Das Auftreten des maximalen Messwertes von 18,3% bei Kontrollzellen ohne Flavopiridol spricht jedoch für einen unspezifischen Effekt, hervorgerufen durch die Zellkulturbedingungen. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen wurde bis zu 1000 nM Flavopiridol in koronaren Gefäß-Endothelzellen nicht beobachtet. Zur Prävention der humanen ISR ist dieses Ergebnis von grundlegender Wichtigkeit, da Vorgänge der Wundheilung (v.a. der Reendothelialisierungs-Prozess) durch die Applikation eines zellzyklusinhibierenden Wirkstoffs nicht beeinträchtigt werden sollten.

Die Induktion des programmierten Zelltods durch Flavopiridol und andere CDK-Inhibitoren wird in Tumorzelllinien häufig beschrieben und ist im Bereich der klinischen Onkologie auch Ziel der Behandlung. Beispielsweise wird in Leukämiezellen (B-Lymphozyten) durch eine Kombination von Flavopiridol und 7-Hydroxy-Staurosporin (UCN-01) die Expression antiapoptotischer Proteine gehemmt und es kommt in Folge dessen einer zu konzentrationsabhängigen Apoptoseinduktion [KITADA et al., 2000]. Sicher ist, dass das Auftreten apoptotischer Ereignisse unter dem Einfluss von Flavopiridol stark von der behandelten Zelllinie sowie von deren Proliferationsstatus abhängig ist. So zeigen humane Endothelzellen aus venösem Nabelschnurgewebe (HUVEC) unabhängig vom aktuellen Proliferationsstatus nach Inkubation mit > 100 nM Flavopiridol einige klassische Anzeichen von Apoptose (z.B. Kondensation des Chromatins und DNA-Fragmentierung), während in einer pulmonalen Karzinomzelllinie (A549) zur Apoptoseinduktion durch Flavopiridol eine synchrone mitogene Stimulation nötig ist [BRUSSELBACH et al., 1998]. Die Mechanismen, über die Flavopiridol Apoptose auslösen kann, sind für verschiedene Zelllinien noch weitgehend unbekannt.

Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Endothelzellen (CAEC) sehr empfindlich und schwer zu kultivieren sind, wurden sie für Experimente nicht älter als Passage 8 verwendet. Die von BRUSSELBACH et al. untersuchten HUVEC lassen sich dagegen problemlos länger *in vitro* kultivieren und wurden daher sicher auch in höheren Passagen verwendet, wo apoptotische Ereignisse wahrscheinlicher sind.

Bei einer verzögerten Endothelbildung, ausgelöst z.B. durch apoptotische CAEC, besteht eine erhöhte Gefahr thrombotischer Ereignisse im Stentbereich [SCHNEIDER und DICHEK, 1997]. In Übereinstimmung mit den *in vitro*-Ergebnissen kam es bei den im Rahmen der vorliegenden

Arbeit implantierten Flavopiridol-beschichteten Stents verglichen mit unbeschichteten Kontrollstents zu keiner Erhöhung der Thromboserate. Diese Ergebnisse entstammen duplexsonografischen sowie *post mortem*-Analysen und sprechen gegen eine signifikante Induktion von Apoptose auch durch lokal in der Gefäßwand erreichte Flavopiridol-Konzentrationen in diesem *in vivo*-Modell.

Frühere Studien von RUEF und seinen Mitarbeitern haben gezeigt, dass die orale Applikation von Flavopiridol das Ausmaß vaskulärer Stenosierung nach Gefäßverletzung (ohne Stent-Implantation) in Ratten um bis zu 39% (Tag 14 *post interventionem*) verringern kann [RUEF et al., 1999]. Da die orale Anwendung des Medikaments bislang ohne therapeutische Effizienz im Menschen blieb, erscheint die lokale Applikation über beschichtete Stents die erfolgversprechendste Therapiestrategie zur Prävention der ISR zu sein. Zudem ist der hyperproliferative Charakter der Restenose im Gegensatz zu primären Stenosen stärker ausgeprägt [DarTsch et al., 1990]. Dies macht die ISR zu einem idealen Ziel für die Strategie der synthetischen Kinaseinhibition.

Die Evaluierung eines Flavopiridol-beschichteten Stent-Systems unter Verwendung der Phosphorylcholin-beschichteten BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent-Plattform im Carotis-Verletzungsmodell der Ratte war ein finales Ziel dieser Arbeit. Die Sicherheit und Effizienz des (unbeschichteten) Stent-Systems bei der Implantation in sehr kleine Koronararterien des Menschen (< 2 mm) ist in der Literatur beschrieben. Dabei erreicht das biokompatible Polymer selbst bereits eine Reduktion der Thrombosegefahr und der Notwendigkeit erneuter Revaskularisierung des gestenteten Gefäßabschnittes [GRENADIER et al., 2002].

Die Kinetik der Freisetzung von Flavopiridol wurde sowohl über die Messung der biologischen Aktivität in Überständen beschichteter Stents als auch durch eine uv-basierte Konzentrationsbestimmung *in vitro* charakterisiert. Übereinstimmend ergaben beide Methoden eine nahezu vollständige Freisetzung des Medikaments aus der Stent-Matrix in die wässrige Umgebung innerhalb der ersten drei Stunden. Eine ähnlich kurze Freisetzungsdauer zeigt dasselbe Stent-System auch in einer Studie von ARMSTRONG, in der Angiopeptinbeschichtete Stents in explantierte humane Venen eingesetzt wurden. Bereits eine Stunde nach der Implantation war das (sehr hydrophile) Medikament in der Media-Region detektierbar, wo es bis zu 28 Tage lang nachweisbar blieb [ARMSTRONG et al., 2002]. Obwohl es sich bei Flavopiridol um eine lipophile Substanz handelt, könnte durch eine Derivatisierung

die Wasserlöslichkeit noch verringert und so die Freisetzung aus der Matrix des Stents verlangsamt werden. Untersuchungen mit Flavopiridol-Derivaten, die über Schwefel- oder Sauerstoffbrücken hydrophobe Seitenketten enthalten, sind diesbezüglich ermutigend: Im Gegensatz zu polaren Seitenketten (z.B. Anilinresten), die die CDK-inhibierende Wirkung verringern, scheinen unpolare (z.B. Chlorphenyl- oder tert-Butyl-) Reste die Affinität zum Substrat bzw. die Selektiviät für bestimmte Kinasen sogar noch zu erhöhen [KIM et al., 2000].

Das extrem kurze Zeitfenster der Flavopiridol-Freisetzung erwies sich im experimentellen Carotis-Verletzungsmodell der Ratte als dennoch ausreichend: 14 Tage nach der Stent-Implantation führte die antiproliferative Beschichtung zu einer signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie in diesem System. Dabei war die Sicherheit der Anwendung in beiden Gruppen (unbeschichtete und beschichtete Stents) gleichermaßen gegeben. Limitierend für das Modell (vgl. Kapitel 3.4.4) ist jedoch die Tatsache, dass die Phase der Entstehung einer restenotischen Läsion im Menschen verglichen mit der Ratte etwa 8-10mal länger ist. Im porcinen Modell, das für weiterführende Untersuchungen Wirkstoff-freisetzender Stents angestrebt wird, ist die neointimale Proliferation bis zu 28 Tage nach der Stent-Implantation nachweisbar, während im Menschen diese Phase 4 bis 8 Monate andauert. Die Implantation antiproliferativ beschichteter Stents kann diesen Prozess der Heilung noch verzögern [VIRMANI et al., 2003]. Dies bedeutet, dass die kurze Freisetzung zwar im Tier, nicht jedoch zwingend auch im Menschen zur Limitierung der ISR ausreichend sein kann. Die Geschichte der Rapamycin-beschichteten Stents zeigt jedoch, dass humane klinische Studien die in verschiedenen Tiermodellen gewonnenen Ergebnisse sogar noch übertreffen können [TEIRSTEIN, 2001].

Erste Ergebnisse einer klinischen Studie unter Verwendung von 17β-Estradiol-freisetzenden BiodivYsio[™]-Matrix DD Stents zur Behandlung von *de novo*-Läsionen (EASTER) bestätigen einen effektiven Transfer der (äusserst lipophilen) Substanz in die Gefäßwand und eine Limitierung der ISR-Rate [ABIZAID et al., 2004]. Die Frage nach einer optimalen Freisetzungskinetik steht unbestritten in engem Zusammenhang zu physikalisch-chemischen Eigenschaften der Wirkstoff-Moleküle, die die lokale Pharmakokinetik beeinflussen. Zudem sind die Wirkmechanismen der Substanz und nicht zuletzt die Art und Größe der zu behandelnden Läsion wichtige Faktoren für einen therapeutischen Erfolg.

Der erfolgreiche Einsatz von Flavopiridol auf der Basis der BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent-Plattform im Rahmen dieser Studie impliziert die Eignung des Prinzips der synthetischen Kinaseinhibition als Strategie und zukunftsweisendes Konzept der ISR-Prävention

4.2 Differenzielle Inhibition der Zellproliferation durch Cerivastatin

Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese vaskulärer Läsionen einschließlich Restenosen nach PTCA, In-Stent Restenosen und Transplantat-Vaskulopathien [BRAUN-DULLAEUS et al., 1998]. Beide Prozesse können *in vitro* durch die Wirkung von Statinen inhibiert werden [CORSINI et al., 1993].

Die Hemmung der Isoprenoid-Biosynthese (nicht der Cholesterol-Synthese) ist der Grund für eine verminderte DNA-Syntheserate in PDGF-stimulierten humanen vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) durch die Wirkung von Simvastatin (1-10 μ M). Dabei beruht der antiproliferative Effekt auf einer Hemmung des durch PDGF induzierten Rho-abhängigen Abbaus des CDK-Inhibitors p27^{kip1}, jedoch ohne Induktion anderer CKI wie p16^{ink4A} oder p21^{cip1}. Die zelluläre p27^{kip1}-Konzentration steigt unter dem Einfluss des Statins auf das bis zu 20fache an. Auch die PDGF-induzierte Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma-Genprodukts (Rb) sowie die Aktivität verschiedener CDK's (CDK2, 4, 6) werden durch die Statinbehandlung inhibiert [LAUFS et al., 1999].

Statine unterbrechen den Zellzyklus zwischen der G_1 - und der S-Phase, wobei unklar ist, ob die Induktion von p27^{kip1} bei allen Statinen auftritt und möglicherweise ohne den Einfluss weiterer Faktoren den Zellzyklusarrest auslösen kann [TAKEMOTO und LIAO, 2001].

Kleine GTP-bindende Proteine (z.B. Ras, Rho) sind Substrate von Isoprenylierungsreaktionen (vgl. Kapitel 1.5.3) und ebenfalls in die Regulation des Zellzyklus involviert. Ras beeinflusst die Zellzyklusprogression über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges (Mitogen-Activated Protein Kinase pathway), während Rho-abhängige Proliferation auf einer Destabilisierung von p27^{kip1}-Molekülen beruht [HUGHES, 1995; HENGST und REED, 1996].

Die vielfältigen Wirkungsweisen des hochpotenten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Cerivastatin sind unter dem Begriff der "pleiotropen Statineffekte" Gegenstand der Untersuchung zahlreicher Forschungsgruppen [TAKEMOTO und LIAO, 2001]. Sie tragen neben der cholesterinsenkenden Wirkung zur klinischen Effizienz bei oraler Verabreichung des Medikaments bei [SPOSITO und CHAPMAN, 2002; KINLAY et al., 2003]. Zur Entdeckung der pleiotropen Effekte kam es durch ein signifikant geringeres Infarktrisiko bei Patienten unter oraler Pravastatintherapie, unabhängig von einer nachweisbaren Cholesterinsenkung im Rahmen der WOSCOPS- und CARE-Studien [PACKARD et al., 1998; SACKS et al., 1996]. Subgruppenanalysen der AFCAPS/TexCAPS-Studien ergaben für Patienten mit oraler Lovastatintherapie unabhängig von einer nachweisbaren Reduktion der Serumcholesterol-Konzentration ein verringertes Risiko kardialer Ereignisse, das mit einer Statin-induzierten Reduktion des inflammatorischen Markerproteins hs-CRP in Verbindung gebracht werden konnte [RIDKER et al., 2001].

Neben dieser anti-inflammatorischen Wirkung gehören zu den cholesterinunabhängigen Effekten eine antiproliferative und antimigratorische Wirkung auf vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen [BELLOSTA et al., 1998], die Hemmung von Aggregation und Plättchenfunktion [LIJNEN et al., 1996; HUHLE et al., 1999] und eine Plaque-stabilisierende Wirkung durch Inhibition der Makrophagen-Proliferation und -Migration bzw. durch Reduktion der Plaque-Größe [BELLOSTA et al., 1998; CRISBY et al., 2001; SAKAI et al., 1997]. Die Verbesserung der Endothelfunktion über die Erhöhung der zellulären eNOS-Aktivität [LAUFS et al., 1997] oder deren transkriptionelle Induktion z.B. durch Rosuvastatin [JONES et al., 2002] sind weitere wichtige Faktoren der gefäßprotektiven Statin-Wirkung. Durch die Aktivität endothelialer NOS gemeinsam mit der für einzelne Statine nachgewiesenen Fähigkeit zur Neutralisierung freier Radikale [RIKITAKE et al., 2001] kommt es zu einer Verminderung von oxidativem Stress in den Gefäßen.

Für die klinische Prävention der Restenose ist die Hemmung der Zellzyklusprogression ein interessanter Ansatzpunkt. Eine Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo* ist wahrscheinlich: Im Kaninchenmodell kommt es durch eine orale Verabreichung verschiedener Statine (Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin) zu einer reduzierten Neointimaformation 14 Tagen nach einer Gefäßverletzung [SOMA et al., 1993].

Bei systemischer Applikation hoher Dosen Simvastatin ist in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen eine Reduktion der Neointimadicke nachweisbar [CHEN et al., 2002]. Im porcinen kurzzeitige katheterbasierte PTCA-Modell führt eine Behandlung mit einem Farnesyltransferase-Inhibitor (FPTIII) zu einer Verminderung der CASMC-Proliferation [WORK et al., 2001]. Der zu Grunde liegende Mechanismus über die Hemmung der Farnesylierung des kleinen G-Proteins Ras gleicht dem vieler Statine und erweist sich in diesem Modell zur Prävention der Neointimahyperplasie als geeignet. Im Menschen scheint jedoch kein kausaler Zusammenhang einer oralen Statin-Therapie mit dem Auftreten einer Restenose nach perkutaner koronarer Intervention (PCI) zu existieren [CHAN et al., 2003]. Diese Tatsache beruht wahrscheinlich auf der zu geringen, therapeutisch ineffizienten Wirkstoffkonzentration am Zielort im Gefäß.

Das semisynthetische Cerivastatin ist von allen bekannten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren das mit Abstand wirksamste Medikament zur Inhibition der VSMC-Proliferation und Migration [BELLOSTA et al., 1998] mit einer bis zu 100fach erhöhten Aktivität gegenüber anderen Statinen [BISCHOFF et al., 1997].

Aus diesem Grund erscheint Cerivastatin als ein geeigneter Wirkstoffkandidat zur Therapie der ISR. Die lokale Applikation des hochwirksamen HMG-CoA Reduktase-Inhibitors über beschichtete Stent-Systeme ist dabei eine vollständig neue Strategie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine effiziente Hemmung der mitogeninduzierten Proliferation humaner glatter Gefäßmuskelzellen durch Cerivastatin in niedriger Dosierung (5-10 nM). Interessant ist, dass die Inhibition der Gefäß-Endothelzellen erst bei höheren Konzentrationen (50-100 nM auftritt). Durch diesen differenziellen Charakter der antiproliferativen Wirkung entsteht ein schmales therapeutisches Fenster, innerhalb dessen es durch die Wirkung des Statins zu einer Hemmung der CASMC-Proliferation und damit zu einer verminderten Neointimabildung kommt, während der Prozess der Reendothelialisierung und damit das Einwachsen der Stentstreben ungehindert ablaufen kann. Bei optimaler Dosierung des Medikaments könnte so nach Implantation eines Cerivastatinbeschichteten Stents der Heilungsprozess unbeeinflusst bleiben.

Die im Vergleich zu CASMC in Endothelzellen reduzierte antiproliferative Aktivität des Medikaments könnte in der erhöhten Präsenz des endothelialen Enzyms eNOS begründet sein, das durch die Wirkung von Statinen in Endothelzellen induziert bzw. aktiviert wird [LAUFS et al., 1998]. Die gesteigerte endotheliale NO-Produktion hat wiederum eine aktivierende Wirkung sowohl auf die Proliferation als auch die Funktion endothelialer Zellen [BAYRAKTUTAN, 2004]. Eine Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark über die Wirkung von Statinen kann evt. sogar zu einer Beschleunigung der Reendothelialisierung führen [WALTER, 2004].

In humanen VSMC beruht die proliferationsinhibierende Wirkung von Simvastatin auf einer erhöhten Konzentration des CKI p27^{kip1}, dessen Abbau bei mitogener Stimulation durch die Wirkung von Rho induziert wird [LAUFS et al., 1999]. Ob alle Statine zu einer erhöhten Präsenz dieses CKI führen, ist bislang noch nicht geklärt [TAKEMOTO und LIAO, 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in mitogen stimulierten humanen CASMC eine Erhöhung der zellulären p27^{kip1}-Konzentration nach Zugabe von Cerivastatin nachgewiesen, die wahrscheinlich auf einer Hemmung der Rho-induzierten Degradation des CKI beruht. Für eine normale Membrantranslokation und Aktivierung benötigt Rho eine GGPP-Seitenkette, die durch posttranslationale Modifikation angefügt wird. Die Tatsache, dass der Cerivastatin-

induzierte G₁-Zellzyklusarrest durch die Wirkung von GGPP aufgehoben werden kann, spricht für einen Rho-abhängigen pleiotropen Mechanismus.

In vitro führen viele Statine (u.a. Cerivastatin) zu einer dosisabhängigen Hemmung der migratorischen Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen [BELLOSTA et al., 1998].

Der Einfluss von Cerivastatin auf die zelluläre Mobilität zeigte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen einen ähnlichen Charakter wie in den Untersuchungen zur Proliferation. Durch die Wirkung von Cerivastatin kam es zu einer Hemmung der Fibronektin-induzierten Migration humaner CASMC, die Mobilität von CAEC wurde unter den gleichen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine differenzielle in vivo Inhibition der Neointimabildung ohne negativen Einfluss auf die Reendothelialisierung. Die molekularen Gründe für die Interferenz mit der CASMC-Migration liegen dabei wahrscheinlich in der unter dem Einfluss von Cerivastatin verstärkten Präsenz der zellulären Proteine p27^{kip1} und IRF-1, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde. Beide Proteine konnten bereits im Rahmen anderer Untersuchungen als Hemmfaktoren der Mobilität glatter Gefäßmuskelzellen identifiziert werden [SUN et al., 2001; WESSELY et al., 2003].

Eine verminderte ISR-Rate nach Implantation beschichteter Stents ist sowohl unter Verwendung von Rapamycin (Sirolimus) als auch mit Paclitaxel (Taxol) beschrieben [STONE et al., 2004; MOSES et al., 2003]. Beide Substanzen besitzen u.a. eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung. Rapamycin agiert dabei über die Bindung an seinen spezifischen intrazellulären Rezeptor (FKBP12) und die nachfolgende Stabilisierung des CKI p27^{kip1} [MARKS, 2003], während Paclitaxel über die Inhibition der Mikrotubuli-Aktivität zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führt [SCHIFF et al., 1979]. Die Mitglieder der cip/kip-Familie scheinen verglichen mit anderen CDK-Inhibitoren bei der therapeutischen Prävention der CASMC-Hyperproliferation eine wichtige Funktion zu haben [TANNER et al., 2000]. Vieles deutet darauf hin, dass die zellzyklusinhibitorische Wirkung eines Medikaments, möglicherweise bevorzugt über die Induktion genau dieser Proteine, die Voraussetzung für dessen therapeutischen Erfolg ist. Da die mitogene Stimulation durch die Implantation eines Stents im Vergleich zu PTCA oder primärer Atherosklerose eine ausschlaggebende Rolle spielt, ist in diesem Fall eine antiproliferative Therapie besonders erfolgversprechend.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Cerivastatin den Zellzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen in der G₁-Phase effizient unterbricht. Ähnlich wie bei Rapamycin kommt es durch die

Wirkung des Statins zu einer erhöhten zellulären p27^{kip1}-Konzentration und darüber hinaus mit p21^{cip1} zur Induktion eines weiteren CKI der cip/kip-Familie. Es ist anzunehmen, dass der Wirkmechanismus von Cerivastatin dem von Rapamycin ähnlich oder sogar überlegen ist.

Die Induktion von p21^{cip1} ist zumindest teilweise bedingt durch eine Aktivierung der Transkription über p53 [VOGELSTEIN et al., 2000] oder andere Transkriptionsfaktoren, z.B. IRF-1 [WESSELY et al., 2003]. Eine erhöhte IRF-1-Konzentration in CASMC nach Cerivastatin-Zugabe war im Rahmen dieser Untersuchungen während der gesamten Inkubationsdauer von 48 Stunden nachweisbar.

Die Cycline des Typs D, E und A sind die molekulare Grundlage für die Regulation der frühen Zellzyklusprogression (G₁- und S-Phase) [SHERR, 1994; FANG und NEWPORT, 1991]. Cycline des D-Typs steuern die sehr frühe Zellzyklusprogression durch die G₁-Phase, A-Typ-Cycline dagegen werden erst bei der Regulation der S- bis M-Phase-Progression wirksam. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine signifikante Abnahme der Cycline A₁, A₂ und D₁ in CASMC unter dem Einfluss von Cerivastatin im Vergleich zu unbehandelten, ebenfalls mitogen stimulierten Zellen beginnend nach 18-24 Stunden.

Die Regulation zellulärer Cyclin E-Spiegel blieb unter dem Einfluss von Cerivastatin unverändert. Dies überrascht nicht, da die Entdeckung von $p27^{kip1}$ als Regulator des Eintritts in die S-Phase in kontaktinhibierten bzw. in durch TGF- β in G₁ arretierten Zellen stattfand, die trotz der Präsenz von CDK2/Cyclin E-Komplexen keine Cyclin E-assoziierte Kinaseaktivität aufwiesen [KOFF et al., 1993]. Die unter dem Einfluss von Cerivastatin erhöhte $p27^{kip1}$ -Konzentration ist demnach eine wahrscheinliche Erklärung für die trotz gleichbleibender Cyclin E-Konzentrationen nachweisbare Unterbrechung des Zellzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen.

Neben einer vergleichenden Analyse der Wirkmechanismen von Cerivastatin zur Behandlung der ISR ist v.a. bei lokaler Applikation die Sicherheit und therapeutische Breite des Wirkstoffs von besonderem Interesse. Die durchgeführten Untersuchungen zu Toxizität und möglicher Apoptoseinduktion zeigten bis hin zu hohen Konzentrationen (500 nM) in beiden Zellsystemen weder cytopathische noch pro-apoptotische Effekte. Es kann daher davon werden, dass das Medikament aufgrund seines breiten sicheren ausgegangen Konzentrationsbereichs zur lokalen Anwendung mittels beschichteter Stents gut geeignet ist. Die histologische Untersuchung nach Explantation der Cerivastatin-beschichteten Stents im Abwesenheit Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigte die vaskulärer

Entzündungsreaktionen bzw. nekrotischer Gewebeveränderungen im Rattenmodell. Duplexsonographische Untersuchungen zeigten für beschichtete Stents verglichen mit unbeschichteten Kontrollen eine unverändert niedrige Thrombose-Inzidenz im Stentbereich. Dabei erhielten die Tiere nach der Stentimplantation weder Clopidogrel noch Aspirin.

Die auf der Basis der durchgeführten Experimente definierte *in vitro*-Freisetzungskinetik zeigt eine nahezu vollständige Elution des in der Stent-Matrix gespeicherten Cerivastatins innerhalb der ersten drei Stunden. Diese rasche Freisetzung ist für dieses spezielle Stent-System nicht aussergewöhnlich und wurde ebenso schon für andere Substanzen gezeigt [ARMSTRONG et al., 2002]. Beschichtet mit 17β-Estradiol erwies sich das BiodivYsio-Matrix[™] DD Stent-System in der Limitierung von ISR im humanen System als sicher und effektiv (EASTER-Studie), obwohl auch die Freisetzung dieser (lipophilen) Substanz bereits nach ca. 24 Stunden abgeschlossen ist [ABIZAID et al., 2004]. *In vitro*-Experimente mit Angiopeptin-beschichteten BiodivYsio[™]-Matrix DD Stents in PBS zeigten für dieses (hydrophile) Medikament eine Freisetzungsdauer von weniger als 20 Minuten. Trotz der kurzen Zeitspanne konnte freigesetztes radioaktiv markiertes Angiopeptin im Rahmen von *in vivo*-Experimenten im porcinen Modell auch nach 28 Tagen in der Gefäßwand nachgewiesen werden [LEWIS et al., 2001]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass auch bei der für hydrophile Substanzen wie Cerivastatin typischen, sehr kurzen Dauer der Freisetzung Wirkstoff in die Gefäßwand gelangen kann und dort nachweisbar ist.

Die Verwendung von "Top-Coatings" zur Überschichtung der in der Matrix gebundenen Substanz führt zu einer verlangsamten Freisetzung des Medikaments und ermöglicht die Anwendung einer höheren Gesamtdosis bei gleichzeitiger Vermeidung einer v.a. initial zu hohen freigesetzten Menge pro Zeiteinheit ("Burst"-Effekt). Beispielsweise kann die Effizienz Methylprednisolon-beschichteter Stents durch ein Imprägnieren mit PFM-P75 (= Fluoriertes Polymetacrylat) hinsichtlich der inflammatorischen und proliferationsinduzierenden Eigenschaften signifikant verbessert werden, nicht zuletzt durch eine verlangsamte Freisetzung des Wirkstoffs von 80% auf 13% der Gesamtmenge während der ersten 48 Stunden [HUANG et al., 2002]. In einem anderen Stent-System kann die Freisetzung von Heparin aus einer biodegradierbaren Polylaktid-Matrix durch Beimischung von plastizierend wirkendem Polyethylenglykol verlangsamt und der unerwünschte "Burst"-Effekt abgeschwächt werden [TAN et al., 2004]. Möglicherweise kann eine durch Verbesserung der Stent-Plattform erreichte Verlängerung der Freisetzungsdauer die klinische Effizienz auch des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Systems noch verbessern. Interessanterweise kam es in einer Studie mit Rapamycin-beschichteten Stents im porcinen Modell zur Entstehung später Restenosen (nach 60 bis 90 Tagen), ein Phänomen, über das beim Menschen seit der Implantation des ersten Rapamycin-beschichteten Stents im Jahre 2000 nur in Einzelfällen berichtet wurde [CARTER et al., 2004]. Wahrscheinlich ist die Aufhebung des antiproliferativen Effekts von Rapamycin durch den anhaltenden inflammatorischen Stimulus, hervorgerufen durch das polymere Matrix-Material der Grund.

Weitere Komplikationen des sonst so erfolgreichen Rapamycin-freisetzenden Systems sind die geringere Wirksamkeit in kleinen Gefäßen, bei Diabetikern und bei der Behandlung von ISR (Stent-in-Stent-Implantation) [HOLMES und KEREIAKES, 2005].

Aktuelle Publikationen berichten über späte thrombotische Ereignisse, ausgelöst möglicherweise durch eine verlangsamte Reendothelialisierung, die nach bis zu 18 Monaten zu einem vollständigen Verschluss des gestenteten Gefäßabschnittes führen können [ZIMARINO et al., 2005]. Eine möglichst rasche und vollständige Wundheilung und Reendothelialisierung nach einer Gefäßverletzung durch die Implantation eines koronaren Stents gilt als die wichtigste Voraussetzung für das Ausbleiben späterer Komplikationen wie Thrombosierung, ISR oder inflammatorische Reaktionen [SCHNEIDER und DICHEK, 1997]. Neuere Publikationen betrachten die Wiederherstellung einer intakten Endothelfunktion als den wichtigsten Aspekt zukünftiger Strategien der Restenoseprävention [LOSORDO et al., 2003] und bei der Entwicklung einer "neuen Generation" beschichteter Stent-Systeme [KIPSHIDZE et al., 2004].

Der Reendothelialisierungs-Prozess konnte in dieser Arbeit am verwendeten Carotis-Verletzungsmodell der Ratte analysiert werden. In den denudierten und verletzten Gefäßen waren sowohl Cerivastatin-beschichtete als auch Kontroll-Stents 14 Tage nach der Implantation zu einem überwiegenden Teil durch von Willebrand-Faktor-positive Zellen des Endothels bedeckt. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese der differenziellen CASMC-Hemmung bei gleichzeitiger endothelprotektiver Funktion des Medikaments und macht Cerivastatin zu einem besonders interessanten Kandidaten für die Beschichtung von Stents auch bezüglich einer Anwendung in humanen Studien.

Die Entwicklung der klinischen Kardiologie wird von Eduardo MARBÁN in einem aktuellen Artikel in drei Phasen eingeteilt: Das "Klassische Zeitalter" (1950-1970er) der Entwicklung wichtiger diagnostischer Methoden und das "Interventionelle Zeitalter" (1980-1990er) mit der Einführung von PTCA und Stents, beide charakterisiert durch beschreibende Arbeit und physikalische Prinzipien. Mit dem Jahr 2000 beginnt, so MARBÁN, das "Translationale

Zeitalter", in welchem die Entdeckung fundamentaler biologischer Prinzipien in raschem Fortschritt für große Veränderungen der praktischen Arbeit in den Kliniken sorgen werde. Beginnend mit dem biologischen Verständnis der Prozesse der ISR und der Entwicklung antiproliferativ beschichteter Stents beinhalte diese Ära für die klinische Grundlagenforschung hoffnungsvolle Aussicht auf eine direkte und zeitnahe Einflussnahme auf die angewandte Kardiologie [MARBÁN, 2005].

In diesem Kontext versteht sich die vorliegende Arbeit als Beitrag zum Fortschritt der Prävention der In-Stent Restenose. Die Etablierung und Validierung zweier völlig neuartiger Konzepte der Stent-Beschichtung in Form einer dualen Zellzyklusinhibition durch den synthetischen Kinaseinhibitor Flavopiridol bzw. einer differenziellen Inhibition der CASMC-Proliferation durch die Wirkung von Cerivastatin erscheinen als aussichtsreiche Strategien zur Lösung dieses wohl doch noch immer relevanten Problems.

> "Die gefährlichsten Herzkrankheiten sind immer noch Neid, Haß und Geiz" *Pearl. S. Buck*

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den westlichen Industrienationen haben ca. 50% der Todesfälle kardiovaskuläre Erkrankungen als Ursache. In 20-50% der Fälle kommt es nach einer Dilatation der Koronargefäße mittels PTCA (= perkutane transluminale Angioplastie) zur Entwicklung einer Restenose. Die interventionelle Therapie beinhaltet in über 70% der Fälle die Implantation einer Gefäßstütze (Stent), durch die die Inzidenz der Restenose auf etwa ein Viertel bis ein Drittel der Fälle verringert werden kann. Zur vollständigen Prävention der In-Stent Restenose (ISR) gibt es jedoch bislang keine etablierte Therapie.

Das pathoanatomische Korrelat der Restenose ist die Neointimahyperplasie, deren zellulärer Anteil zu etwa 90% aus koronaren glatten Gefäßmuskelzellen (CASMC) besteht, die aus der Media- in die Intimaregion migrieren und dort proliferieren. Der Zellzyklus als die gemeinsame Endstrecke aller mitotischen Signaltransduktionswege bietet daher attraktive therapeutischen Zielstukturen zur Prävention von Erkrankungen mit hyperproliferativem Charakter. Systemische Therapieansätze mit antiproliferativ wirksamen Substanzen erwiesen sich beim Menschen bislang jedoch als unwirksam. Mit einer lokalen Applikation über die Beschichtung von Stents hingegen können hohe Konzentrationen am Zielort bei gleichzeitiger Minimierung der systemischen Nebenwirkungen erreicht werden.

Eine (selektive) Inhibition der Proliferation von CASMC als Strategie zur Restenoseprävention war das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit. Ziel war die Etablierung eines antiproliferativ beschichteten Stent-Systems bis hin zur sicheren, präklinischen Anwendung. Zwei völlig neuartige Therapieansätze wurden untersucht: Die Applikation eines synthetischen Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen (Flavopiridol) zum einen, zum anderen die Anwendung von Cerivastatin unter der Hypothese einer differenziellen Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ohne Beeinträchtigung der Endothelzellen.

Flavopiridol führte in kultivierten humanen CASMC zu einer effizienten Unterbrechung des Zellzyklus sowohl in der G₁- als auch in der G₂/M-Phase. Auf molekularer Ebene führte Flavopiridol zu einer verminderten Expression der Cycline A₁, A₂ und D₁ sowie zur Induktion von CDK-Inhibitoren (CKI) der cip/kip-Familie ($p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$) und des Tumorsuppressors p53 auf Proteinebene. Überdies wurde die Hyperphosphorylierung von Retinoblastoma-Protein (Rb), einem Marker der G₁/S-Phase-Transition, inhibiert. Die mitogenabhängige Zellmigration im Boyden-Kammer-System wurde in CASMC durch Flavopiridol konzentrationsabhängig herabgesetzt. Bis hin zu hohen Dosen zeigte das Medikament *in vitro* weder in CASMC noch in CAEC detektierbare cytotoxische oder pro-apoptotische Effekte.

Die Beschichtung eines klinisch etablierten Stent-Systems (BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent) mit Flavopiridol erwies sich als durchführbar und die Kinetik der *in vitro*- Freisetzung konnte durch zellbiologische sowie HPLC-basierte Analysen charakterisiert werden. Die Applikation Flavopiridol-beschichteter Stents im Carotis-Verletzungsmodell der Ratte erwies sich als sicher und führte zu einer signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie, verglichen mit identischen, nicht beschichteten Stents.

Cerivastatin ist ein semisynthetischer HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, der in den letzten Jahren klinisch zur Therapie von Hypercholesterinämien eingesetzt wurde. Im Vordergrund standen für diese Arbeit die cholesterinunabhängigen (pleiotropen) Effekte dieses hochwirksamen Medikaments, dessen Effizienz die anderer Statine bis zu 100fach übertrifft. In vitro kam es durch die Wirkung nanomolarer Cerivastatin-Konzentrationen zu einer potenten Inhibition der CASMC-Proliferation, ohne signifikante Inhibition der Endothelzellen unter vergleichbaren Bedingungen. Im Boyden-Kammer-System zeigte sich eine selektive Hemmung der Fibronektin-induzierten Migration von CASMC, die Mobilität der Endothelzellen als wichtiger Vorgang der Reendothelialisierung war bei gleichen Cerivastatin-Konzentrationen nicht beeinträchtigt. Durch eine Erhöhung der CKI-Level (p21^{cip1} und p27^{kip1}) sowie von IRF-1 kam es in CASMC zu einer Inhibition des Zellzyklus noch vor der G₁/S-Phase-Transition, die durch FACS-Analyse bestätigt werden konnte. Molekulare Marker für den Zellzyklusarrest waren die Inhibition der Hyperphosphorylierung von Rb und die verminderte Konzentration der Cycline A1, A2 und D1. Selbst hohe Cerivastatin-Konzentrationen (bis 500 nM) führten weder in CASMC noch in CAEC zu detektierbaren cytotoxischen oder apoptotischen Effekten - Indiz für einen breiten therapeutisch sicheren Konzentrationsbereich des Medikaments.

Trotz einer *in-vitro* ermittelten Freisetzungsdauer von nur wenigen Stunden führten Cerivastatin-beschichtete im Vergleich zu unbeschichteten Stents im Rattenmodell zu einer signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie.

Mechanistische Untersuchungen und Dosisfindungsexperimente *in vitro* konnten erfolgreich auf ein etabliertes Tiermodell übertragen werden. Sowohl die lokale Applikation eines CDK-Antagonisten als auch eines hochwirksamen Statins sind chancenreiche Strategien zur ISR-Prävention und rechtfertigen weitere Untersuchungen mit dem Ziel der klinischen Applikation am Menschen.

6 SUMMARY

Efficiency and molecular mechanisms of cell cycle inhibitory strategies preventing neointimal hyperplasia in human restenosis

Considering western industrial nations cardiovascular diseases are representing about 50% of the occuring death cases. Restenosis development after dilatation of coronary vessels by use of PTCA (= percutaneous transluminal coronary angioplasty) is found in about 20-50% of all cases. Interventional therapy mostly implicates synchroneous stent placement (>70%) leading to reduced restenosis rates of one fourth up to one third of all cases. However, a convenient therapy method for complete prevention of in-stent restenosis (ISR) is not yet known.

The pathophysiological correspondent to ISR is the incidence of hyperproliferative neointimal tissue containing more than 90% coronary artery smooth muscle cells (CASMC), which migrate out of the medial into intimal regions of the vessel where proliferation takes place. The cell cycle as the final common step of all mitotic pathways offers numerous attractive therapeutic targets to prevent disesases with hyperproliferative character.

So far, systemic approaches using antiproliferative drugs proved to be ineffective in humans. Local application techniques using stents coated with appropriate medicaments lead to high drug concentrations in target tissues with minimal systemic side effects at the same time.

The prevention of restenosis by (selective) inhibition of CASMC proliferation was the capital issue of this work. The aim of the study was the development of a drug-coated stent system with antiproliferative effects designated for later pre-clinical application studies.

Therefore two quite novel therapy strategies were examined: Application of a synthetic inhibitor of cyclin dependent kinases (flavopiridol) first, and second cerivastatin as a candidate for differential inhibition of CASMC proliferation without any adverse effects on endothelial cells.

In cultivated human CASMC flavopiridol lead to an efficient abrogation in G_1 as well as in the G_2 -phase of the cell cycle. Reduced expression of cyclins A_1 , A_2 and D_1 as well as induction of cdk-inhibitors (cki) of the cip/kip-family (p21^{cip1}, p27^{kip1}) and the tumorsuppressor p53 were observed regarding protein expression levels.
Moreover, hyperphosphorylation of retinoblastoma protein (Rb) representing an important marker of G_1 /S-phase transition was inhibited. Flavopiridol concentration dependently lead to reduced activity of mitogen dependent CASMC-migration. Up to high concentrations no detectable cytotoxic or pro-apoptotic effects of the drug could be observed *in vitro*.

Coating of a clinically well established stent system (BiodivYsio[™] Matrix DD Stent) proved to be feasible and *in vitro* release kinetics could be characterized by use of a cytological method as well as by HPLC-based analysis. Application of flavopiridol-coated stents in rats according to the carotis injury model turned out to be safe and lead to a significant reduction of neointimal hyperplasia compared to identical, but non coated stents.

The semisynthetic HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin proved to be effective in the clinical prevention of hypercholesterolemia in recent years.

The main subject for this work were the cholesterol-independent (pleiotropic) effects of this highly efficient statin, which is 100fold more potent than other known statins.

Even nanomolar cerivastatin-concentrations lead to a potent repression of CASMC proliferation *in vitro* with only negligeable inhibition of endothelial cell proliferation. Fibronectin-induced cellular migration in an experimental Boyden chamber system was selectively inhibited in CASMC, whereas endothelial cell mobility as an important part of the reendothelialization process was not affected at the same cerivastatin-concentrations. Elevated levels of cki ($p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$) as well as IRF-1 caused the abrogation of cell cycle progression in CASMC at the point of G_1 /S phase transition. Cell cycle arrest was further validated on the molecular level by the evidence of reduced Rb hyperphosphorylation as well as downregulation of cellular cyclins A_1 , A_2 und D_1 . Both CASMC and CAEC showed no cytotoxic or pro-apoptotic signs even after treatment with high concentrations (up to 500 nM) indicating a broad therapeutic safe concentration range of the drug.

Despite a relatively short release period of no longer than a few hours, cerivastatin coated stents lead to a significant reduction of neointimal hyperplasia in the rat carotid injury model compared to uncoated stents.

In vitro examination of drug associated mechanisms and dose-rate determination could be successfully transferred to a well established animal model. Local application of a cdk-antagonist as well as a potent statin proved to be promising strategies to prevent ISR and warrent further investigations culminating in human clinical application.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AGMR, 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;43:1118-1121.

Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA. Post-translational Modifications of p21rho Proteins. J Biol Chemistry 1992;267(28):20033-20038.

Arakawa K, Isoda K, Sugiyabu Y, Fukuda M, Nishizawa K, Shibuya T, Nakamura H. Intimal proliferation after stenting reflected by increased stent-to-vessel cross-sectional area ratio: serial intravascular ultrasound study. J Cardiol 1998;32:379-389.

Armstrong J, Gunn J, Arnold N, Malik N, Chan KH, Vick T, Stratford P, Cumberland DC, Holt CM. Angiopeptin-eluting stents: observations in human vessels and pig coronary arteries. J Invasive Cardiol 2002;14(5):230-238.

Ashcroft M and Vousden KH. Regulation of p53 stability. Oncogene 1999;18:7637-7643.

Ashcroft M, Kubbutat MHG, Vousden KH. Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. Mol Cell Biol 1999;19(3):1751-1758.

Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, Wild DH, Brehm BR, Riessen R, Koveker G, Karsch KR. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. Circulation 1997;96:636-645.

Bar-Or RL, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study. Proc Natl Acad Sci 2000;97:11250-11255.

Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy AE, Fenton JD, Wilner GD, Vlodavsky I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. Cell Regul 1990;1:453-463.

Bayraktutan U. Nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase modulate coronary endothelial cell growth. J Mol Cell Cardiol 2004;36:277-286.

Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Atherosclerosis 1998;137 Suppl:S101-S109.

Bennett MR and O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. Pharmacol Ther 2001;91:149-166.

Betteridge DJ. International multicentre comparison of Cerivastatin with placebo and Simvastatin for the treatment of patients with primary hypercholesterolaemia. International Cerivastatin Study Group. Int J Clin Prct 1999;53:243-250.

Bischoff H, Angerbauer R, Bender J, Bischoff E, Faggiotto A, Petzinna D, Pfitzner J, Porter M, Schmidt D, Thomas G. Cerivastatin: pharmacology of a novel synthetic and highly active HMG-CoA reductase inhibitor. Atherosclerosis 1997;135:119-130.

Bjorkerud S and Bondjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury: part 5. Tissue response after induction of a large superficial transverse injury. Atherosclerosis 1973;18(2):235-255.

Bokisch A, Meyer J, Darius H, Heusch G, Hort W, Mohr-Kahaly S, Rupprecht HJ. Therapie der stabilen und instabilen Angina pectoris. Erdmann E (Hrsg.), Klinische Kardiologie, 5. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 2000; 355-386.

Boland JL, Vorbeij HA, Van der Giessen W, Seabra-Gomes R, Suryapranata H, Wijns W, Hanet C, Suttorp MJ, Buller C, Bonnier JJ, Colombo A, Van Biergelen C, Pieper M, Mangioni JA, Lindero H, Carere RG, Hamm CW, Bonan R, Bartorelli A, Kyriakides ZS, Ahauhan A, Rothmann M, Grinfeld L, Oosterwijk C, Serruys PW, Cumberland DC. Multicenter evaluation of th phosphorylcholine-coated biodivYsio stent in short de novo coronary lesions: The SOPHOS study. Int J Cardiovasc Intervent 2000;3(4):215-225.

Böttiger B und Fleischer F. Medikamentöse Therapie der koronaren Herzkrankheit. Anaesthesist 1994;43:699-717.

Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. Circulation 1998;98:82-89.

Braun-Dullaeus RC, Ziegler A, Bohle RM, Bauer E, Hein S, Tillmanns H, Haberbosch W. Quantification of the cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 in human atherectomy specimens: Primary stenosis versus restenosis. J Lab Clin Med 2003;141:179-189.

Bravo R, Frank R, Blundell PA, and Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ. Nature 1987;326:515-517.

Brouchet L, Drust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. Circulation 2001;103:423-428.

Brown MS and Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells and blood. Proc Natl Acad Sci 1999;96:11041-11048.

Brusselbach S, Nettelbeck DM, Sedlacek HH, Muller R. Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug Flavopiridol in endothelial cells. Int J Cancer 1998;77(1):146-152.

Burns WA, Bretschneider AM, Morrison AB. Embeddeing in large plastic blocks. Diagnostic light and potential electron microscopy on the same block. Arch Pathol Lab Med 1979;103:177-179.

Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. Downregulation of Cyclin D1 by Transcriptional Repression in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells Induced by Flavopiridol. Cancer Res 1999;59:4634-4641.

Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, Tio F, Tsao PS, Lolata R, Yeung AC, Llanos G, Dooley J, Falotico R. Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. Cardiovasc Res 2004;63:617-624.

Celec P and Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor – basic science and its clinical implications. Pathophysiology 2004;11:69-75.

Cha KS, Kim MH, Kim JW, Kim DI, Kim HJ, Kim DS, Kim JS. Comparison between a sustained administration of carvedilol versus atenolol to reduce restenosis after coronary stenting. Am Heart J 2004;147(2):E7.

Chan AW, Bhatt DL, Chew DP, Reginelli J, Schneider JP, Topol EJ, Ellis SG. Relation of Inflammation and Benefit of Statins After Percutaneous Coronary Interventions. Circulation 2003;107:1750-1756.

Chao SH and Price DH. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. J Biol Chem 2001;276:31793-31799.

Chen Z, Fukutomi T, Zago AC, Ehlers R, Detmers PA, Wright SD, Rogers C, Simon DI. Simvastatin Reduces Neointimal Thickening in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice After Experimental Angioplasty Without Changing Plasma Lipids. Circulation 2002;106:20-23.

Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. Lab Invest 1983;49:205-215. **Cohen** DJ, Bakhai A, Shi C, Githiora L, Lavelle T, Berezin RH, Leon MB, Moses JW, Carrozza JP, Zidar JP, Duntz RE; on behalf of the SIRIUS Investigators. Cost-Effectiveness of Sirolimus-Eluting Stents for Treatment of Complex Coronary Stenoses. Results From the Sirolimus-Eluting Balloon Expandable Stent in the Treatment of Patients With De Novo Native Coronary Artery Lesions (SIRIUS) Trial. Circulation 2004;110:508-514.

Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R; for the MRC/BHF Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2002;360:7-22.

Colombo A, Moses JW, Morice MC, Ludwig J, Holmes DR, Spanos V, Louvard Y, Desmedt B, Di Mario C, Leon MB. Randomized study to evaluate sirolimus-eluting stents implanted at coronary bifurcation lesions. Circulation 2004;109:1244-1249.

Corsini A, Raiteri M, Soma MR, Bernini F, Fumagalli R, Paoletti R. Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl conenzyme A reductase inhibitors. Am J Cardiol 1995;76:21A-28A.

Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. Circulation 2001;103:926-933.

Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, Rebelink TJ, Julmy F, Yang Z, Mahler F, Lüscher TF. 17β-Estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. Cardiovasc Res 1996;32:980-985.

Dartsch PC, Voisard R and Betz E. In vitro growth characteristics of human atherosclerotic plaque cells: comparison of cells from primary stenosing and restenosing lesions of peripheral and coronary arteries. Res Exp Med Berl 1990;190;77-87.

De Azevedo WF, Mueller-Dieckmann H-J, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim S-H. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. Procl Natl Acad Sci 1996;93:2735-2740.

Degertekin M, Serruys PW, Foley DP, Tanabe K, Regar E, Vos J, Smits PC, van der Giessen WJ, van den Brand M, de Feyter P, Popma JJ. Persistent Inhibition of Neointimal Hyperplasia After Sirolimus-Eluting Stent Implantation – Long-Term (Up to 2 Years) Clinical, Angiographic and Intravascular Ultrasound Follow-Up. Circulation 2002;106:1610-1613.

Detre KM, Holmes DR, Holubkov R. Incidence and consequences of periprocedural occlusion: the 1985-1986 National Heart, Lung and Blood Institute Percutaneours Transluminal Coronary Angioplastie Registry. Circulation 1990;82:739-749.

Dev V, Eigler N, Sheth S, Lambert T, Forrester J, Litvack F. Kinetics of drug delivery to the arterial wall via polyurethane-coated removable nitinol stent: comparative study of two drugs. Cathet Cardiovasc Diagn 1995;34(3):272-278.

Dotter CT and Judkins MP. Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a new Technic and a Preliminary Report of its Application. Circulation 1964;30:654-670.

Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM. Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels: Results of AFCAPS/TexCAPS (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA 1998;279:1615-1622.

Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science 1992;257:1958-1961.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev 1998;12:2245-2262.

Dzau VJ. Predicting the future of human gene therapy for cardiovascular diseases: what will the management of coronary artery disease be like in 2005 and 2010? Am J Cardiol 2003;92(9B):32N-35N.

Edelman ER and Rogers C. Hoop dreams. Stents without restenosis. Circulation 1996;94(6):1199-1202.

Ekholm SV and Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Curr Opin Cell Biol 2000;12:676-684.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993;75(4):817-825.

Elezi S, Kastrati A, Neumann FJ, Hadamitzky M, Dirschinger J, Schömig A. Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. Circulation 1998;98:1875-1880.

Emanuelsson H, Serruys PW, van Der Giessen WJ, Dawkins K, Rutsch W, KAtus H, Morel MA, Veldhof S, Wijns W, Sigwart U. Clinical and angiographic results with the multi-links coronary stent system: The West **European** Stent Trial (WEST). J Invasive Cardiol 1997;9:561-568.

Fang F and Newport JW. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. Cell 1991;66:731-742.

Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, Scott DS, Froehlich J, Virmani R. Pathological Analysis of Local Delivery of Paclitaxel Via a Polymer-Coated Stent. Circulation 2001;104:473-479.

Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. Circulation 1999;99:44-52.

Faxon DP. Bringing Reality to Drug-Eluting Stents. Circulation 2004;109:140-142.

Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish RD, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shaknovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S. 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;331:496-501.

Frankfurt OS and Krishan A. Identification of Apoptotic Cells by Formamide-induced DNA Denaturation in Condensed Chromatin. J Histochem Cytochem 2001;49:369-378.

Gallo R, Padurean A, Jayareman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulatores of the cell cycle. Circulation 1999;99(16)2164-2170.

Garg UC and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1989;83:1774-1777.

Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci 1992;89:2317-2320.

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;5:1652-1659.

Gay N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. Curr Med Chem 1999;6(9):859-875.

Gershlick A, De Scheerder I, Chevalier B, Stephens-Lloyd A, Camenzind E, Vrints C, Reifart N, Missault L, Goy JJ, Brinker JA, Raizner AE, Urban P, Heldmann AW. Inhibition of restenosis with a paclitaxel-eluting, polymer-free coronary stent: the European evaLUation of pacliTaxel Eluting Stent (ELUTES) trial. Circulation 2004;109(4):487-493.

Goldstein JL and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature 1990;343:425-430.

Gordon PC, Gibson CM, Cohen DJ, Carrozza JP, Kuntz RE, Baim DS. Mechanisms of restenosis and redilation within coronary stents - quantitative angiographic assessment. J Am Coll Cardiol 1993;21(5):1166-1174.

Gotto AM. Some reflections on arteriosclerosis: Past, present and future. Circulation 1985;72:8-17.

Greenberg D and Cohen DJ. Examining the economic impact of restenosis: implications for the costeffectiveness of an antiproliferative stent. Z Kardiol 2002;91(Suppl 3):137-143.

Grenadier E, Roguin A, Hertz I, Peled B, Boulos M, Nikolsky E, Amikam S, Kerner A, Cohen S, Beyar R. Stenting very small coronary narrowings (<2mm) using the biocompatible phosphorylcholine-coated coronary stent. Cath. Cardiovasc Interv 2002;55:303-308.

Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, BArmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. J Am Coll Cardiol 2000;35:157-163.

Grube E and Buellesfeld L. Paclitaxel-eluting stents: current clinical experience. Am J Cardiovasc Drugs 2004;4(6):355-360.

Grube E, Gerchkens U, Muller R, Bullsfeld L. Drug-eluting stents: initial experiences. Z Kardiol 2002;91(Suppl 3):44-48.

Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. N Engl J Med 1979;301:61-68.

Guevara NV, Kim H-S, Antonova EI, Chan L. Absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. Nat Med 1999;5:335-339.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 1998;279:509-514.

Handbook of Coronary Stents; Anlage (ISBN 1841840025)

Hanke H, Kamenz J, Hassenstein S, Oberhoff M, Haase KK, Baumbach A, Betz E, Karsch KR. Prolonged proliferative response of smooth muscle cells after experimental intravascular stenting. Eur Heart J 1995;16(6):785-793.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell 1999;98(6):859-869.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993;75(4):805-816.

Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Vogeser M, Zohlnhöfer D, Schühlen H, Goos C, Pache J, Dotzer F, Pogatsa-Murray G, Dirschinger J, Heemann U, Schömig A; for the OSIRIS Investigators. Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral Sirolimus for Restenosis Prevention in Patients With In-Stent Restenosis. Circulation 2004;110:790-795. **Hausleiter** J, Kastrati A, Mehili J, Schühlen H, Pache J, Dotzer F, Glatthor C, Siebert S, Dirschinger J, Schömig A, for the ISR-SMART-2 investigators. A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries. J Int Med 2004;256:388-397.

Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kirn DW, Ware M, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel Stent Coating Inhibits Neointimal Hyperplasia at 4 Weeks in a Porcine Model of Coronary Restenosis. Circulation 2001;103:2289-2295.

Hengst L and Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. Science 1996 ;271:1861-1864.

Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Losordo DW, Hendel RC, Bonow RO, Eppler SM, Zioncheck TF, Holmgren EB, McCluskey ER. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery diesase. Am. Heart J 2001;142:872-880.

Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Blattner A, Axel DI, Schröder S, Heinle H, Karsch KR. Local Paclitaxel Delivery for the Prevention of Restenosis: Biological Effects and Efficacy In Vivo. J Am Coll Cardiol 2000;35:1969-1976.

Hermans WRM, Rensing BJ, Strauss BH, Serruys PW. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty – the search for a "magic bullet". Am Heart J 1991;122:171-187.

Hermiller JB, Raizner A, Cannon L, Gurbel PA, Kutcher MA, Wong SC, Russel ME, Ellis SG, Mehran R, Stone GW, for the TAXUS-IV Investigators. Outcomes With the Polymer-Based Paclitaxel-Eluting TAXUS Stent in Patients With Diabetes Mellitus. The TAXUS-IV Trial. J Am Coll Cardiol 2005;45:1172-1179.

Hillis LD und Rutherford JD. Coronary angioplasty compared with bypass grafting. N Engl J Med 1994;331:1086-1087.

Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. Circulation 1996;94:1247-1254.

Holmes DR and Kereiakes DJ. The Approach to Small Vessels in the Era of Drug-Eluting Stents. Rev Cardiovasc Med 2005;6(suppl 1):S31-S37.

Holmes DR, Hirshfeld J, Faxon D, Vlietstra RE, Jacobs A, King SB and co-authors. ACC Expert Consensus Document on Coronary Strety Stents. J Am Coll Cardiol 1998;32(5):1471-1482.

Holmes DR, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimuseluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. Circulation 2004;109(5):634-640.

Holmes DR, Savage M, LaBlanche J-M, Grip L, Serruys PW, Fitzgerald P, Fischman D, Goldberg S, Brinker JA, Zeiher AM, Shapiro LM, Willerson J, Davis BR, Ferguson JJ, Popma J, King SB, Lincoff AM, Tcheng JE, Chan R, Granett JR, Poland M. Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. Circulation 2002;106:1243-1250.

Hose DR, Narracott AJ, Griffiths B, Mahmood S, Gunn J, Sweeney D, Lawford PV. A thermal analogy for modelling drug elution from cardiovascular stents. Comput Meth Biomech Biomed Engin 2004;7(5):257-264.

Huang Y, Wang L, Verweire I, Qiang B, Liu X, Verbeken E, Schacht E, De Scheerder I. Optimization of local methylprednisolone delivery to inhibit inflammatory reaction and neointimal hyperplasia of coated coronary stents. J Invasive Cardiol 2002;14(9):505-513.

Hughes DA. Control of signal transduction and morphogenesis by Ras. Semin Cell Biol 1995;6:89-94.

Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, HeeneDL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. Thromb Res 1999;95:229-234.

Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Physiological Transport Forces Gevern Drug Distribution for Stent-Based Delivery. Circulation 2001;104:600-605.

Igarashi M, Takeda Y, Mori S, Ishibashi N, Komatsu E, Takahashi K, Fuse T, Yamamura M, Kubo K, Sugiyama Y, Saito Y. Suppression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYw6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth. Br J Pharmacol 1997;120(6):1172-1178.

Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther 1988;246(1):218-226.

Int J Oncol 1996;9:1143-1168.

Iofina E, Haager PK, Radke PW, Langenberg R, Blindt R, Ortlepp J, Kühl H, Hanrath P, Hoffmann R. Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents in Comparison With Balloon Angioplasty for Treatment of In-Stent Restenosis. Cath Cardiovasc Interv 2005;64:29-39.

Ip JH., Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman M., Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. J Am Coll Cardiol 1990;15:1667-1687.

Jackson CL and Pettersson KS. Effects of probucol on rat carotid artery responses to balloon catheter injury. Atherosclerosis 2001;154:407-414.

Jones SP, Gibson MF, Rimmer DM, Gibson TM, Sharp BR, Lefer DJ. Direct Vascular and Cardioprotective Effects of Rosuvastatin, a New HMG-CoA Reductase Inhibitor. J Am Coll Cardiol 2002;40:1172-1178.

Kahan BD, Stepkowski SM, Napoli KL, Katz SM, Knight RJ, Van Buren C. The development of sirolimus: The University of Texas-Houston experience. Clin Transpl 2000;X:145-158.

Kastrati A, Schomig A, Elezi S, Schuhlen H, Dirschinger J, Hadamitzky M, Wehinger A, Hausleiter J, Walter H, Neumann FJ. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. J Am Coll Cardiol 1997;30:1428-1436.

Kaur G, Stetler-Stevenson M, Seber S, Wordland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E. Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. J Nat Cancer Inst 1992;84,1736-1740.

Kerr JS, Wexler RS, Mousa SA, Robinson CS, Wexler EJ, Mohamed S, Voss ME, Devenny JJ, Czerniak PM, Gudzelak A Jr, Slee AM. Novel small molecule alpha v integrin antagonists: comparative anti-cancer efficacy with known angiogenesis inhibitors. Anticancer Res 1999;19:959-968.

Kim KS, Sack JS, Tokarski JS, Qian L, Chao ST, Leith L, Kelly YF, Misra RN, Hunt JT, Kimball D, Humphreys WG, Wautlet BS, Mulheron JG, Webster KR. Thio- and Oxoflavopiridols, Cyclin-Dependent Kinase 1-Selective Inhibitors: Biological Effects. J Med Chem 2000;43:4126-4134.

Kim MH, Cha KS, Han JY, Kim HJ, Kim JS. Effect of antioxidant probucol for preventing stent restenosis. Catheter Cardiovasc Interv 2002;57(4):424-428. Kim W, Jeong MH, Chu KS, Hyun DW, Hur SH, Kim KB, Hong YJ, Park HW, Kim JH, Ahn YK, Kim MH, Cho JG, Park JT, Park JC, Kang JC. Effect of Anti-Oxidant (Carvedilol and Probucol) Loaded Stents in a Porcine Coronary Restenosis Model. Circ J 2005;69:101-106.

Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, Szarek M, Libby P, Ganz P; for the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. High-Dose Atorvastatin Enhances the Decline in Inflammatory Markers in Patients With Acute Coronary Syndromes in the MIRACL Study. Circulation 2003;108:1560-1566.

Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys PW. Role of the Endothelium in Modulating Neointimal Formation. J Am Coll Cardiol 2004;44:733-739.

Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2000;96:393-397.

Kjelsberg MA, Seifert P, Edelman ER, Rogers C. Design-Dependent Variations in Coronary Stent Stenosis Measured as Precisely by Angiographhy as by Histology. J Invasive Cardiol 1998;10(Suppl B):3B-11B.

Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresh DA. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. J Cell Biol 1998;140:961-972.

Knudsen ES and Wang JYJ. Dual mechanisms for the Inhibition of E2F Binding to RB by Cyclin-Dependent Kinase-Mediated RB Phosphorylation. Mol Cell Biol 1997;17(10):5771-5783.

Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Fraza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 1992;257:1689-1694.

Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses. Circulation 1998;98:224-233.

Konig A, Schiele TM, Riber J, Theisen K, Mudra H, Klauss V. Influence of stent design and deployment technique on neointima formation and vascular remodeling. Z Kardiol 2002;91(Suppl 3):98-102.

Kubes P, Suzuki M, Ranger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci 1991;88:4651-4655.

Kuchulakanti P and Waksman R. Therapeutic potential of oral antiproliferative agents in the prevention of coronary restenosis. Drugs 2004;64(21):2379-2388.

Kuntz RE, Gibson CM, Nobuyoshi M, Baim DS. Generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty, stenting and directional atherectomy. J Am Coll Cardiol. 1993;21(1):15-25.

Kutryk MJB, Foley DP, van den Brand M, Hamburger JN, van der Giessen WJ, de Feyter PJ, Bruining N, Sabate M, Serruys PW. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis. Results of the randomized ITALICS trial. J Am Coll Cardiol 2002;39:281-287.

Laufs U and Liao JK. Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. J Biol Chem 1998;273(37):24266-24271.

Laufs U and Liao JK. Targeting Rho in Cardiovascular Disease. Circ Res 2000;87:526-528.

Laufs U, La Fata V, Liao JK. Inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase Blocks Hypoxia-mediated Down-regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. J Biol Chem 1997;272:31725-31729.
Laufs U, La Fata V, Platzky J, Liao JK. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG CoA

Reductase Inhibitors. Circulation 1998;97:1129-1335.

Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). J Biol Chem 1999;274:21926-21931.

Lee YJ, Daida H, Yokoi H, Miyano H, Takaya J, Sakurai H, Mokuno H, Yamaguchi H. Effectiveness of probucol in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Jpn Heart J 1996;37:327-332.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997;88(3):323-331.

Lewis AL and Stratford PW. Phosphorylcholine-coated stents. J Long Term Eff Med Implants 2002;12(4):231-250.

Lewis AL, Furze JD, Small S, Robertson JD, Higgins BJ, Taylor S, Ricci DR. Long-term stability of a coronary stent coating post-implantation. J Biomed Mat Res 2002;63(6):699-705.

Lewis AL, Vick TA, Collias ACM, Hughes LG, Palmer RR, Leppard SW, Furze JD, Taylor AS, Stratford PW. Phosphorylcholine-based polymer coatings for stent drug delivery. J Mat Science (Materials in medicine) 2001;12:865-870.

Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. Int J Cardiol 1997;62(suppl 2):S23-S29.

Lijnen P, Echevaria-Vazquez D, Petrov V. Influence of cholesterol-lowering on plasma membrane lipids and function. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1996;18:123-136.

Liu MW, Roubin GS, King SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. Circulation 1989;79:1374-1387.

Losordo DW, Isner JM, Diaz-Sandoval LJ. Endothelial Recovery – The Next Target in Restenosis Prevention. Circulation 2003;107:2635-2637.

Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. Phase I/II Placebo-Controlled, Double-Blind, Dose-Escalating Trial of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factor 2 Gene Transfer by Catheter Delivery in Patients With Chronic Myocardial Ischemia. Circulation 2002;105:2012-2018.

Lowry OH et al.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.

Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptor at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. Mol Cell Biol 1996;16:6917-6925.

Luo Y, Marx S, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks A. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. Mol Cell Biol 1996;16:6744-6751.

Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000;407:233-241.

MacLeod DC, Strauss BH, de Jong M, Escaned J, Umans VA, van Suylen RJ, Verkerk A, de Foyter PJ, Serruys PW. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. J Am Coll Cardiol 1994;23:59-65.

Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, DellÁcqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with EF2 decoy: the PREVENT single-center, randomised, controlled trial. Lancet 1999;354:1493-1498.

Marbán E. Translation, Translation – Circulation Research in Cardiology's New Golden Age. Circ Res 2005;96:4-5.

Marks AR. Sirolimus for the Prevention of In-Stent Restenosis in a Coronary Artery. N Engl J Med 2003;349:1307-1309.

Marx SO and Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. Circulation 2001;104:852-855.

Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995;76:412-417.

Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995;76(3):412-417.

McPherson R, Hanna K, Agro A Braeken A. Cerivastatin versus banded pravastatin in the treatment of primary hypercholesterolemia in primary care practice in Canada: a one-year, open-label, randomized, comparative study of efficacy, safety and cost-effectiveness. Clin Ther 2001;23:1492-1507.

Meijer L and Kim SH. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. Methods Enzymol 1997;283:113-128.

Melillo G, Sausville EA, Cloud K, Lahusen T, Varresio L, Senderowicz A. Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. Cancer Res 1999;59:5433-5437.

Milz S and Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. J Anat 1994;195:103-110.

Mittnacht S. Control of pRB phosphorylation. Curr Opin Genet Dev 1998;8(1):21-27.

Miyauchi K, Aikawa M, Tani T, Nakahara K, Kawai S, Nagai R, Okada R, Yamaguchi H. Effect of probucol on smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation after vascular injury in rabbits: possible role of PDGF. Cardiovasc Drugs Ther 1998;12:251-260.

Miyazawa K, Kikuchi S, Fukuyama J, Hamano S, Ujiie A. Inhibition of PDGF- and TGF-beta 1-induced collagen synthesis, migration and proliferation by tranilast in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Atherosclerosis 1995;118:213-221.

Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. Am J Cardiol 1999;84:462-466.

Morgan D. Principles of Cdk regulation. Nature 1995;374:131-134.

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; for the SIRIUS Investigators. Sirolimus eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. N Engl J Med 2003;349:1315-1323.

Moses JW, Mehran R, Nikolsky E, Lasala JM, Corey W, Albin G, Hirsch C, Leon MB, Russell ME, Ellis SG, Stone GW. Outcomes With the Paclitaxel-Eluting Stent in Patients With Acute Coronary Syndromes. J Am Coll Cardiol 2005;45:1165-1171.

Motwani M, Rizzo C, Sirotnak F, She Y, Schwartz GK. Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells. Mol Cancer Ther 2003;2(6):549-555.

Muck W. Clinical pharmacokinetics of cerivastatin. Clin. Pharmacokinet 2000; 39(2):99-116.

Mudra H, Regar E, Klauss V, Werner F, Henneke KH, Sbarouni E, Theisen K. Serial follow-up after optimized ultrasound-guided deployment of Palmaz-Schatz stents. In-stent neointimal proliferation without significant reference segment response. Circulation 1997;95:363-370.

Muhs A, Heublein B, Schletter J, Herrmann A, Rudiger M, Sturm M, Grust A, Malms J, Schrader J, von der Leyen HE. Preclinical evaluation of inducible nitric oxide synthase lipoplex gene therapy for inhibition of stent-induced vascular neointimal lesion formation. Hum Gene Ther 2003;14:375-383.

Muller-Hulsbeck S, Walluscheck KP, Priebe M, Grimm J, Cremer J, Heller M. Experience on endothelial cell adhesion on vascular stents and stent-grafts: first in vitro results. Invest Radiol 2002;37(6):314-320.

Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest 1987;79:319-326.

Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. Science 2004;303:1800-1805.

Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, Yokoi H, Kim K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. J Am Coll Cardiol 1991;17:433-439.

Ohlstein EH, Douglas SA, Sung CP, Yue T-L, Louden C, Arletz A, Poste G, Ruffolo R, Feuerstein, GZ. Carvedilol, a cardiovascular drug, prevents vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal formation following vascular injury. Proc Natl Acad Sci 1993;90:6189-6193.

Osuga H, Osuga S, Wang F, Fetni R, Hogan MJ, Slack RS, Hakim AM, Ikeda J-E, Park DS. Cyclin-dependent kinases as a therapeutical target for stroke. Proc Natl Acad Sci 2000;97(18):10254-10259.

Packard CJ, Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, McKillop JH, Macfarlane PW, Loriner AR; for the WOSCOPS investigators. Influence of Pravastatin and Plasma Lipids on Clinical Events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). Circulation 1998;97:1440-1445.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science 1995;269(5224):682-685.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. Science 1989;246:603-608.

Parker BW, Kaur G, Nieves-Neira W, Taimi M, Kolhagen G, Shimizu T, Pommier Y, Sausville E, Senderowicz AM. Early induction of Apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. Blood 1998;91:458-465.

Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledg SJ. p53independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. Science 1995;267:1024-1027.

Patel V, Senderowicz AM, Pinto D, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind S. Flavopiridol, a Novel Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas by Inducing Apoptosis. J Clin Invest 1998;102:1674-1681.

Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, Vestweber D, Ley K, Sarembock IJ. Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 2003;107:2244-2249.

Pines J and Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein P60 and behaves differently from cyclin B. Nature 1990;346:760-763.

Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. Cancer Biol 1995;6:63-72.

Plosker GL, Dunn CI, Figgitt DP. Cerivastatin: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of hypercholesterolaemia. Drugs 2000;60:1179-1206.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-cdk inhibitor links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev 1994;8(1):9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 1994;78(1):59-66.

Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Migration. J Clin. Invest 1996;98:2277-2283.

Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. Circulation 1991;84:1426-1436.

Porstmann T, Ternynck, T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods 1985;82(1):169-179.

Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodelling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. Circuation 1994;89:2816-2821.

Puri PL, Maclachlan TK, Levrero M, Giordano A. The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals. (aus: "The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control" edited by G.S. Stein, R. Baserga, A. Giordano and D.T. Denhardt (ISBN 0-471-15706-6, pp.15-79).

Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. Genes Dev 1993;7:1559-1571.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginige/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc Natl Cad Sci1990;87:5193-5197.

Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-Nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1992;107:745-749.

Raju U, Nakata E, Mason KA, Ang KK, Milas L. Flavopiridol, a Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Ovarian Carcinoma Cells. Cancer Res 2003;63(12):3263-3267.

Rectenwald JE, Moldawer LL, Huber TS, Seeger JM, Ozaki K. Direct Evidence for Cytokine Involvement in Neointimal Hyperplasia. Circulation 2000;102:1697-1702.

Reddy GP. Regulation of DNA replication and S phase. Ch. 3 aus "The Molecular Basis of Cell Cycle an Growth Control" (ISBN 0-471-15706-6, pp80-154; 1999)

Reed S. Control of the G1/S transition. Cancer Surv 1997;29:7-23.

Reidy MA and Schwarz SM. Endothelial regeneration III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. Lab Invest 1981;44:301-308.

Rensing BJ, Hermans WR, Deckers JW, de Feyter PJ, Tijssen JG, Serruys PW. Lumen narrowing after percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty follows a near gaussian distribution: a quantitative angiographic study in 1,445 successfully dilated lesions. J Am Coll Cardiol 1992;19:939-945.

Rensing, BJ, Hermans WR, Strauss BH, Serruys PW. Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study. J Am Coll Cardiol 1991;17:34B-38B.

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of G1/S phase transition by expression of cyclin D1 and E with an inducible system. Mol Cell Biol 1994;14:1669-1679.

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. N Engl J Med 2001;344:1959-1965.

Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 2001;154:87-96.

Rodes J, Cote G, Lesperance J, Bourassa MG, Doucet S, Bilodeau L, Bertrand OF, Harel F, Gallo R, Tardif JC. Prevention of restenosis after angioplasty in small coronary arteries with probucol. Circulation 1998;97:429-436. **Roque** M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman, MB, Fallon JT, Fuster V, Badimon JJ. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. Lab Invest 2001;81:895-903.

Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. N Engl J Med 1999;340(2):115-126.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801-809.

Ruef J, Meshel AS, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Thompson LJ, Subbarao VD, Dumont JA, Patterson C. Flavopiridol Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation In Vitro and Neointimal Formation In Vivo After Carotid Injury in the Rat. Circulation 1999;100:659-665.

Ruiz-Nodar JM, Frutos A, Carrillo P, Morillas P, Valero R, Rodriguez JA, Gallego J, Valls A, Bertomeu V. Use of sirolimus-eluting stents in complex lesions: clinical and angiographic follow-up. Rev Esp Cardiol. 2004;57(2):123-129.

Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1cyclin-dependentkinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk complex. Nature 1996;382(6589):325-331.

Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun C-C, Davis BR, Braunwald E; for the Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarcation in patients with average cholesterol levels: Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med 1996;335:1001-1009.

Sakai M, Kobori S, Matsumura T, Biwa T, Sato Y, Takemura T, Hakamata H, Horiuchi S, Shichiri M. HMG-CoA reductase inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. Atherosclerosis 1997;133:51-59.

Sakharov DV, Kalachev LV, Rijken DC. Numerical simulation of local pharmacokinetics of a drug after intravascular delivery with an eluting stent. J Drug Target 2002;10(6):507-513.

Sata M, Tanaka K, Ishizaka N, Hirata Y, Nagai R. Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1548-1552.

Schatz RA, Palmaz JC, Tio FO, Garcia F, Garcia O, Reuter SR. Balloon-expandable intracoronary stents in the adult dog. Circulation 1987;76(2):450-457.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 1979;277(5698):665-667.

Schneider DB and Dichek DA. Intravascular stent endothelialization: a goal worth pursuing? Circulation 1997;95:308-310.

Schömig A, Mehilli J, Holle H, Hösl K, Kastrati D, Pache J, Seyfarth M, Neumann F-J, Dirschinger J, Kastrati A. Statin Treatment Following Coronary Artery Stenting and One-Year Survival. J Am Coll Cardiol 2002;43(5):854-861.

Schwartz GG, Olsson AG, Esekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Charitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. JAMA 2001;285:1711-1718.

Schwartz RS and Edelman ER. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies – Recommended Evaluation From a Consensus Group. Circulation 2002;106:1867-1873.

Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. Drugs 2000;59:435-476.

Sedlacek HH. Mechanisms of action of flavopiridol. Crit Rev Oncol Hematol 2001;38:139-170.

Senderowicz AM and Sausville EA. Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators. J Nat Cancer Inst 2000;92(5):376-387.

Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Meterne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van den Heuvel P, Delcan J, Morel M-A. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. N Engl J Med 1994;331:489-495.

Shapiro GI, Supko JG, Patterson A, Lynch C, Lucca J, Zacarola PF, Muzikansky A, Wright JJ, Lynch TJ, Rollins B. A Phase II Trial of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2001;7:1590-1599.

Shapiro GI. Preclinical and Clinical Development of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol. Clin Cancer Res 2004;10:4270s-4275s.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med 1995;333:1301-1307.

Sherr CJ and Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 1995;9:1149-1163.

Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. Cell 1994;79:551-555.

Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. Cell 1993;73(6):1059-1065.

Sherr CJ. The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. Cancer Res 2000;60:3689-3695.

Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, Imaizumi T. Role of Rho-Associated Kinase in Neointima Formation After Vascular Injury. Circulation 2001;103:284-289.

Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. Cell 1995;82:621-630.

Siegel-Axel DI. Cerivastatin: a cellular and molecular drug for the future? Cell Mol Life Sci 2003;60:144-164.

Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. N Engl J Med 1987; 316(12):701-706.

Skowasch D, Jabs A, Andrié R, Dinkelbach S, Schiele TM, Wernert N, Lüderitz B, Bauriedel G. Pathogen Burden, Inflammation, Proliferation and Apoptosis in Human In-Stent Restenosis. J Vasc Res 2004;41:525-534.

Smith SC, Dove JT, Jacobs AK, Kennedy JW, Kereiakes D, Kern MJ, Kuntz RE, Popma JJ, Schaff HV, Williams DO. ACC/AHA Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention (Revision of the 1993 PTCA Guidelines); J Am Coll Cardiol 2001;37:22389-lxvi.

Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R. HMG-CoA reductase inhibitors: in vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1993;13:571-578.

Sonoda S, Honda Y, Kataoka T, Bonneau HN, Sudhir K, Yock PG, Mintz GS, Fitzgerald PJ. Taxol-based Eluting Stents From Theory to Human Validation: Clinical and Intravascular Ultrasound Observations. J Invasive Cardiol 2003;15(3):109-114.

Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IMF, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. Circulation 2001;103:192-195.

Speidel CM, Eisenberg PR, Ruf W, Edgington TS, Abendschein DR. Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits. Circulation 1995;92:3323-3330.
Sposito AC and Chapman MJ. Statin Therapy in Acute Coronary Syndromes – Mechanistic Insight Into Clinical Benefit. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:1524-1534.

Sriram V and Patterson C. Cell cycle in vasculoproliferative diseases: potential interventions and routes of delivery. Circulation 2001;103:2414-2419.

Stein E. Cerivastatin in primary hyperlipidemia – a multicenter analysis of efficacy and safety. Atherosclerosis 1998;139(Suppl 1):S15-S22.

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; for the TAXUS-IV Investigators. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 2004;350:221-231.

Stone GW, Ellis SG, O'Shaughnessy CD, Martin SL, Satler L, McGarry T, Turco MA, Kereiakes DJ, Kelley L, Popma JJ, Russell ME; TAXUS V ISR Investigators. Paclitaxel-eluting stents vs vascular brachytherapy for instent restenosis within bare-metal stents: the TAXUS V ISR randomized trial. JAMA. 2006;295(11):1253-1263. **Strauer** BE. Klinische Kardiologie, 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 1999; 357-471.

Strausfeld UP, Howell M, Descombes P, Chavalier S, Rempel RE, Adamczewski J, Maller JL, Hunt T, Blow JJ. Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in Xenopus egg extracts. J Cell Sci 1996;109:1555-1563.

Sun J, Marx SO, Chen H-J, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27Kip1 in vascular smooth muscle cell migration. Circulation 2001;103:2967-2972.

Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz B, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao, PS, Falotico R, Carter A. Stent-Based Delivery of Sirolimus Reduces Neointimal Formation in a Porcine Coronary Model. Circulation 2001;104:1188-1193.

Takada Y and Aggarwal BB. Flavopiridol Inhibits NF-κB Activation Induced by Various Carcinogens and Inflammatory Agents through Inhibition of IκBα Kinase and p65 Phosphorylation: Abrogation of Cyclin D1, Cyclooxygenase-2, and Matrix Metalloprotease-9. J Biol Chem 2004;279(6):4750-4759.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-Binding Proteins. Physiol Rev 2001;81(1):135-208.

Takemoto M and Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1712-1719.

Tan LP, Venkatraman SS, Sung PF, Wang XT. Effect of plasticization on heparin release from biodegradable matrices. Int J Pharm 2004;283:89-96.

Tanabe K, Serruys PW, Grube E, Smits PC, Selbach G, van der Giessen WJ, Staberock M, de Feyter P, Muller R, Regar E, Degertekin M, Ligthart JM, Bisco C, Backx B, Russel ME. TAXUS III Trial: in-stent restenosis treated with stent-based delivery of paclitaxel incorporated in a slow-release polymer formulation. Circulation 2003;107(4):559-564.

Tanner FC, Boehm M, Akyürek LM, San H, Yang Z-Y, Tashiro J, Nabel GJ, Nabel EG. Differential Effects of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p27Kip1, p21Cip1, and p16Ink4 on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. Circulation 2000;101:2022-2025.

Tanner FC, Yang Z-Y, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Vascular Disease. Circ Res 1998;82:396-403.

Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J, Nigg EA. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). J Cell Biol 1994;127:456-478.

Teirstein PS. Living the Dream of No Restenosis. Circulatin 2001;104:1996-1998.

The Lovastatin Study Group II; therapeutic response to lovastatin (mevinolin) in nonfamilial hypercholesterolemia: a multicenter study. JAMA 1996;256:2829-2834.

Topol EJ and Serruys PW. Frontiers in interventional cardiology. Circulation 1998;98:1802-1820.

Toschi L and Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. J Cell Biol 1988;107:1623-1628.

Toyoshima H and Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin/cdk protein kinase activity is related to p21. Cell 1994;78:67-74.

Vaughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2000;35:1-10.

Veillard NR and Mach F. Statins: the new aspirin? Cell Mol Life Sci 2002;59(11):1771-1786.

Virmani R and Farb A. Pathology of in-stent restenosis. Curr Opin Lipidol 1999;10:499-506.

Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? Heart 2003;89:133-138.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature 2000;408:307-310.

Waga SG, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature 1994;369:574-578.

Walter DH. Insights into early and rapid effects of statin therapy after coronary interventions. Curr Pharm Des 2004;10(4):369-373.

Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Am Heart J 1996;132:23-29.

Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andrés V. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. Circ Res 1997;80:418-426.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995;81(3):323-330.

Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB 3rd, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ, et al. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin Restenosis Trial Study Group. N Engl J Med 1994;331(20):1331-1337.

Wessely R, Hengst L, Jaschke B, Wegener F, Richter T, Lupetti R, Paschalidis M, Schömig A, Brandl R, Neumann F-J. A central role of interferon regulatory factor-1 for the limitation of neointimal hyperplasia. Hum Mol Gen 2003;12(2):177-187.

Wieneke H, Sawitowski T, Wendt S, Fischer A, Dirsch O, Karoussos IA, Erbel R. Stent coating: a new approach in interventional cardiology. Herz 2002;27(6):518-526.

Work LM, McPhaden AR, Pyne NJ, Pyne S, Wadsworth RM, Wainwright CL. Short-Tern Local Delivery of an Inhibitor of Ras Farnesyltransferase Prevents Neointima Formation In Vivo After Porcine Coronary Balloon Angioplasty. Circulation 2001;104:1538-1543.

Xaubet A, Moises JA, Agusti C, Martos JA, Picado C. Identification of mast cells in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison between different fixation and staining methods. Allergy 1991;46(3):222-227.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 1993;366(6456):701-704.

Yoon J, Wu CJ, Homme J, Tuch RJ, Wolff, RG, Topol EJ, Lincoff AM. Local Delivery of Nitric Oxide from an Eluting Stent to Inhibit Neointimal Thickening in a Porcine Coronary Injury Model. Yonsei Medical J 2002;43(2):242-251.

Yu MY, Gao RL, Jiang J, Cheng SJ, Yuan JQ, Wang CN, Zheng JG, Meng L, Zi ZJ. Pharmacokinetics of rapamycin-eluting stents in miniswine coronary model. Chin Med J 2004;117(10):1459-1463.

Zhai S, Sausville E, Figg WD. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet detection for the quantitation of flavopiridol from human plasma. Biomed Chromatogr 2002;16:379-382.

Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. Genes Dev 1994;8:1750-1758.

Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. Mol Cell Biol 1993;4:897-906.

Zimarino M, Renda G, De Caterina R. Optimal Duration of Antiplatelet Therapy in Recipients of Coronary Drug-Eluting Stents. Drugs 2005;65(6):725-732.

8 TABELLENVERZEICHNIS

- **Tab. 1.1:**Ausgewählte Cycline und CDK's und ihre Funktion [verändert nach PURI et
al., 1999]
- Tab. 1.2:Flavopiridol: IC50-Werte für verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe und andere
Kinasen [verändert nach SEDLACEK, 2001]
- Tab. 2.1:Primäre Antikörper (Western Blot)
- **Tab. 2.2:**Sekundäre Antikörper (Western Blot)
- Tab. 3.1:Quantitative Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen (24 Stunden
Flavopiridol-Inkubation)
- Tab. 3.2:
 Flavopiridol-Konzentrationen in Stent-Überständen
- **Tab. 3.3:** Cerivastatin-Konzentrationen in Stent-Überständen (Verdünnung 1:10)

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung atherosklerotischer Läsionen [DZAU et al., 2002]
- **Abb. 1.2:** Immunhistologisches Präparat einer nativen Koronararterie [A] im Vergleich zu einem atherosklerotischen Gefäß [B]. [aus: www.med.utah.edu]
- **Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Cholesterin-Biosynthese [verändert nach TAKEMOTO und LIAO, 2001]; PP = Pyrophosphat
- Abb. 1.4: Vorgehensweise und Ziele der Dissertation
- Abb. 2.1: Flavopiridol
- Abb. 2.2: Cerivastatin
- Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Boyden-Kammer
- Abb. 2.4: BiodivYsio[™]-Matrix DD (= Drug Delivery) Stent. [A] Schematische Darstellung einer Stent-Strebe im Querschnitt; [B] Aufnahme eines BiodivYsio[™]-Stents vor Inflation. PC = Phosphorylcholin
- Abb. 2.5: Schematische Darstellung des gestenteten Gefäßbereiches (Carotis-Verletzungsmodell der Ratte)
- Abb. 3.1: Proliferationsinhibierende Wirkung verschiedener Flavopiridol-Konzentrationen (Zellzählung); Vergrößerung: 100x
- Abb. 3.2:CASMC-Morphologie nach 72 Stunden Inkubation mit Flavopiridol (0, 10, 50,
75, 100 nM) im Vergleich zu quieszenten Kontrollzellen; Vergrößerung: 200x
- **Abb. 3.3:** BrdU-Inkorporation unter dem Einfluss verschiedener Flavopiridol-Konzentrationen; prolif. = proliferierend, quiesz. = quieszent
- **Abb. 3.4:** FACS-Analyse der Zellzyklusdistribution unter der Wirkung von 0, 100 und 500 nM Flavopiridol im Vergleich zu quieszenten Kontrollzellen: roter Peak links = G_0/G_1 -Phase, blauer Bereich = S-Phase, roter Peak rechts = G_2/M -Phase
- Abb. 3.5: Quantitative Auswertung des S-Phase-Anteils in CASMC nach 24 Stunden Flavopiridol-Inkubation
- Abb. 3.6: Quantitative Auswertung der Migration nach 18 Stunden Inkubation: [A] Zellzählung (n = 4 Zufallsansichten; Vergrößerung: 100x); [B] Fotometrische Messung nach Entfärben der migrierten Zellen (A₅₅₀); [C] gefärbte migrierte CASMC auf der Membranunterseite (200x)
- Abb. 3.7: Keine toxische Wirkung von Flavopiridol auf CASMC und CAEC nach 48 Stunden Inkubation (LDH-Assay)

- **Abb. 3.8:** Keine signifikante Apoptose-Induktion durch Flavopiridol in CASMC und CAEC nach 48 Stunden Inkubation (ssDNA-Apoptose-ELISA)
- **Abb. 3.9:** pRb(Thr821)-Konzentration in % der Kontrolle (unbehandelte CASMC) nach 24 Stunden Flavopiridol-Inkubation
- **Abb. 3.10:** Cyclin-Konzentrationen in Flavopiridol-behandelten CASMC (100 nM): [A] Cyclin A₁/A₂; [B] Cyclin D₁
- **Abb. 3.11:** Zeitabhängige CKI-Induktion durch Flavopiridol (100 nM): [A] p21^{cip1}; [B] p27^{kip1}
- Abb. 3.12: Konzentrationen des Tumorsuppressorproteins p53 [A] und seines wichtigsten Inhibitors MDM2 [B] unter dem Einfluss von 100 nM Flavopiridol
- Abb. 3.13: Quantifizierung der proliferationsinhibierenden Wirkung verschiedener Cerivastatin-Konzentrationen mittels Zellzählung: CASMC versus CAEC
- Abb. 3.14: BrdU-Inkorporations-ELISA: CASMC versus CAEC
- Abb. 3.15: Quantitative Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen nach 24 Stunden Cerivastatin-Inkubation: CASMC [A] versus CAEC [B] (FACS-Analyse nach PI-Färbung der Zellkerne)
- Abb. 3.16: Aufhebung der proliferationsinhibierenden Cerivastatin-Wirkung in CASMC durch GGPP, nicht durch FPP nach 24 Stunden; GGPP (= Geranylgeranyl-Pyrophosphat), FPP (= Farnesyl-Pyrophosphat); roter Peak links = G_0/G_1 -Phase, blauer Bereich = S-Phase, roter Peak rechts = G_2/M -Phase; untere Reihe: Quantifizierung der einzelnen Phasen: links: G_0/G_1 -, Mitte: S-, rechts: G_2/M -Phase
- **Abb. 3.17:** Quantitative Auswertung der Migration nach 18 Stunden Inkubation, CASMC versus CAEC: Zellzählung (n = 4 Zufallsansichten, Vergrößerung: 100x)
- **Abb. 3.18:** Keine toxische Wirkung von Cerivastatin auf CASMC [A] und CAEC [B] nach 48 Stunden Inkubation (LDH-Assay)
- Abb. 3.19: Keine signifikante Apoptose-Induktion durch Cerivastatin in CASMC [A] und CAEC [B] nach 48 Stunden Inkubation (ssDNA-Apoptose-ELISA)
- Abb. 3.20: Analyse der Expression des Proliferationsmarkers PCNA in CASMC [A] versus CAEC [B] im zeitlichen Verlauf unter der Wirkung von 50 nM Cerivastatin; [C] Quantitative Auswertung nach densitometrischer Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse
- Abb. 3.21: pRb(Thr821)-Konzentration in CASMC versus CAEC nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Cerivastatin-Konzentrationen
- **Abb. 3.22:** Cyclin-Konzentrationen in Cerivastatin-behandelten CASMC (50 nM): [A] Cyclin A₁/A₂; [B] Cyclin D₁; [C] Cyclin E

- **Abb. 3.23:** Zeitabhängige Induktion von Zellzyklusinhibitoren durch Cerivastatin (50 nM): [A] IRF-1; [B] p21^{cip1}; [C] p27^{kip1}
- **Abb. 3.24**: Kinetik der Freisetzung von Flavopiridol aus der Matrix des BiodivYsio[™] Stent-Systems (HPLC-Konzentrationsbestimmung)
- Abb. 3.25: Kumulative Freisetzungskinetik von Cerivastatin aus der Matrix des BiodivYsio[™] Stent-Systems (HPLC-Konzentrationsbestimmung)
- Abb. 3.26: Biologische Wirkung Flavopiridol-haltiger Stent-Überstände auf CASMC (BrdU-Inkorporations-ELISA)
- Abb. 3.27: Biologische Wirkung Cerivastatin-haltiger Stent-Überstände (Verdünnung 1:10) auf CASMC (BrdU-Inkorporations-ELISA)
- Abb. 3.28: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte); Vergrößerung: 50x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Flavopiridolbeschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent (Konzentration der Beschichtungslösung: 25 mg/ml)
- **Abb. 3.29:** Quantitative Auswertung der neointimalen Fläche (Tag 14 *post operationem*). ** P<0,01
- Abb. 3.30: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte); Vergrößerung: 50x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatinbeschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent (Konzentration der Beschichtungslösung: 5 mg/ml)
- **Abb. 3.31:** Quantitative Auswertung der neointimalen Fläche (Tag 14 *post operationem*). * P<0,05
- Abb. 3.32: Histologische Schnitte eingebetteter Stents 14 Tage nach Implantation (Ratte). Vergrößerung: 200x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatinbeschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent
- Abb. 3.33: Immunhistochemisch gefärbte Schnitte Strut-assoziierter Gewebebereiche aus gestenteten Gefäßen 14 Tage nach Implantation (Ratte). Vergrößerung: 200x. [A] unbeschichteter Kontroll-Stent; [B] Cerivastatin-beschichteter BiodivYsio[™]-Matrix DD Stent
- **Abb. 3.34:** Quantitative Auswertung der Reendothelialisierung im Stent-Bereich (n = 3 Stents/Gruppe; n = 3 Schnitte/Stent) über die Einteilung in Kategorien (I-III) nach CARTER.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria		
Abb.	Abbildung		
ABTS	2,2'-AZINO-bis-[3-ethylbenziazolin-6-Sulfonsäure]		
ACC	Arteria Carotis Communis		
ACE	Arteria Carotis Externa		
ACI	Arteria Carotis Interna		
AEBSF	Serin-Protease-Inhibitor		
atm	Atmosphären Überdruck		
ATP	Adenosin-Triphosphat		
BC3H1	Ranamycin-resistente Mauszellen		
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor		
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin		
BSA	Bovines Serum-Albumin		
bow	beziehungsweise		
	circa		
	Coronary Artery Endothelial Cells (= koronare arterielle Endothelzellen)		
CASMC	Coronary Artery Smooth Musele Cells (= koronare arterielle glette Muskelzellen)		
CASINIC	Cuolin Denendent Vinesse (= Cuolin albängige Vinese)		
CDK	CDV interrecting unstain		
cip	CDK-Interacting protein		
d.n.	das neisst		
DC	Detergent Compatible (= kompatibel mit Detergenzien)		
DD	Drug Delivery (= Wirkstoff-freisetzend)		
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser		
DES	Drug Eluting Stent (= Wirkstoff-freisetzendes Stent-System)		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribo-Nucleic Acid (= Desoxyribonukleinsäure)		
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol		
E2F-1	Transkriptionsfaktor		
E-64	Cystein-Protease-Inhibitor		
EBM-2 [®]	Endothelial cell Basal Medium (= Basalmedium für CAEC)		
ECL	Enhanced Chemoluminescent Detection (= Detektionsreagenz für Western Blot)		
ECM	Extra Cellular Matrix (= extrazelluläre Matrix)		
ED_{75}	75% der effizienten Dosis (therapeutische Breite)		
EGM-2®	supplementierende Wachstumsfaktoren für CAEC-Medium		
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay		
eNOS	NOS-2 (= endotheliale NO-Synthase)		
ERK-1	Extracellular Regulated Kinase 1 (= extrazellulär regulierte Kinase 1)		
etc.	et cetera		
evt.	eventuell		
f.c.	Final Concentration (= finale Konzentration)		
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter		
FCS	Fetal Calf Serum (= fötales Kälberserum)		
FKBP12	FK 506 Binding Protein		
FL2	Fluoreszenz 2 (= Propidium-Iodid-Kanal FACS)		
FN	Fibronektin		
FPP	Farnesyl-Pyronhosphat		
FPTIII	Farnesyltransferase-Inhibitor		
aaf	gegehenenfalls		
551.	5-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2-2		

GGPP	Geranylgeranyl-Pyrophosphat			
gr.	griechisch			
HBSS	Hepes Buffered Saline Solution (= Hepes-gepufferte Saline-Lösung)			
hEGF	human Endothelial Growth Factor (= humaner endothelialer Wachstumsfaktor)			
hFGF-B	human Fibroblast Growth Factor B (= humaner Wachstumsfaktor für Fibroblaseten)			
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-Methyl-Glutaryl-CoA			
HPLC	High Performance Liquid Chromatography			
HRP	HorseRadish Peroxidase (= Meerrettich-Peroxidase)			
hs-CRP	high sensitive C-Reactive Protein (= Marker systemischer Inflammation)			
HUVEC	human Umbilical Vein Endothelial Cells (= venöse Endothlzellen der Nabelschnur)			
HWZ	Halbwertszeit			
IC ₅₀	Konzentration mit halbmaximaler Proliferationsinhibition			
i.d.R.	in der Regel			
IVUS	intravaskulärer Ultraschall			
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid			
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1 (= Interferon regulierender Faktor 1)			
ISR	In-Stent Restenose			
kD	Kilodalton			
КНК	Koronare Herzerkrankung (Koronare Herzkrankeit)			
kip	kinase interacting protein			
LD_{25}	25% der letalen Dosis (therapeutische Breite)			
LDH	Lactat-Dehydrogenase			
LDL	Low Density Lipoprotein			
MAP-Kinase	Mitogen Activated Kinase			
MCF-7	Brustkrebs-Zelllinie			
MDM2	Inhibitor des Tumorsuppressorproteins p53			
MMA	Methylmetacrylat			
MSDS	Material Safety Data Sheet (= Sicherheitsdatenblatt)			
MTD	maximal tolerierte Dosis			
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid			
NO	Stickstoffmonoxid			
NOS	NO-Synthase			
NP-40	Nonidet [®] P-40 (= Detergens)			
n.s.	nicht signifikant			
O_2 .	Superoxid-Anion (Radikal)			
p70 ^{S6K}	p70 S6-Proteinkinase			
PBS	Phosphate Buffered Saline (= phosphatgepufferte Saline)			
PC	Phosphorylcholin			
PCI	Percutaneous Coronary Intervention (= perkutane koronare Intervention)			
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (= Proliferationsmarker)			
PDGF	Platelet Derived Growth Factor			
PEST	Prolin-(P), Glutaminsäure-(E), Serin-(S) und Threonin-(T)-reiche Region			
PFM-P75	Fluoriertes Polymetacrylat			
PI	Propidium-Iodid			
РКС	Proteinkinase C			
pRb(Thr821)	am Threoninrest 821 phosphoryliertes Retinoblastoma-Protein			
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (= perkutane transluminale Katheter-			
	Angioplastie)			
PU	Polyurethan			
R°-IGF	modifizierter Insulin-like Growth Factor (= endothelialer Wachstumsfaktor)			
Rb	Retinoblastoma-Genprodukt			
RNA	RiboNucleic Acid (= Ribonukleinsäure)			

Rounds Per Minute (= Zentrifugen-Geschwindigkeit)		
Raumtemperatur		
siehe		
siehe oben		
an HPP gekoppeltes Streptavidin		
Sodium Dodecyl Sulfate (= Na-Dodecylsulfat)		
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
Smooth muscle cell Basal Medium (= Medium für CASMC)		
supplementierende Wachstumsfaktoren für CASMC-Medium		
Sterol Regulatory Element-Binding Protein		
single strand DNA (= einzelsträngige DNA)		
hämatopoetische Zelllinie (B-Zell-Lymphom)		
Tris Buffered Saline (= Tris-gepufferte Saline)		
Transforming Growth Factor β		
Transkription		
Tetramethylbenzidin		
Trypsin Neutralizing Solution (= Lösung zur Neutralisierung der Trypsinwirkung)		
Target Of Rapamycin		
unter anderem		
Units pro Milliliter (Enzymeinheiten)		
7-Hydroxy-Staurosporin (synthetischer CDK-Inhibitor)		
Volt		
vor allem		
Volumenprozent		
Gewichtsprozent		
Vascular Endothelial Growth Factor (= Wachstumsfaktor für Gefäß-Endothelzellen)		
Vascular Smooth Muscle Cells (= glatte Gefäßmuskelzellen)		
zum Beispiel		
zum Teil		

11 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. Adelbert Bacher danke ich sehr für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Professor Dr. Albert Schömig bin ich sehr dankbar für die Übertragung der verantwortungsvollen Aufgabe und die generöse Unterstützung meiner Arbeit im Deutschen Herzzentrum München.

Herrn PD Dr. Rainer Wessely danke ich für die ideenreiche Anleitung zu selbständiger wissenschaftlicher Arbeit und ganz besonders für die persönliche Unterstützung bei der Erarbeitung von Vorträgen und Publikationen.

Ein herzliches Dankeschön an PD Dr. Michael Vogeser für die angenehme Zusammenarbeit und die Durchführung aller HPLC-analytischen Untersuchungen am Institut für Klinische Chemie, Großhadern. Ebenso bedanke ich mich bei PD Dr. Stefan Milz für die fachkundige Beurteilung der histologischen Präparate für morphometrische Untersuchungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Cornelia Michaelis und Dr. Franziska Wegener für die Durchführung aller Operationen und Ermittlung der tierexperimentellen Daten.

Sabine Merl und Isa Seitz danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, wo ich in allen Situationen ein offenes Ohr gefunden habe.

Allen lieben Kollegen und Kolleginnen in der Experimentellen Abteilung des Herzzentrums gilt mein Dank – Ihr habt mir die Arbeit versüßt und seid mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Gabi Römer für die nicht nur am Anfang meiner Laborkarriere so nützlichen Ratschläge in allen Situationen und Lebenslagen, sowie Sandra Kerstan, ohne die ein so effizientes Arbeiten in diesem Labor nicht möglich gewesen wäre. Danke an Howard Shore und J.R.R. Tolkien für die musikalische Untermalung unzähliger Stunden des Schreibens.

Marc, vielen Dank für alles – ich bin glücklich, mit Deiner liebevollen Unterstützung und Deinem grenzenlosen Verständnis so viel erreicht zu haben!

12 LEBENSLAUF

Name	Birgit Blaich, geb. Ja	Birgit Blaich, geb. Jaschke		
Geburtsdatum	03.08.1970	03.08.1970		
Geburtsort	Stuttgart	Stuttgart		
Staatsangehörigkeit	deutsch	deutsch		
Familienstand	verheiratet	verheiratet		
Schulausbildung	Friedrich-Schiller-Gy	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Fellbach; Abitur 1990		
Studium	Universität Hohenhei	Universität Hohenheim: Biologie/Diplom (1990 – 2000)		
Studienschwerpunkte	Hauptfach:	Mikrobiologie		
	1. Nebenfach:	Genetik		
	2. Nebenfach:	Biochemie		
	3. Nebenfach:	Organische Chemie		
Diplomarbeit	DAIMLERCHRYSLER AG, Werk Sindelfingen			
	"Die Leistungsfähigkeit biologischer Reinigungsanlagen bei der Behandlung von			
	reislaufwasser aus der Lackierung – Bewertung langjähriger Messungen und eigene ntersuchungen"			
Promotion	Deutsches Herzzentrum München/TU München (2001-2006)			
	"Charakterisierung der Wirksamkeit und der molekularen Wirkmechanismen zellzyklusinhibierender Therapiestrategien zur Prävention der Neointimahyperplasie nach vaskulärer Stentimplantation"			
Vorträge	68. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 2002:			
	"Lokale Zellzyklusinhibition zur therapeutischen Prävention der Neointimahyper-			
	plasie: Charakterisierung des synthetischen CDK-Antagonisten Flavopiridol"			
	[B. Jaschke, F. Wegener, R. Wessely]			
	69. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 2003:			
	"Signifikante Reduktion der Neointimahyperplasie durch Cerivastatin beschichtete			
	Stents" [B. Jaschke, S. Milz, F. Wegener, R. Wessely]			
	71. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 2005:			
	"Sirolimus inhibiert die Cytomegalievirus-induzierte S-Phase-Progression quieszenter			
	koronarer glatter Muskelzellen und hemmt die Virusreplikation: Therapeutische			
	Implikationen für vaskuloproliferative Erkrankungen'' [B. Jaschke, L. Hengst, R Wesselv]			
	1x. w coociy]			

Publikationen Hum Mol Genet, 2003;12(2):177-187.

"A central role of interferon regulatory factor-1 for the limitation of neointimal hyperplasia" [R. Wessely, L. Hengst, B. Jaschke, F. Wegener, T. Richter, R. Lupetti, M. Paschalidis, A. Schömig, R. Brandl, F.-J. Neumann]

FASEB J, 2004;18(11):1285-1287.

"Local cyclin-dependent kinase inhibition by flavopiridol inhibits coronary artery smooth muscle cell proliferation and migration: Implications for the applicability on drug eluting stents to prevent neointima formation following vascular injury" [B. Jaschke, S. Milz, M. Vogeser, C. Michaelis, M. Vorpahl, A. Schömig, A. Kastrati, R. Wessely]

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005;25(4):748-753.

"Inhibition of Neointima Formation by a Novel Drug-Eluting Stent System That Allows for Dose-Adjustable, Multiple, and On-Site Stent Coating" [R. Wessely, J. Hausleiter, C. Michaelis, B. Jaschke, M. Vogeser, S. Milz, B. Behnisch, T. Schratzenstaller, M. Renke-Gluszko, M. Stöver, E. Wintermantel, A. Kastrati, A. Schömig]

Circulation, 2005;111(13):1583-1592.

"Targeting 2A proteases by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice" [S. Merl, C. Michaelis, B. Jaschke, M. Vorpahl, S. Seidl, R. Wessely]

Cardiovasc Research, 2005;68:483-492.

"Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug eluting stent platform" [B. Jaschke, C. Michaelis, S. Milz, M. Vogeser, T. Mund, L. Hengst, A. Kastrati, A. Schömig, R. Wessely]

Circulation, 2006;113(2):273-279.

"Randomized trial of a nonpolymer-based rapamycin-eluting stent versus a polymerbased paclitaxel-eluting stent for the reduction of late lumen loss" [J. Mehilli, A. Kastrati, R. Wessely, A. Dibra, J. Hausleiter, B. Jaschke, J. Dirschinger, A. Schömig; Intracoronary Stenting and Angiographic Restenosis – Test Equivalence Between 2 Drug-Eluting Stents (ISAR-TEST) Trial Investigators]