

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Hemmung der Induktion neointimaler Proliferation durch adenoviralen
Gentransfer von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten im Karotis-
Verletzungs-Modell der Ratte**

Christine Nina Berger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
(schriftliche Beurteilung)
1. Priv.-Doz. Dr. I. Ott (mündliche Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 10.12.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2004
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
I. Einleitung.....	1
A. Interleukin-1	2
a. Interleukin-1 α	2
b. Interleukin-1 β	2
c. Interleukin-1 Rezeptoren.....	3
B. Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist	4
a. Struktur und Produktion.....	4
b. Biologie des IL-1ra	5
C. Restenose in der interventionellen Kardiologie.....	6
II. Fragestellung.....	9
III. Methoden	10
A. Vektorenkonstrukte.....	10
B. Tiermodell.....	10
c. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	10
d. Das Rattenkarotisverletzungsmodell mit adenoviralem Gentransfer	11
e. Das Rattenkarotisverletzungsmodell ohne Gentransfer als Negativkontrolle	
12	
f. Das Rattenkarotisverletzungsmodell mit intravenöser Injektion von	
rekombinantem IL-1ra.....	13
g. Postoperative Behandlung.....	13
h. Opferung der Tiere und Perfusionsfixation	13
C. Präparation der Gefäße und Schnitte.....	14
D. Morphometrie.....	14
E. Statistische Auswertung	17
F. Histopathologische Beurteilung.....	17
IV. Ergebnisse	18
A. Gefäßwand nach Induktion der neointimalen Proliferation nach Überexpression	
von IL-1ra in der Gefäßwand	18

a.	Ergebnisse in der NaCl-Kontrollgruppe und der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.....	18
b.	Ergebnisse der Ad-IL1ra-Verumgruppe und der GFP-Kontrollgruppe.....	23
B.	Intravenöse Gabe von rekombinantem IL-1ra.....	31
V.	Diskussion.....	34
A.	Hemmt die lokale Überexpression von IL-1ra in der Gefäßwand die Induktion neointimaler Proliferation nach Angioplastie?.....	34
B.	Führt das Adenovirus selbst zu einer Entzündungsreaktion?.....	35
C.	Ist die lokal erreichte IL-1ra-Konzentration ausreichend?	37
D.	Wird die neointimale Proliferation durch die intravenöse Applikation von rekombinantem sIL-1ra nach Angioplastie gehemmt?.....	39
VI.	Zusammenfassung	41
VII.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	43
VIII.	Literaturverzeichnis.....	45
IX.	Lebenslauf.....	55
	Danksagung.....	57

Abkürzungsverzeichnis

AAV-GFP	Adenoassoziiertes virales Konstrukt, exprimiert GFP
AAV-LacZ	Adenoassoziiertes virales Konstrukt, exprimiert LacZ
Ad-GFP	Adenovirales Konstrukt, exprimiert GFP
Ad-GFP-IL1ra	Adenovirales Konstrukt, exprimiert GFP und IL-1ra
Ad-IL1ra	Adenovirales Konstrukt, exprimiert IL-1ra
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
cDNA	Zirkuläre DNA
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
HE	Hematoxylin Eosin
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IGF	Insulin-like Growth Factor (IGF-1 und IGF-2)
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 alpha
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IL-1RN*2	Allel 2 des Gens Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
LPS	Lipopolysaccharid
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
NaCl	Natrium-Chlorid
NGF	Nerve Growth Factor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PFU	Plaque Forming Unit
pSMC	Glatte Muskelzellen des Schweins
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angiographie

rhn-IL1ra	Rekombinanter humaner Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
sIL-1ra	Löslicher Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
TGF	Transforming Growth Factor (TGF- α und TGF- β)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VSMC	Glatte Muskelzellen der Gefäße

I. Einleitung

Die Artherosklerose ist eine der Krankheiten der Wohlstandsgesellschaft, die am meisten Opfer fordert. Sie ist nicht nur häufig Ursache für verschiedene Krankheitsbilder in der westlichen Welt, sondern stellt auch für das öffentliche Gesundheitssystem eine große finanzielle Belastung dar^{19, 39}.

Zur Therapie der Arteriosklerose der Koronararterien werden neben der Bypassoperation auch die interventionellen Methoden der Ballondilatation (Perkutane transluminale koronare Angioplastie, PTCA) und die Stentimplantation eingesetzt. Deren Erfolg ist oft limitiert durch eine sich bildende Restenose, die bei den interventionellen Verfahren in rund einem Drittel der Fälle auftritt^{82, 26, 99, 43, 18, 107}.

Angestoßen wird die Kaskade, die letztlich zur neointimalen Hyperplasie und damit zur Restenose führt, durch eine Entzündungsreaktion, die der mechanischen Verletzung durch die Angioplastie folgt^{95, 101, 115}. Eine Schlüsselrolle in dieser Entzündungsreaktion sieht man im Zytokin Interleukin-1. Ob der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist die neointimale Hyperplasie unterdrückt, wurde bisher noch nicht untersucht.

A. Interleukin-1

Die Interleukin-1 Gruppe besteht aus drei Vertretern: dem Interleukin-1, dem Interleukin-1 Rezeptor und dem Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten.

Bei Interleukin-1 sind zwei Formen bekannt, Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β).

a. Interleukin-1a

Das Interleukin-1 α verbleibt zum größten Teil intrazellulär, seine systemischen Auswirkungen sind im Vergleich zum Interleukin-1 β gering. Normalerweise ist IL-1 α nicht in der Zirkulation oder in Körperflüssigkeiten nachzuweisen, außer der Patient ist schwer krank. In diesem Fall wird das Zytokin nach Proteolyse freigesetzt^{4, 114, 118}.

b. Interleukin-1b

Das Zytokin Interleukin-1 β ist neben TNF einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren. Seine proinflammatorischen Wirkungen sind sehr vielfältig. So werden unter anderem die Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen hochreguliert^{14, 12}, die Chemotaxis für Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten verstärkt, sowie T-Zellen aktiviert²¹. Gewebsmakrophagen und andere Zellen werden zur Produktion von Proteasen angeregt¹⁰⁷. IL-1 β stimuliert außerdem das Wachstum von Fibroblasten⁹⁶, ebenso wie die Freisetzung von Interleukin-6 und Interleukin-8 durch glatte Muskelzellen⁷⁰. Diese werden zusätzlich durch IL-1 zur Proliferation und Migration angeregt^{68, 13}.

Die Hauptsynthesequellen für Interleukin-1 β sind Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothelzellen, B-Zellen und aktivierte T-Zellen sind zur Interleukin-1 Synthese fähig⁶⁰.

Die Produktion von Interleukin-1 β kann auf verschiedene Arten stimuliert werden. Makrophagen reagieren vor allem auf Endo- und Exotoxine verschiedener Erreger sowie auf Antigen-Antikörper-Komplexe, C5a, Kristalle oder den Phagozytosevorgang⁴⁰. Andere Zellen reagieren mit Interleukinausschüttung auf Zellkontakt, den Kontakt mit extrazellulärer Matrix, Fragmenten aus dem Komplementbereich, Bakterien und Viren oder mechanische Scheerkräfte⁶⁴. Auch andere Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) setzen die Interleukin-1 Produktion in Gang¹⁰⁷. Außerdem kann sich Interleukin-1 β selbst in einem autokrinen oder parakrinen Mechanismus hoch regulieren^{107,100}.

Bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit sind die Serumwerte von IL-1 β erhöht⁵⁵.

c. Interleukin-1 Rezeptoren

Es sind zwei verschiedene Formen des Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) bekannt. Zum einen gibt es den Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1RI), der an eine intrazelluläre Signalkaskade gekoppelt ist¹⁰⁷. Der Interleukin-1 Rezeptor Typ 2 (IL-1RII) hingegen ist ein ungekoppelter Decoy-Rezeptor³¹.

Typ1-Rezeptoren binden IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra mit gleicher Affinität^{3,36}. Typ2-Rezeptoren jedoch binden IL-1 β mit größerer Affinität als IL-1 α oder IL-1ra⁷⁷.

B. Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist

a. Struktur und Produktion

Man unterscheidet zwei verschiedene Isoformen des IL-1ra, eine sekretorische Form (sIL-1ra), und eine intrazelluläre Form mit drei Unterformen (icIL-1ra1,2,3)^{56, 73,, 80, 81}.

Der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) bindet an beide Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1RI und IL-1RII). Im Gegensatz zu Interleukin-1 α und Interleukin-1 β besitzt er keine intrinsische Aktivität^{4, 54, 105}.

Das sekretorische IL-1ra wird in variabel glycosyliertem Zustand in einer Größe zwischen 22-25 kDa sezerniert⁶. In vitro erreicht die IL-1ra-Produktion nach LPS-Stimulation ihren Höhepunkt nach vier Stunden, die Interleukin-1 β -Produktion bereits nach 2 Stunden^{2, 111}. Beim Menschen wird das Produktionsmaximum von IL-1ra nach Injektion von Escherichia coli Endotoxin bereits nach zwei Stunden erreicht (Interleukin-1 β : eine Stunde)⁴⁷. Die Plasmahalbwertszeit von IL-1ra beträgt sechs Minuten. Das sIL-1ra-Protein von Nager und Mensch besteht jeweils aus 152 Aminosäuren. Die Homologie beträgt 77%^{38, 75, 102, 121}. Humanes IL-1ra ist nicht speziesspezifisch und bindet mit gleicher Affinität an die Rezeptoren von Mäusen, Rindern und Menschen⁶³.

Die sekretorische Form des IL-1ra bindet zwar mit hoher Spezifität und fast ebenso hoher Affinität wie Interleukin-1 α und Interleukin-1 β an den Interleukin-Rezeptor-Typ1, doch werden sehr hohe Konzentrationen benötigt, um den Effekt von IL-1 β zu antagonisieren. Dies liegt an der hohen Sensibilität der Zielzellen für Interleukin-1 β . Zwar exprimiert jede Zelle eine große Menge an Rezeptoren, doch reicht bereits die Stimulation von einigen wenigen zur Immunantwort aus. Um die Zellstimulation zu unterdrücken ist eine hundert- bis tausendfach höhere Konzentration an IL-1ra notwendig im Vergleich zum Agonisten⁵. Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Mikrogliazellen sind sowohl in vitro als auch in vivo fähig, IL-1ra in großen Mengen zu bilden^{46, 74}.

b. Biologie des IL-1ra

Die wichtigste Aufgabe des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten ist die Regulierung und Kontrolle der durch Interleukin-1 β hervorgerufenen Effekte über eine kompetitive Hemmung am Rezeptor. Überwiegt Interleukin-1 β , so kommt es zu Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden.

Sowohl die endogene Produktion als auch die Auswirkungen von rekombinantem IL-1ra wurden in zahlreichen Tiermodellen untersucht. Alles deutet darauf hin, dass bei einem Fehlen von IL-1ra, künstlich herbeigeführt etwa durch die Gabe von IL-1ra-Antikörpern, viele Krankheiten einen besonders langen und gravierenden Verlauf nehmen. Versuche, die diese These belegen, befassten sich unter anderem mit LPS-induzierter Arthritis bei Kaninchen⁴⁵, Granulomentstehung durch Schistosomiasis bei Mäusen²⁵ und Formalin- und Immunkomplex-induzierter Kolitis bei Kaninchen⁴¹. Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass die endogene IL-1ra-Produktion bei Krankheitsbildern, in denen IL-1 eine vorrangige Rolle spielt, deutlich zur Eingrenzung der Entzündungsreaktion und der Gewebsschäden beiträgt. Diese These wird auch gestützt durch die Erkenntnis, dass Tiere ohne eine endogene Produktion des Interleukin-1 Antagonisten, zum Beispiel IL-1ra Knock-out Mäuse, gegenüber Infektionen deutlich anfälliger sind und früher sterben⁵⁷. Diese Tiere bleiben auch ohne schwerwiegende Infektionen deutlich kleiner als die Wildtypen^{57, 103}.

In anderen Arbeiten^{6, 20, 35, 67} führte die Verabreichung von rekombinantem sIL-1ra dazu, den Ausbruch einer Krankheit zu verzögern oder ein bereits bestehendes Krankheitsbild abzuschwächen.

Auch gentherapeutische Versuche waren erfolgreich, vor allem bei Tiermodellen mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis. Roessler et al zeigten, dass ein adenoviraler Vektor mit humaner cDNA, direkt in den Kniegelenksspalt von Kaninchen injiziert, von Synovialzellen aufgenommen und exprimiert wurde⁹³. Das dann produzierte IL-1ra konnte vier Wochen lang nachgewiesen werden. Seine biologische Aktivität wurde dadurch bewiesen, dass sich die durch IL-1 induzierte Proteoglycan-Zersetzung des Knorpels verringerte^{93,94}.

In einem anderen Versuch wurden bereits *in vitro* mit einem retroviralen Vektor transduzierte Synovialzellen in den Kniegelenksspalt von Kaninchen injiziert. In diesem Fall konnte IL-1ra fünf Wochen lang nachgewiesen werden. Die Effekte waren eine reduzierte Neutrophilen-Infiltration, die Verdickung der Synovia fiel vermindert aus und die Zersetzung von Knorpel-Proteoglycanen wurde verringert⁹. Andere Versuche bewiesen die Reduzierung von bakterieller Zellwand-induzierter Arthritis bei Ratten⁷², Antigen-induzierter Arthritis bei Kaninchen⁸⁷ und Kollagen-induzierter Arthritis bei Mäusen⁸.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die Träger des Allels 2 des Gens für den Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1RN*2) sind, einen höheren IL-1ra-Serumwert erreichen. Bei ihnen zeigt sich ein geringeres Risiko der Restenose und bessere Ergebnisse nach Revaskularisation durch PTCA⁵⁹ sowie öfter lediglich eine Ein-Gefäß-Erkrankung der Koronarien⁴⁴.

C. Restenose in der interventionellen Kardiologie

Die Entwicklung von Restenosen beeinträchtigt maßgeblich den Erfolg interventioneller Maßnahmen der Revaskularisierung wie PTCA und Stentimplantation. Das Risiko hierfür liegt bei rund dreißig Prozent. Während der letzten zwanzig Jahre wurden verschiedene Versuche unternommen, die Restenoserate zu verringern. Trotz positiver Ergebnisse im Tiermodell konnte bis jetzt keine pharmakologische Therapie entwickelt werden, die signifikant das Restenoserisiko beim Menschen verringert hätte.

Die Restenosierung resultiert, je nach therapeutischer Maßnahme, aus verschiedenen Mechanismen. Bei PTCA entsteht die Restenose durch elastische Rückstellkräfte nach Dilatation (*Recoil*) und Schrumpfung des Gefäßwanddurchmessers mit Verkleinerung des Lumens (*Constrictive Remodeling*). Nach Stenting entsteht die Restenose durch die Bildung einer Neointima. Hier kommt es vor allem zum Wachstum glatter Muskelzellen und einer überschießenden Bildung extrazellulärer Matrix (ECM)⁷.

Die Entstehung der Neointima geschieht in mehreren Schritten: Aktivierung, Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen mit ihrem Höhepunkt ein bis vier Wochen nach Gefäßwandtrauma und Produktion extrazellulärer Matrix. Dabei wird die Hyperplasie beeinflusst von Wachstumsfaktoren, Hormonen und mechanischen Faktoren^{10, 30, 107}.

Die Wachstumsfaktoren sind im einzelnen PDGF, bFGF, TGF- β und IGF-1. Diese Faktoren sind alle direkt oder indirekt von Interleukin-1 abhängig⁵⁸.

PDGF wird hauptsächlich in Megakaryozyten synthetisiert und danach in den α -Granulas von Thrombozyten gespeichert. Die Synthese von PDGF kann durch IL-6, TNF- α , TGF- β , EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und Interleukin-1 induziert werden.

TGF- β wird, wie PDGF, vor allem aus Thrombozyten freigesetzt. Auch viele andere Zellen sind zu seiner Produktion fähig, allerdings in weitaus geringeren Maßen. Die Sekretion kann durch viele verschiedene Stimuli induziert werden, unter anderem durch Retinoide, Steroide, Vitamin-D3, EGF, NGF und Interleukin-1¹²⁰. TGF- β spielt außerdem bei der Speicherform der extrazellulären Matrix eine Rolle⁵⁸. Neben seiner proliferativen hat TGF- β aber auch eine antiinflammatorische Wirkung. TGF- β regt VSMC *in vitro* zur Bildung von IL-1ra mRNA an^{33, 113}. Die mRNA Expression beginnt nach zwei Stunden und erreicht ihren Höhepunkt nach 18 Stunden. Maximal wird im Vergleich mit unstimulierten Zellen das Sechsfache an mRNA gebildet. Der Effekt von TGF- β auf VSMC konnte mit anti-IL-1 β Antikörpern (10 μ g/ml) komplett inhibiert werden³³.

Zwischen koronarer Läsion und IL-1 β konnte ein direkter Zusammenhang gezeigt werden. Nach Pietertesma et al. sind die IL-1 β -Level im Überstand von kultivierten Monozyten nach PTCA deutlich erhöht⁸⁹. Hancock et al. wiesen 14 Tage nach Fogarty-Läsion der Carotiden von Ratten eine großflächige immunhistochemische Färbung auf IL-1 β nach⁵². Im Schweinemodell konnten Chamberlain et al. IL-1 β in den luminalen Endothelzellen ab einer Stunde nach PTCA mit einem Höhepunkt drei bis sieben Tage nach Läsion nachweisen. In den Zellen der Adventitia wurde IL-1 β ab drei Tage nach PTCA zwischen sieben und vierzehn Tage danach festgestellt. Nach sieben Tagen waren auch die neointimalen Zellen IL-1 β positiv. In den Kontrolltieren ohne PTCA wurde kein IL-1 β gefunden²². Wang et al. zeigten einen Anstieg von IL-1 β und IL-1ra in den Karotis-Gefäßen der Ratte nach Fogarty-

Läsion¹¹⁷. Nach sechs Stunden war Interleukin-1 mRNA gegenüber den Kontrollen, entnommen zum Zeitpunkt Null vor Läsion, um das 30-fache erhöht ($P < 0,001$), bereits 24 Stunden später war das Ausgangsniveau wieder erreicht. IL-1ra mRNA war nach 24 Stunden um das 400-fache erhöht ($P < 0,001$) und kehrte vierzehn Tage nach Läsion zum Ausgangsniveau zurück. Die verstärkte Expression von Interleukin-1 β fand vor allem in den glatten Muskelzellen statt.

Interleukin-1 β wirkt auf glatte Muskelzellen (VSMC) vasorelaxierend³⁷ und proliferativ^{13, 68, 92}. Nach IL-1 β Stimulation bilden glatte Muskelzellen IL-1ra¹¹. Bei Zugabe von rhn-IL1ra konnte *in vitro* bei VSMC der Ratte ein antiproliferativer Effekt von IL-1ra nachgewiesen werden. Die DNA-Synthese der VSMC reduzierte sich maximal nach Zugabe von 250 ng/ml rhn-IL1ra und einer Inkubationszeit von 48 Stunden⁹¹.

Eine weitere wichtige Rolle zur Vermeidung neointimaler Hyperplasie spielt die schnelle Reendothialisierung des Gefäßes. Endothelzellen vermindern die thrombogenen Eigenschaften der Media, reduzieren die Leukozytenadhärenz und schütten wachstumsinhibierende Faktoren aus²⁸. Interleukin-1 β spielt eventuell auch hier eine Rolle, denn wie gezeigt wurde, findet nach PTCA im Ratten-Karotis-Modell ebenso wie die Induktion des IL-1 β Systems auch die Induktion des Endothelin-Systems^{116, 117} statt. Der modulatorische Effekt von IL-1 β auf Expression und Funktion des Endothelin-Rezeptors wurde gezeigt⁸³.

II. Fragestellung

Die lokale Entzündungsreaktion spielt eine Schlüsselrolle in der Induktion neointimaler Proliferation nach Angioplastie. Interleukin-1 fällt in der lokalen Regulation relevanter Entzündungsprozesse für die Neointimahyperplasie eine zentrale Rolle zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch lokale Überexpression des natürlich vorkommenden Antagonisten IL-1ra durch Gentransfer die Induktion neointimaler Hyperplasie gehemmt werden kann. Dies wurde im Karotis-Verletzungsmodell der Ratte untersucht.

Außerdem wurde untersucht, ob die neointimale Proliferation durch intravenöse Applikation von rekombinantem sIL-1ra nach Angioplastie gehemmt werden kann.

III. Methoden

A. Vektorkonstrukte

Die cDNA des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten wurde uns freundlicherweise von Marta Muzio, Department of Immunology and Cell Biology Mario Negri Institute, Mailand, Italien, zur Verfügung gestellt.

Die Konstruktion der Adenoviren (Ad-IL1ra, Ad-GFP) und des adenoassoziierten Virus (AAV-GFP) wurde von befreundeten Arbeitsgruppen vorgenommen. Das verwendete Adenovirus Serotyp 5 war in den Regionen E1 und E3 deletiert.

B. Tiermodell

c. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Crl:CD (SD) BR, Charles River GmbH, Sulzfeld/Deutschland) verwendet. Die Tiere wogen zwischen 450 g und 500 g, waren vier bis sechs Wochen alt und wurden zur Eingewöhnung jeweils etwa zwei Wochen vor der Operation eingestallt.

Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 70% in Zweiergruppen auf Holzfasereinstreu (ssniff-bedding-3/4-entstaubt, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/Deutschland) in Makrolonkäfigen (Typ IV, Ehret GmbH, Emmendingen/Deutschland) gehalten. Eine Beleuchtungsanlage sorgte für einen zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus bei 500 Lux. Die Ernährung der Tiere erfolgte mit Standardfutter (ssniff-Alleinfutter für Ratten und Mäuse R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Bei der konventionellen Haltungsform der Ratten

wurde die völlige Gesundheit der Tiere durch regelmäßige serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen gewährleistet. Bei Haltung, Behandlung und Handhabung der Tiere wurde auf konsequente Hygiene Wert gelegt. Die Tiere wurden durch einen Veterinärmediziner überwacht.

Die Operation und die Organentnahme wurden in den Operationsräumen des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München durchgeführt. Laut § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4, Satz 3 i.V. m § 8a des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17. Februar 1993 unterlag das vorliegende Forschungsvorhaben der Anzeigepflicht und wurde als solches von der Regierung von Oberbayern bestätigt.

Die histologischen Untersuchungen erfolgten im Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar, München.

d. Das Rattenkarotisverletzungsmodell mit adenoviralem Gentransfer

Sprague-Dawley-Ratten wurden mit einer voll antagonistisierbaren Dreierkombination aus einem Benzodiazepin (Midazolam - DORMICUM ® 1 mg/ml), einem α_2 -Adrenorezeptor-Agonist (Medetomidin - DOMITOR ® 5 mg/ml) und einem Opioid (Fentanyl - FENTANYL ® 0,05 mg/ml) durch intramuskuläre Injektion für 1,5 - 2 Stunden narkotisiert. Nach Eintreten des chirurgischen Toleranzstadiums wurde das Tier durch Rasur des Halsbereiches mit anschließender Desinfektion (CUTASEPT F ®) und Fixation beider Vordergliedmaßen in Rückenlage auf einer durch ein OP-Tuch abgedeckten Wärmeplatte für die Operation unter sterilen Bedingungen vorbereitet.

Unter dem Dissektionsmikroskop wurde oberhalb des Manubrium sterni in einem Mittellinienschnitt die Halsregion bis auf Höhe der M. masseter eröffnet. Nach stumpfen Freipräparieren und Umschlingen (USP 3/0 PROLENE) des M. sternohyoideus, M. sternomastoideus, M. sternothyroideus und M. digastricus (Venter caudalis) erfolgte die Präparation der Arteria carotis externa sowie der abgehenden Arterien A. thyroidea und A. occipitalis. Danach wurde die A. carotis externa angeschlossen und A. thyroidea und

A. occipitalis wurden ligiert (USP 6/0 VINYL). Nun wurde die A. carotis externa mit einer Gefäßklemme temporär verschlossen und proximal mit einer Gefäßschere eröffnet.

Ein 2F Fogarty ® Emboliekatheter wurde bis in die proximale A. carotis communis vorgeführt, dann wurde der Ballon des Katheters gefüllt und bis in die A. carotis externa zurückgezogen.

Nach der Entfernung des Katheters wurde die A. carotis externa ligiert. Die A. carotis communis und die A. carotis interna wurden nun temporär unterbunden, gefolgt von der 20-minütigen Instillation des rekombinanten replikationsdefizienten Adenovirus (Ad-IL1ra, AAV-GFP, Ad-GFP) in einer Konzentration von 10^{10} - 10^{11} PFU.

Anschließend wurden die A. carotis communis und interna wieder dem Blutfluss freigegeben und der Operationsbereich vernäht (s.c.: USP 4/0, c.: USP 3/0).

Die Antagonisierung der Vollnarkose wurde mit einer Kombination aus einem Benzodiazepin-Antagonist (Flumazenil - ANEXATE ® 5 mg/ml), einem 2-Adrenozeptor-Antagonisten (Atipamezol - ANTISEDAN ® 0,1 mg/ml) und einem Opioidantagonisten (Naloxon - NARCANTI ® 0,4 mg/ml) durch subkutane Injektion erreicht. Die Operationsdauer betrug ca. 60 Minuten.

Die mit Ad-IL1ra instillierten Tiere bildeten die Versuchsgruppe Ad-IL1ra (Ad-IL1ra-Verumgruppe), die mit Ad-GFP und AAV-GFP instillierten Tiere die GFP-Kontrollgruppe.

e. Das Rattenkarotisverletzungsmodell ohne Gentransfer als Negativkontrolle

Die Operationstechnik blieb unverändert, wobei die Virusinstillation entfiel. Stattdessen wurde Natrium-Chlorid 0,09% (NaCl) instilliert.

Die Tiere dieser Gruppe bildeten die NaCl-Kontrollgruppe.

f. Das Rattenkarotisverletzungsmodell mit intravenöser Injektion von rekombinantem IL-1ra

Am Tag der Operation wurde jedem Tier zuerst Blut entnommen und anschließend 0,02 mg/kg KG (n=1) bzw. 0,03 mg/kg KG (n=2) rekombinantes IL1ra (Human IL-1 receptor antagonist rec. von E.coli, Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg/Deutschland) i.v. über die Schwanzvene gegeben. Die Fogartyläsion wurde 30 min. später gesetzt.

Die i.v. Applikation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden wiederholt.

Die Tiere dieser Gruppe bildeten die rhn-IL1ra-Gruppe.

g. Postoperative Behandlung

Nicht-steroidale Antiphlogistika konnten aufgrund ihres entzündungshemmenden Effekts und damit einer potentiellen Beeinflussung des Studienergebnisses nicht gegeben werden. Zur postoperativen Analgesie wurde daher Buprenorphin (TEMGESIC ®) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KG s.c. verabreicht.

h. Opferung der Tiere und Perfusionsfixation

Drei Tage bzw. 14 Tage post op. wurden die angioplastierten Ratten mit der oben genannten Dreierkombination narkotisiert bis Reflexlosigkeit eintrat. Dann wurde das Herz inzidiert sowie NaCl 0,09% infundiert, bis das Herz zu schlagen aufhörte und Herz und Leber blutleer waren. Daraufhin wurden die Ratten thorakotomiert und die Gefäße perfusionsfixiert.

Die Thorakotomie erfolgte in Rückenlage durch Hautschnitt über dem Sternum. Danach erfolgte das stumpfe Abpräparieren eines Hautlappens bis in die Nähe des Schlüsselbeins, dann wurden Muskeln und Rippen an der Knochen-Knorpelgrenze nach kranial durchtrennt. Dafür wurden eine stumpfe Präparierschere, eine kleine spitze Schere, eine anatomische Pinzette, eine Klemme und Tupfer benötigt. Für die Perfusion wurden eine 500 ml Flasche

NaCl 0,09% und ein Beutel Formalin an einen Drei-Wege-Hahn angeschlossen und an diesen wiederum eine Heidelberger Verlängerung mit einer 0,3 mm-Kanüle gekoppelt.

Nun wurde das Sternum komplett nach kranial aufgerichtet und mit einer Klemme fixiert. Anschließend erfolgte der Einstich in den linken Ventrikel mit der Kanüle. Das rechte Herzohr wurde mit einem Scherenschlag eröffnet und ca. 40 ml NaCl 0,09% in das linke Herzohr infundiert, bis Herz und Leber blutleer waren.

Durch Umlegen des Dreiwegehahns wurde 4% Paraformaldehyd eingebracht. Dann wurde der Hals des Tieres eröffnet und die Arteria carotis communis links und rechts (Kontrollgefäß) entnommen und in 4% Formalin fixiert.

C. Präparation der Gefäße und Schnitte

Die in Formalin fixierten Arteria carotis communis wurden mit einem Skalpell in drei Teile zu je 2 mm Länge geschnitten (Bezeichnung von proximal nach distal A/B/C), an den distalen Enden mit Tusche markiert und jeweils in ein Einbettgefäß gegeben. Nach der Einbettung (Einbettautomat „Pathfinder“, Shandon GmbH, Frankfurt a.M./ Deutschland; Programm 1 „Routine über Nacht“, 13,09 Stunden) wurden die Gefäßteile mit Paraffin ausgegossen und anschließend am Rotationsmikrotom (Rotary Microtom HM 335 E, Microm International GmbH, Walldorf/Deutschland) mit 1µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden in HE und van Giesson gefärbt (Tissue Stainer 30/50, medite GmbH, Burgdorf/Deutschland).

D. Morphometrie

Die Messung der Schnitte wurde digital vorgenommen (Mikroskop: Axioplan 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/Deutschland; Bildbearbeitungsprogramm: Axiovision Version 1.01, Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos/Deutschland; Kamera: 3CCD Video Camera, Sony

Deutschland GmbH, Köln/Deutschland; Digitales Messprogramm: NIH-Image J 4.0, National Institution of Health (NIH), Bethesda, Maryland/USA). Die Vergrößerung bei der Aufnahme war $\times 2,5$.

In den Gruppen Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe und GFP-Kontrollgruppe wurde jeweils das linke B-Segment vermessen. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen wurde das rechte B-Segment ausgemessen. Von insgesamt 36 Tieren konnten in fünf Fällen die Schnitte des linken Gefäßes, in 19 Fällen die des rechten Gefäßes nicht ausgewertet werden.

Die Schnitte der Gefäße L1842 aus der Ad-IL1ra-Verumgruppe und L2500 aus der NaCl-Gruppe waren in allen drei Segmenten thrombosiert. Von L1824 (Ad-IL1ra), L1844 (Ad-IL1ra) und L2610 (AAV-LacZ) waren die Gefäßstrukturen in allen drei Segmenten dissoziiert. Bei den Gefäßen L1827, R2496, L2609, L2612 und L2615 konnte das B-Segment nicht ausgemessen werden, da bei L1827 das Gefäß thrombosiert, bei L2609B, L2612B und L2615B die Gefäßschichten dissoziiert waren und bei R2696B das Lumen kollabiert war. Stattdessen wurden in den fünf Fällen die distalen Abschnitte des A-Segments gewertet.

Bei den Gefäßen der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen waren während der Aufbewahrungsphase zur anschließenden Einbettung bei R1824, R1825, R1827, R1828, R1829, R1830, R1838, R2498, R2499, R2500 und R2608 bis R2616 die Gefäße kollabiert, womit über den Lumendurchmesser keine Aussage möglich war.

Somit waren 18 Tiere der Ad-IL1ra-Verumgruppe, fünf Tiere der NaCl-Kontrollgruppe, drei Tiere der Ad-Kontrollgruppe, drei Tiere der rhn-IL1ra-Gruppe und das AAV-GFP-Tier auswertbar. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen waren 17 Tiere auswertbar.

Tier Nr	OP-Datum	Gewicht	Gentransfer	Entnahmedatum	Auswertung li.	Auswertung re.
1824	31.07.2000	426g	Ad-IL1ra	03.08.2000	- (dissoziiert)	- (kollabiert)
1825	08.08.2000	428g	Ad-IL1ra	23.08.2000	+	- (kollabiert)
1826	08.08.2000	425g	Ad-IL1ra	23.08.2000	+	+
1827	08.08.2000	425g	Ad-IL1ra	23.08.2000	+ (A-Segment)	- (kollabiert)
1828	09.08.2000	423g	Ad-IL1ra	24.08.2000	+	- (kollabiert)
1829	09.08.2000	435g	Ad-IL1ra	24.08.2000	+	- (kollabiert)
1830	09.08.2000	445g	Ad-IL1ra	24.08.2000	+	- (kollabiert)
1831	10.08.2000	442g	Ad-IL1ra	25.08.2000	+	+
1832	10.08.2000	432g	Ad-IL1ra	25.08.2000	+	+
1833	10.08.2000	390g	Ad-IL1ra	25.08.2000	+	+
1834	11.08.2000	444g	Ad-IL1ra	25.08.2000	+	+
1835	22.08.2000	524g	Ad-IL1ra	06.09.2000	+	+
1836	22.08.2000	525g	Ad-IL1ra	06.09.2000	+	+
1837	23.08.2000	490g	Ad-IL1ra	06.09.2000	+	+
1838	23.08.2000	497g	Ad-IL1ra	06.09.2000	+	- (kollabiert)
1839	23.08.2000	517g	Ad-IL1ra	07.09.2000	+	+
1840	23.08.2000	488g	Ad-IL1ra	07.09.2000	+	+
1841	23.08.2000	486g	Ad-IL1ra	07.09.2000	+	+
1842	24.08.2000	452g	Ad-IL1ra	07.09.2000	- (thrombosiert)	+
1843	25.08.2000	451g	Ad-IL1ra	07.09.2000	+	+
1844	25.08.2000	463g	Ad-IL1ra	07.09.2000	- (dissoziiert)	+
2496	13.11.2000	x	NaCl 0,09%	27.11.2000	+	+ (A-Segment)
2497	13.11.2000	x	NaCl 0,09%	27.11.2000	+	+
2498	13.11.2000	x	NaCl 0,09%	27.11.2000	+	- (kollabiert)
2499	16.11.2000	x	NaCl 0,09%	30.11.2000	+	- (kollabiert)
2500	16.11.2000	x	NaCl 0,09%	30.11.2000	- (thrombosiert)	- (kollabiert)
2501	16.11.2000	x	NaCl 0,09%	30.11.2000	+	+
2608	17.11.2000	x	Ad-GFP	01.12.2000	+	- (kollabiert)
2609	17.11.2000	x	Ad-GFP	01.12.2000	+ (A-Segment)	- (kollabiert)
2610	20.11.2000	x	AAV-LacZ	11.12.2000	- (dissoziiert)	- (kollabiert)
2611	20.11.2000	x	AAV-GFP	11.12.2000	+	- (kollabiert)
2612	20.11.2000	x	Ad-GFP	04.12.2000	+ (A-Segment)	- (kollabiert)
2613	21.11.2000	x	Ad-IL1ra	27.11.2000	+	- (kollabiert)
2614	27.11.2000	x	rhn-IL1ra	11.12.2000	+	- (kollabiert)
2615	27.11.2000	x	rhn-IL1ra	11.12.2000	+ (A-Segment)	- (kollabiert)
2616	27.11.2000	x	rhn-IL1ra (0,5)	11.12.2000	+	- (kollabiert)

Bezeichnung: + Auswertung möglich, - Auswertung nicht möglich

Tabelle 1: OP-Daten/Entnahmedaten. In fünf Fällen wurde statt des B-Segments das distale A-Segment ausgewertet.

E. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit einem SPSS-Programm (SPSS Inc., Chicago, Illinois 6060) durchgeführt.

Die Gruppen NaCl-Kontrollgruppe, Ad-IL1ra-Verumgruppe und GFP-Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test verglichen.

Die Ad-IL1ra-Verumgruppe wurde mit der GFP-Kontrollgruppe durch einen Wilcoxon-Rangsummen-Test verglichen.

Zum Vergleich der Kontrollgruppe mit unbehandeltem Gefäß und der Ad-IL1ra-Verumgruppe wurde ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Der Test nahm die zwölf Tiere zur Grundlage, von denen sowohl das rechte als auch das linke Gefäß jeweils in ihrer Gruppe vertreten waren.

In den Boxplot-Darstellungen werden Maximum, Minimum, oberes und unteres Quartil sowie der Median angegeben.

F. Histopathologische Beurteilung

Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch auf Mediaruptur, neointimales entzündliches Infiltrat und perivaskuläres entzündliches Infiltrat beurteilt. In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut des Krankenhauses Rechts der Isar in München wurde eine optische Beurteilung sämtlicher Schnitte vorgenommen. Neointima und das perivaskuläre Gebiet wurden auf infiltrierende Entzündungszellen, die Media auf vermehrte Zellteilung und Endoplasmatisches Retikulum untersucht. Dabei wurden die beurteilten Kriterien in drei Ausprägungsstufen – nicht vorhanden/ vereinzelt/ über die gesamte Fläche verteilt – unterschieden. Von jedem Gefäß wurden vier Schnitte beurteilt und zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Nicht beurteilbar waren L1842B und L1844B, da sie dissoziiert waren. L1839B und L2614B waren perivaskulär nicht beurteilbar, da das äußere Gewebe sich abgelöst hatte.

IV. Ergebnisse

A. Gefäßwand nach Induktion der neointimalen Proliferation nach Überexpression von IL-1ra in der Gefäßwand

a. Ergebnisse in der NaCl-Kontrollgruppe und der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen

Name	Substrat	Lumen _d	NI _d	Media _d	Lumen _A	NI _A	Media _A	Total _A	Lumen _r
R1826B	Ad-IL1ra (14d)	0,779	-	0,066	0,328	-	0,148	0,476	0,323
R1831B	Ad-IL1ra (14d)	0,796	-	0,050	0,497	-	0,132	0,629	0,398
R1832B	Ad-IL1ra (14d)	0,742	-	0,042	0,432	-	0,103	0,535	0,371
R1833B	Ad-IL1ra (14d)	0,719	-	0,043	0,406	-	0,104	0,510	0,360
R1834B	Ad-IL1ra (14d)	0,756	-	0,051	0,449	-	0,129	0,578	0,378
R1835B	Ad-IL1ra (14d)	0,885	-	0,048	0,615	-	0,143	0,758	0,443
R1836B	Ad-IL1ra (14d)	0,739	-	0,053	0,429	-	0,133	0,562	0,370
R1837B	Ad-IL1ra (14d)	0,789	-	0,048	0,489	-	0,127	0,616	0,395
R1839B	Ad-IL1ra (14d)	0,855	-	0,063	0,574	-	0,179	0,753	0,427
R1840B	Ad-IL1ra (13d)	0,774	-	0,049	0,47	-	0,126	0,596	0,387
R1841B	Ad-IL1ra (15d)	0,826	-	0,059	0,535	-	0,165	0,700	0,413
R1842B	Ad-IL1ra (15d)	0,749	-	0,052	0,57	-	0,130	0,570	0,374
R1843B	Ad-IL1ra (15d)	0,826	-	0,055	0,536	-	0,153	0,689	0,413
R1844B	Ad-IL1ra (14d)	0,842	-	0,051	0,700	-	0,143	0,700	0,421
R2496A	NaCl (14d)	0,674	-	0,065	0,357	-	0,151	0,508	0,337
R2497B	NaCl (14d)	0,730	-	0,060	0,418	-	0,149	0,567	0,365
R2501B	NaCl (14d)	0,843	-	0,055	0,558	-	0,157	0,715	0,422
	Durchschnitt	0,784	-	0,054	0,492	-	0,140	0,615	0,388
L2496B	NaCl (14d)	0,638	0,092	0,066	0,320	0,211	0,183	0,714	0,319
L2497B	NaCl (14d)	0,633	0,079	0,064	0,315	0,178	0,170	0,663	0,317
L2498B	NaCl (14d)	0,567	0,105	0,070	0,252	0,220	0,187	0,659	0,283
L2499B	NaCl (14d)	0,582	0,112	0,063	0,266	0,244	0,171	0,581	0,291
L2501B	NaCl (14d)	0,705	0,079	0,068	0,390	0,193	0,199	0,786	0,352
	Durchschnitt	0,625	0,093	0,066	0,309	0,209	0,182	0,681	0,312

Bezeichnungen: Lumen_d, Durchmesser des Lumens [mm]; NI_d, Neointimadurchmesser [mm]; Media_d, Mediadurchmesser [mm]; Lumen_A, Fläche des Lumens im Querschnitt [mm²]; NI_A, Fläche der Neointima i.Q. [mm²]; Media_A, Fläche der Media i.Q. [mm²]; Total_A, Gesamtfläche (Fläche innerhalb der äußeren Mediagrenze) [mm²]; Lumen_r, Radius des Lumens [mm].

Tabelle 2: Gefäßparameter der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen sowie der NaCl-Kontrollgruppe. In keinem der Gefäße der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen war eine neointimale Proliferation zu erkennen. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen waren 17 Tiere auswertbar, in der NaCl-Kontrollgruppe waren es fünf Tiere.

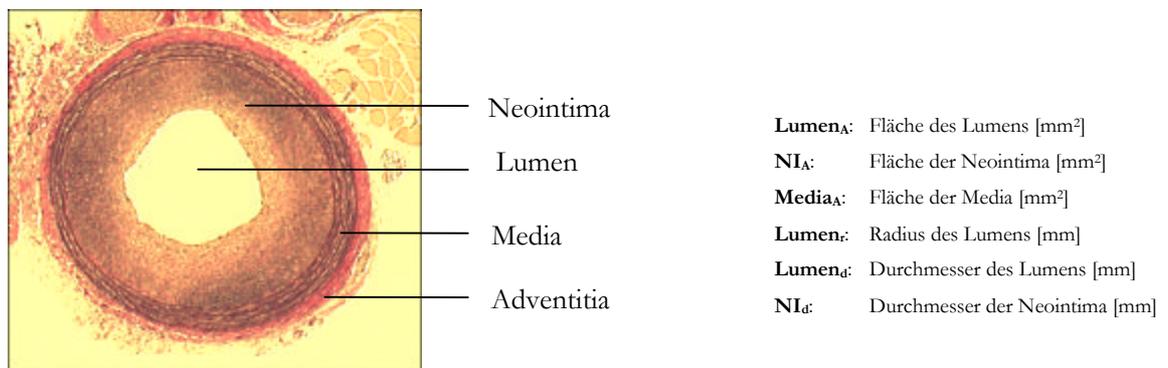


Abbildung 1: Illustration des Gefäßaufbaus

Es wurden verschiedene Gruppen gebildet. Für die Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen wurden die mittleren Segmente der rechten Arteriae carotae communes derjenigen Tiere ausgewertet, die in ihrem linken Gefäß nach Fogarty-Läsion Ad-IL1ra oder NaCl instilliert bekommen hatten. Die Ergebnisse der 17 verwertbaren Schnitte wurden zur „Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen“ zusammengefasst.

Für die NaCl-Kontrollgruppe wurde das mittlere Segment der mit NaCl 0,09% instillierten Gefäße ausgewertet (n=5).

Die Lumendurchmesser der Kontrolltiere mit unbehandelten Gefäßen sind mit 0,784mm signifikant größer ($p < 0,001$) gegenüber den Durchmessern der NaCl-Kontrolltiere (0,625mm). Dies entspricht einer Stenosebildung von 20,29%. Im Durchschnitt bildete sich in den NaCl-Kontrollgefäßen eine Neointima mit einem Durchmesser von 0,093mm. In den unbehandelten Gefäßen war dagegen keine Neointimabildung zu sehen.

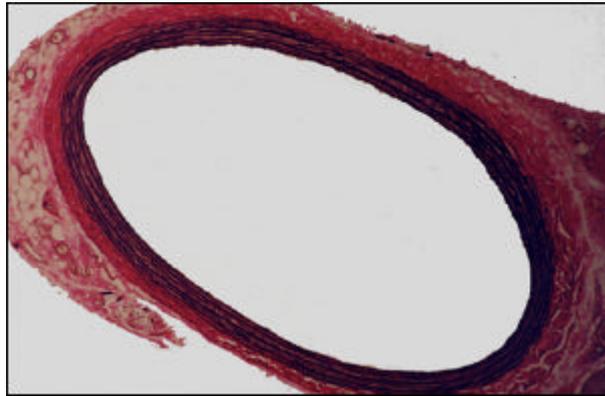
Auch die Media verbreiterte sich, von durchschnittlich 0,054 mm auf 0,066mm. Dies entspricht einer Zunahme um 22,22%.

In der mikroskopischen Betrachtung war in keinem der unbehandelten Gefäßen der Kontrollgruppe eine Aktivierung der Zellen der Media zu sehen. In der NaCl-Kontrollgruppe dagegen zeigte sich diese Aktivierung deutlich.

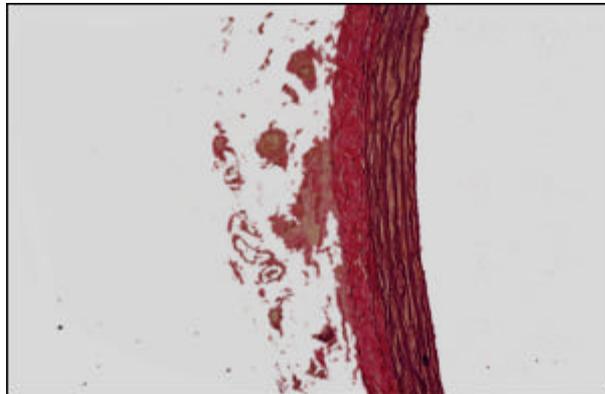
Nummer	Neointimales Infiltrat	Perivaskuläres Infiltrat	Mediazellaktivierung	Mediaruptur
NaCl-Kontrolle:				
L2496B	o	o	o	o
L2497A	-	o	+	-
L2498B	-	-/o	o	-
L2499B	-	-/o	o	-
L2501B	-	o	o	-
Kontrolle-re.:				
R1825B	-	-	-	-
R1827B	-	-	-	-
R1828B	-	-	-	-
R1829B	-	-	-	-
R1830B	-	-	-	-
R1831B	-	-	-	-
R1833B	-	-	-	-
R1834B	-	-/o	-	-
R1835B	-	-	-	-
R1836B	-	-	-	-
R1837B	-	-	-	-
R1838B	-	-	-	-
R1839B	-	-	-	-
R1840B	-	-	-	-
R1841B	-	-	-	-
R1842B	-	-	-	-
R1843B	-	-	-	-
R1844B	-	-	-	-

- nicht vorhanden
o vereinzelt
+ über die gesamte Fläche verteilt

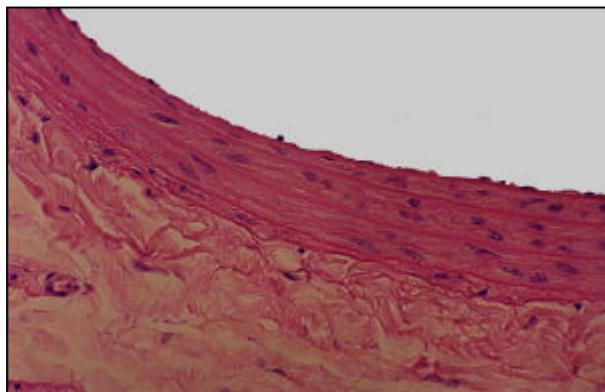
Tabelle 3: Histopathologische Beurteilung, Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen und NaCl-Kontrollgruppe. In der NaCl-Kontrollgruppe war in einem Fall ein entzündliches Infiltrat der Neointima zu sehen. Perivaskular dagegen war jedes Gefäß in unterschiedlicher Ausprägung betroffen. Eine mäßige bis die gesamte Media umfassende Mediazellaktivierung war ebenfalls in jedem der Gefäße zu sehen. Die Media war nur im Gefäß L2496B rupturiert. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen dagegen war in keinem der Gefäße ein Infiltrat, Mediazellaktivierung oder Mediaruptur zu sehen gewesen. Nur in einem Gefäß konnte ein geringes perivaskuläres Infiltrat gesehen werden.



A. R2501B – Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.
Originalvergrößerung $\times 10$, van Giesson

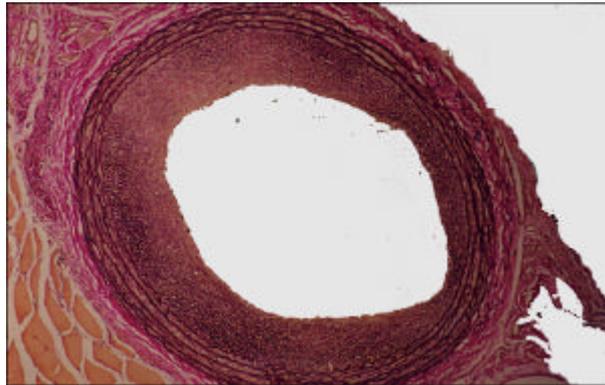


B. R2501B – Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.
Originalvergrößerung $\times 20$, van Giesson

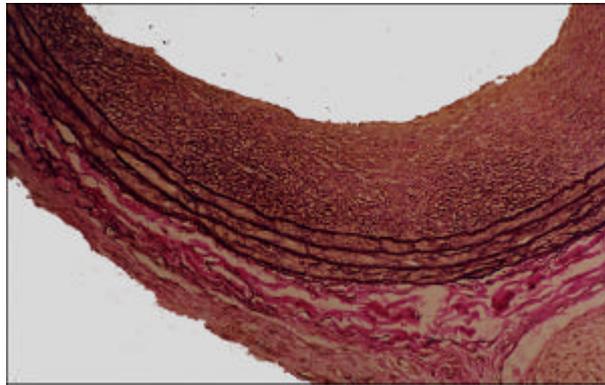


C. R2501B – Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.
Originalvergrößerung $\times 40$, HE

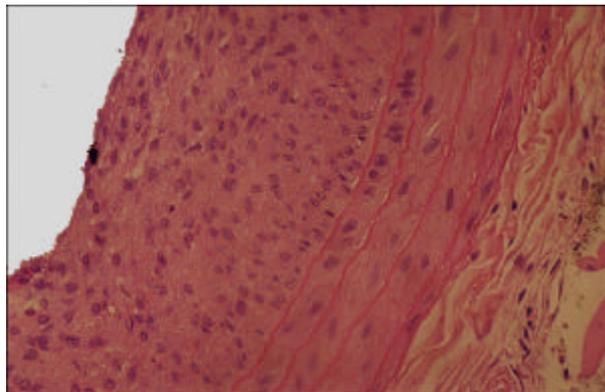
Abbildung 2: Gefäßsegment R2501B, Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen wurde die rechte Arteria carotis communis entnommen, ohne dass zuvor das Gefäß verletzt wurde. Das dargestellte Segment entspricht in seinen Werten den Durchschnittswerten. Man sieht deutlich, dass die Intima einlagig der Media aufliegt. Es ist keine Aktivierung der Mediazellen zu erkennen.



A. L2499B – NaCl-Kontrollgruppe.
Originalvergrößerung $\times 10$, van Giesson



B. L2499B – NaCl-Kontrollgruppe.
Originalvergrößerung $\times 20$, van Giesson



C. L2499B – NaCl-Kontrollgruppe.
Originalvergrößerung $\times 40$, HE

Abbildung 3: Gefäßsegment L2499B, NaCl-Kontrollgruppe. Das Gefäßsegment L2499B entspricht annähernd den Durchschnittswerten der NaCl-Kontrollgruppe. Man sieht die deutliche neointimale Proliferation. In der 40x Vergrößerung ist die mäßige Aktivierung der Media zu erkennen.

b. Ergebnisse der Ad-IL1ra-Verumgruppe und der GFP-Kontrollgruppe

Name	Substrat	Lumen _d	NI _d	Media _d	Lumen _A	NI _A	Media _A	Total _A	Lumen _r
L1825B	Ad-IL1ra (14d)	0,434	0,211	0,063	0,148	0,427	0,182	0,757	0,217
L1826B	Ad-IL1ra (14d)	0,578	0,102	0,069	0,263	0,216	0,186	0,665	0,289
L1827B	Ad-IL1ra (14d)	0,630	0,158	0,050	0,311	0,382	0,165	0,858	0,315
L1828B	Ad-IL1ra (14d)	0,696	0,068	0,060	0,380	0,164	0,167	0,711	0,348
L1829B	Ad-IL1ra (14d)	0,506	0,148	0,059	0,201	0,306	0,157	0,664	0,253
L1830B	Ad-IL1ra (14d)	0,690	0,130	0,056	0,374	0,335	0,177	0,886	0,345
L1831B	Ad-IL1ra (14d)	0,597	0,083	0,065	0,280	0,179	0,168	0,627	0,299
L1832B	Ad-IL1ra (14d)	0,386	0,149	0,070	0,117	0,250	0,166	0,533	0,193
L1833B	Ad-IL1ra (14d)	0,542	0,132	0,062	0,231	0,280	0,169	0,680	0,271
L1834B	Ad-IL1ra (13d)	0,453	0,167	0,080	0,161	0,323	0,219	0,703	0,226
L1835B	Ad-IL1ra (15d)	0,710	0,136	0,078	0,396	0,362	0,260	1,018	0,355
L1836B	Ad-IL1ra (15d)	0,694	0,116	0,071	0,378	0,294	0,225	0,897	0,347
L1837B	Ad-IL1ra (15d)	0,633	0,153	0,068	0,315	0,376	0,213	0,904	0,316
L1838B	Ad-IL1ra (14d)	0,704	0,023	0,057	0,390	0,052	0,144	0,586	0,352
L1839B	Ad-IL1ra (15d)	0,639	0,145	0,083	0,321	0,358	0,264	0,943	0,320
L1840B	Ad-IL1ra (15d)	0,633	0,153	0,075	0,315	0,378	0,239	0,932	0,317
L1841B	Ad-IL1ra (15d)	0,512	0,152	0,065	0,206	0,316	0,181	0,703	0,256
L1843B	Ad-IL1ra (15d)	0,449	0,193	0,073	0,158	0,389	0,206	0,753	0,224
Durchschnitt		0,583	0,134	0,067	0,275	0,299	0,194	0,768	0,291
L2496B	NaCl (14d)	0,638	0,092	0,066	0,320	0,211	0,183	0,714	0,319
L2497A	NaCl (14d)	0,633	0,079	0,064	0,315	0,178	0,170	0,663	0,317
L2498B	NaCl (14d)	0,567	0,105	0,070	0,252	0,220	0,187	0,659	0,283
L2499B	NaCl (14d)	0,582	0,112	0,063	0,266	0,244	0,171	0,581	0,291
L2501B	NaCl (14d)	0,705	0,079	0,068	0,390	0,193	0,199	0,786	0,352
Durchschnitt		0,625	0,093	0,066	0,309	0,209	0,182	0,681	0,312
L2611B	AAV-GFP (21d)	0,493	0,165	0,070	0,191	0,339	0,196	0,726	0,246
L2608B	Ad-GFP (14d)	0,202	0,217	0,064	0,032	0,285	0,141	0,458	0,101
L2609A	Ad-GFP (14d)	0,311	0,237	0,067	0,076	0,410	0,179	0,665	0,156
L2612A	Ad-GFP (14d)	0,590	0,089	0,062	0,273	0,189	0,162	0,624	0,295
Durchschnitt		0,399	0,177	0,064	0,127	0,295	0,161	0,582	0,184

Bezeichnungen: Lumen_d, Durchmesser des Lumens [mm]; NI_d, Neointimadurchmesser [mm]; Media_d, Mediadurchmesser [mm]; Lumen_A, Fläche des Lumens im Querschnitt [mm²]; NI_A, Fläche der Neointima i.Q. [mm²]; Media_A, Fläche der Media i.Q. [mm²]; Total_A, Gesamtfläche (Fläche innerhalb der äußeren Mediagrenze) [mm²]; Lumen_r, Radius des Lumens [mm].

Tabelle 4: Gefäßparameter der GFP-Kontrollgruppe, NaCl-Kontrolle und der Ad-IL1ra-Verumgruppe.

In der Gruppe der Verumtiere wurde nach Fogarty-Läsion die Arteria carotis communis links für 20 Minuten an beiden Enden unterbunden und Ad-IL1ra wurde in der Konzentration von

10^{10} - 10^{11} PFU/ml für 20 Minuten instilliert. Diese Tiere bildeten die Ad-IL1ra-Verumgruppe. Sie bestand aus 18 Tieren.

Die Ad-IL1ra-Verumgruppe zeigte gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe ein kleineres Lumen und eine ausgeprägtere Neointima. Das Lumen der Verumgruppe war mit 0,583 mm um 0,042 mm, also 6,72%, kleiner als das der NaCl-Kontrollgruppe mit 0,625 mm. Die Neointima der Verumgruppe ist mit 0,134 mm um 0,041 mm, also 44,09%, breiter als die Neointima der NaCl-Kontrollgruppe mit 0,093 mm.

Der Durchmesser der Media war in beiden Gruppen etwa gleich groß. In der NaCl-Kontrollgruppe betrug er 0,066 mm, in der Verumgruppe 0,067 mm. Die histopathologische Beurteilung ergab eine etwa gleich ausgeprägte mediale Zellaktivierung. Ähnlich fiel auch die Beurteilung des perivaskulären Infiltrats aus.

Nummer	Neointimales Infiltrat	Perivaskuläres Infiltrat	Mediazellaktivierung	Mediaruptur
L1825B	-	+	o	-
L1826B	-	o	o	-
L1827B	+	+	+	-
L1828B	-	-/o	o	-
L1829B	o	+	o	-
L1830B	+	+	o	-
L1831B	-	+	o	o
L1832B	+	+	o	-
L1833B	+	+	o	+
L1834B	o	o	o	-
L1835B	-	o	-	-
L1836B	-	+	o	-
L1837B	-	o	o	-
L1838B	o	+	o	-
L1839B	o	n.v.	o	-
L1840B	o	o	o	-
L1841B	-	o	-	-
L1843B	-	o	-	-

- nicht vorhanden
o vereinzelt
+ über die gesamte Fläche verteilt
n.v. nicht verwertbar

Tabelle 5: Histopathologische Beurteilung, Ad-IL1ra-Verumgruppe. Die Ausbildung einer Neointima fiel in der Ad-IL1ra-Gruppe unterschiedlich aus. In einigen Fällen war kein, in anderen Fällen geringes bis umfassendes neointimales Infiltrat zu sehen. Die perivaskuläre Infiltration fiel insgesamt mäßig bis deutlich aus. L1839B konnte perivaskulär nicht ausgewertet werden, da das perivaskuläre Gewebe fehlte. Eine Mediazellaktivierung fand in fast allen Zellen gemäßigt statt.

Die Tiere der GFP-Kontrollgruppe bekamen nach Fogarty-Läsion Ad-GFP in einer Konzentration von 10^{10} - 10^{11} PFU/ml 20 minütig instilliert und fungierten als

Kontrollvirengruppe gegenüber dem das Ad-IL1ra-tragende Ad-IL1ra-Virus. Die GFP-Kontrollgruppe bestand aus 3 Tieren. Ein Tier bekam AAV-GFP in der selben Konzentration instilliert.

Nummer	Neointimales Infiltrat	Perivaskuläres Infiltrat	Mediazell-aktivierung	Mediaruptur
AAV-GFP:				
L2611B	-	-/o	o	-
Ad-GFP:				
L2608B	o	+	o	-
L2609B	-	-/o	-/o	-
L2612B	o	o	o	-

- nicht vorhanden
o vereinzelt
+ über die gesamte Fläche verteilt

Tabelle 6: Histopathologische Beurteilung, GFP-Kontrollgruppe.

Lichtmikroskopisch unterscheiden sich die Schnitte der mit einem irrelevanten Protein instillierten Gefäße nicht von denen aus der Gruppe der IL1ra-Verumgruppe. Mediazellaktivierung und neointimales Infiltrat imponierten vergleichbar in beiden Gruppen. Vor allem perivaskuläres Infiltrat konnte in der Verumgruppe sogar noch häufiger nachgewiesen werden als in der GFP-Kontrollgruppe.

Die Tiere der GFP-Kontrollgruppe entwickelten eine Neointima von 0,177 mm Dicke (n=4) und einen luminalen Durchmesser von 0,399 mm. Ad-IL1ra (n=18) führte dagegen zu einer Neointimadicke von 0,134 mm und einem Lumendurchmesser von 0,583 mm. In der Ad-IL1ra-Verumgruppe war die Neointima gegenüber der GFP-Kontrollgruppe um 0,043 mm, also 24,3%, reduziert. Dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,137$), wobei auch die geringen Fallzahlen eine Rolle spielen.

In der Verumgruppe war das Lumen um 0,184 mm (31,6%) größer als in der GFP-Kontrollgruppe.

Auch bei der Betrachtung der Unterschiede zwischen der Neointima-Dicke der NaCl-Kontrollgruppe und der GFP-Kontrollgruppe ergibt sich keine statistische Signifikanz ($p=0,085$).

Der Mediadurchmesser betrug in der GFP-Gruppe 0,064 mm, in der Ad-IL1ra-Gruppe 0,067 mm. Dies entspricht einem Unterschied von 4,48%.

Bei der Betrachtung der Konfidenzintervalle zeigt sich zum einen ein relativ deutlicher Unterschied zwischen der Ad-IL1ra-Verumgruppe und der NaCl-Kontrollgruppe, die in sich relativ homogen sind. Zum anderen lässt sich in Abb. X erkennen, dass zwar die Mittelwerte der drei Gruppen deutlich auseinander liegen, jedoch die Streubreite der Ergebnisse in der GFP-Kontrollgruppe sehr groß ist. Es zeichnet sich jedoch die Tendenz ab, dass die Bereitschaft in der GFP-Gruppe, mit einer Neointimahyperplasie zu reagieren, deutlich erhöht ist.

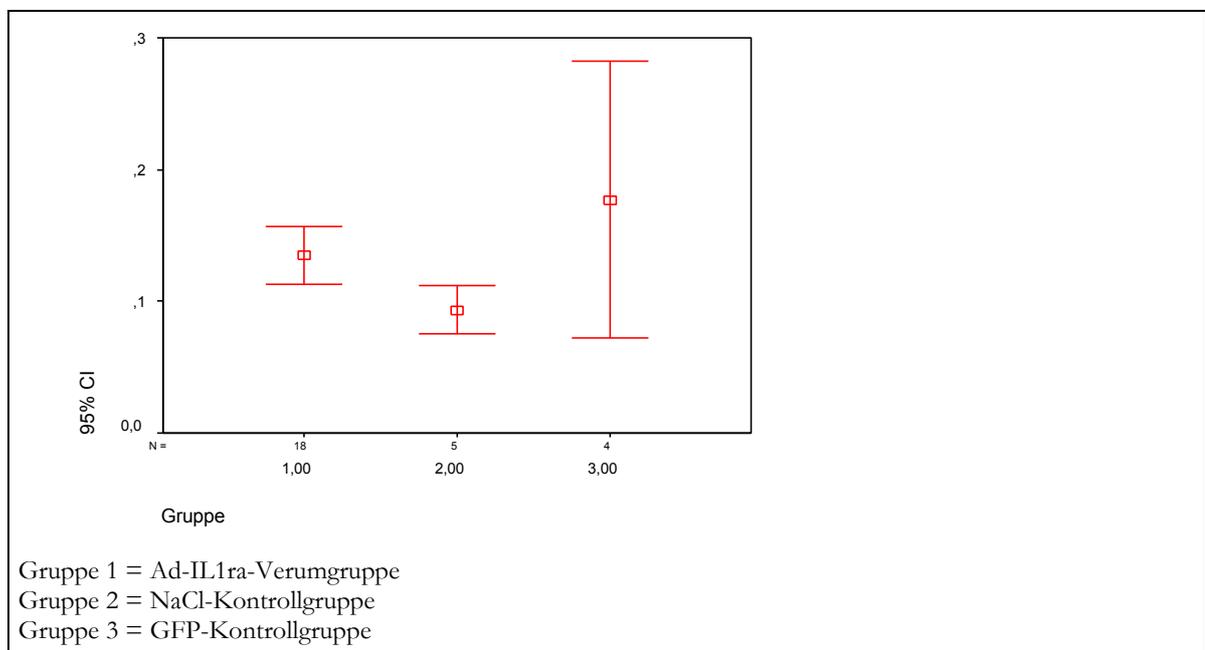


Abbildung 4: Kruskal-Wallis-Test: GFP-Kontrollgruppe, NaCl-Konrollgruppe und Ad-IL1ra-Verumgruppe, Neointimadurchmesser. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

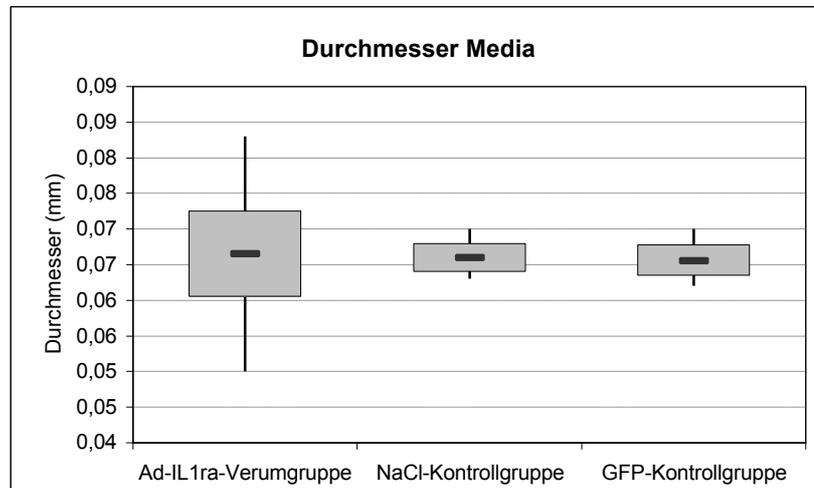


Abbildung 5: Vergleich Media-Durchmesser (mm) Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe, GFP-Kontrollgruppe. Die Mittelwerte der Gruppen sind annähernd gleich, wie in der Boxplot-Darstellung deutlich wird. In der Ad-IL1ra-Verumgruppe mit der größten Fallzahl (n=18) ist die Streubreite am größten.

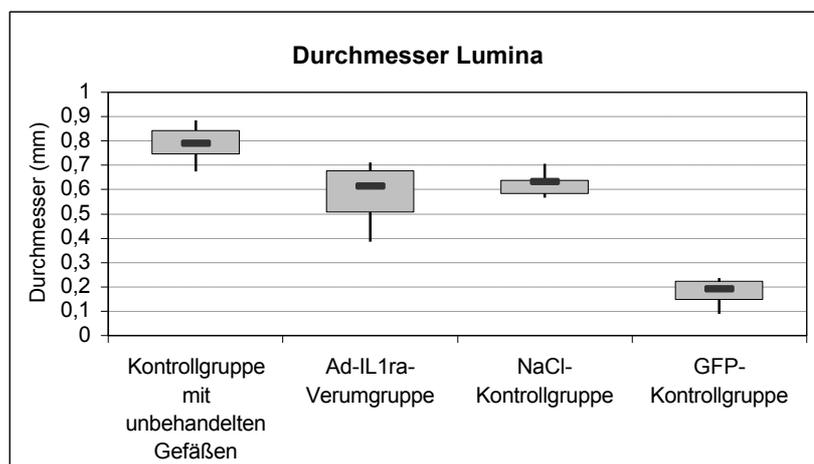


Abbildung 6: Vergleich Lumen-Durchmesser Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe, GFP-Kontrollgruppe und Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen. Auffällig ist das deutlich vergrößerte Lumen der Ad-IL1ra-Gruppe gegenüber der GFP-Kontrollgruppe. Die größten luminalen Durchmesser finden sich allerdings in der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.

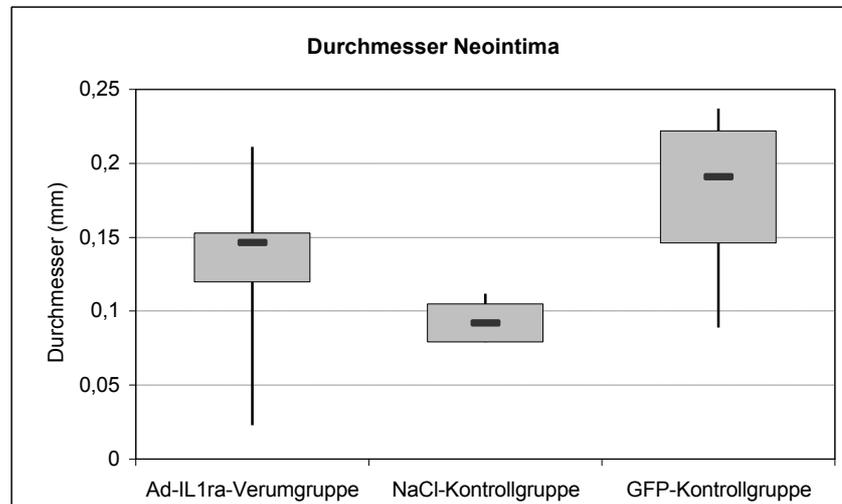
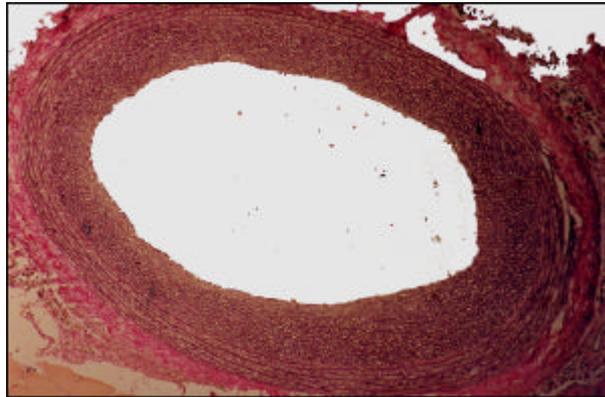
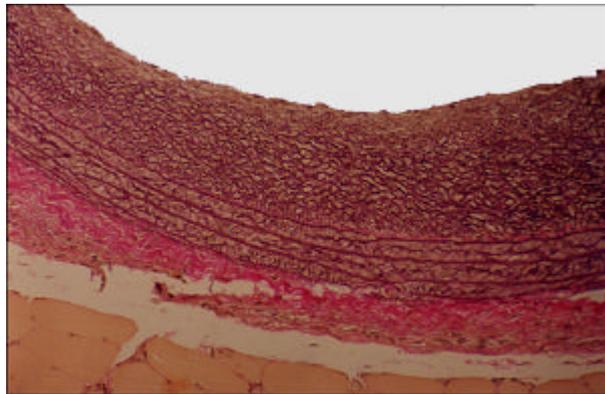


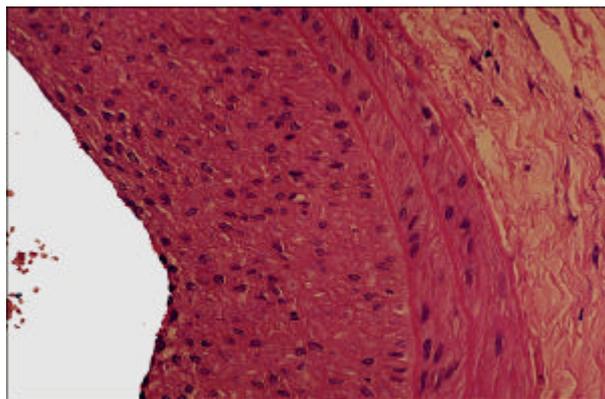
Abbildung 7: Vergleich Neointima-Durchmesser (mm) Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe und GFP-Kontrollgruppe. Die deutlichste Ausbildung einer Neointima konnte in der GFP-Kontrollgruppe gemessen werden (n=4). Die Neointima der mit Ad-IL1ra (n=18) instillierten Gefäße ist allerdings ausgeprägter als die der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe (n=5). Die Streubreite der Ergebnisse ist dabei in der Ad-IL1ra-Gruppe ebenso wie in der GFP-Kontrollgruppe relativ groß.



A. L1830B – Ad-IL1ra-Verumgruppe.
Originalvergrößerung $\times 10$, van Giesson

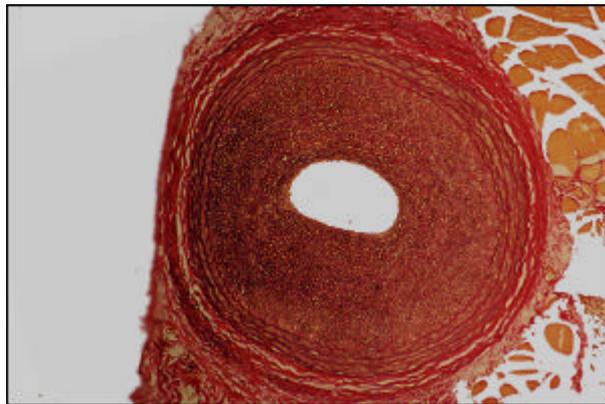


B. L1830B – Ad-IL1ra-Verumgruppe.
Originalvergrößerung $\times 20$, van Giesson

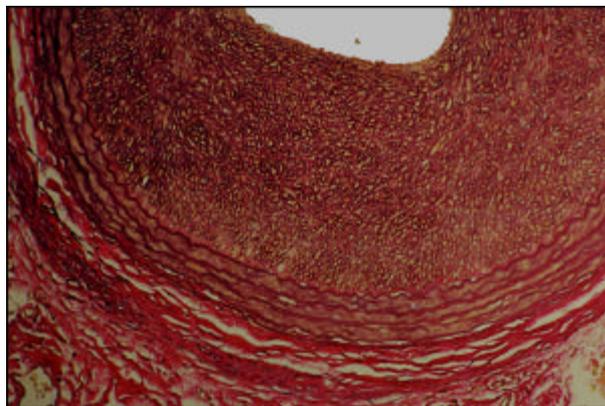


C. L1830B – Ad-IL1ra-Verumgruppe.
Originalvergrößerung $\times 40$, HE

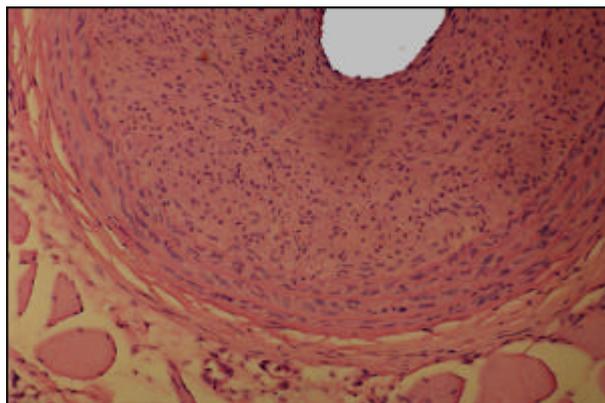
Abbildung 8: Gefäßsegment L1830B, Ad-IL1ra-Verumgruppe. Nach 14 Tagen ist deutlich die Proliferation der Intima zu erkennen. Die Adventitia ist teilweise fibrosiert (B.). Die Mediazellaktivität fällt gemäßigt aus. Das gezeigte Segment entspricht in seinen Werten annähernd den Durchschnittswerten.



A. Gefäßsegment L2608B - GFP-Kontrollgruppe
Originalvergrößerung $\times 10$, van Giesson



B. Gefäßsegment L2608B - GFP-Kontrollgruppe
Originalvergrößerung $\times 20$, van Giesson



C. Gefäßsegment L2608B - GFP-Kontrollgruppe
Originalvergrößerung $\times 20$, HE

Abbildung 9: Gefäßsegment L2608B, GFP-Kontrollgruppe. In diesem Segment aus der GFP-Kontrollgruppe zeigt sich die ausgeprägte Proliferation der Neointima deutlich. Die Adventitia scheint fibrosiert. Perivaskulär finden sich relativ wenige Entzündungszellen. Das Gefäß entspricht in etwa dem Durchschnittsbefund.

B. Intravenöse Gabe von rekombinantem IL-1ra

Name	Substrat	Lumen _d	NI _d	Media _d	Lumen _A	NI _A	Media _A	Total _A	Lumen _r
L.2616B	3x10 _{μg} rhn IL-1ra (14d)	0,397	0,156	0,059	0,124	0,272	0,141	0,537	0,199
L.2614B	3x15 _{μg} rhn IL-1ra (14d)	0,579	0,127	0,086	0,263	0,280	0,247	0,790	0,289
L.2615B	3x15 _{μg} rhn IL-1ra (14d)	0,547	0,095	0,061	0,235	0,193	0,153	0,581	0,274
	Durchschnitt	0,563	0,111	0,074	0,249	0,237	0,200	0,686	0,282
L.2466B	NaCl (14d)	0,638	0,092	0,066	0,320	0,211	0,183	0,714	0,319
L.2497A	NaCl (14d)	0,633	0,079	0,064	0,315	0,178	0,170	0,663	0,317
L.2498B	NaCl (14d)	0,567	0,105	0,070	0,252	0,220	0,187	0,659	0,283
L.2499B	NaCl (14d)	0,582	0,112	0,063	0,266	0,244	0,171	0,581	0,291
L.2501B	NaCl (14d)	0,705	0,079	0,068	0,390	0,193	0,199	0,786	0,352
	Durchschnitt	0,625	0,093	0,066	0,309	0,209	0,182	0,681	0,312
Bezeichnungen: Lumen _d , Durchmesser des Lumens [mm]; NI _d , Neointimadurchmesser [mm]; Media _d , Mediadurchmesser [mm]; Lumen _A , Fläche des Lumens im Querschnitt [mm ²]; NI _A , Fläche der Neointima i.Q. [mm ²]; Media _A , Fläche der Media i.Q. [mm ²]; Total _A , Gesamtfläche (Fläche innerhalb der äußeren Mediagrenze) [mm ²]; Lumen _r , Radius des Lumens [mm].									

Tabelle 7: Gefäßwandparameter der rhn-IL1ra-Gruppe. Die Tiere bekamen 30 min vor Fogarty-Läsion sowie 24 und 48 Stunden danach 10 μ g bzw. 15 μ g rhn-IL1ra i.v. verabreicht. Die Opferung erfolgte nach 14 Tagen (14d). Im Vergleich mit den Kontrolltieren ist der Lumendurchmesser der rhn-IL1ra-Gruppe um 9,92% kleiner und die Neointima 19,35% breiter. Auffällig ist die starke Stenose des Tieres mit weniger rhn-IL1ra.

Drei Tieren wurde sowohl 30 min vor Setzen der Fogarty-Läsion als auch 24, 48 und 72 Stunden danach rekombinantes IL-1ra (rhn-IL1ra) i.v. verabreicht (jeweils 0,03 mg/kg KG, n=2 und 0,02 mg/kg KG, n=1). Nach vierzehn Tagen wurden die Gefäße präpariert und anschließend gemessen.

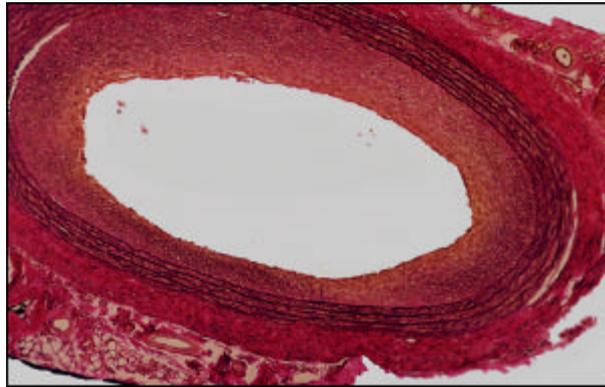
Im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe weisen die rhn-IL1ra-Tiere der Dosis $3 \times 15 \mu$ g rhn-IL1ra ein um 9,92% engeres Lumen auf. Die Intima ist im Durchschnitt um 19,35% verbreitert gegenüber der NaCl-Kontrolle.

Histologisch fällt bei allen Tieren eine mäßige Mediazellaktivierung und ein mäßiges perivaskuläres Infiltrat auf. Das Tier mit der 10 µg - Dosis war perivaskulär nicht beurteilbar, da kein umgebendes Gewebe im Schnitt zu sehen war.

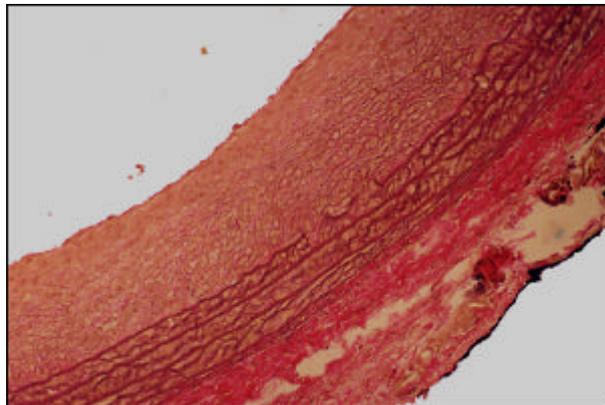
Nummer	Neointimales Infiltrat	Perivaskuläres Infiltrat	Mediazellaktivierung	Mediaruptur
Rhn-IL1ra, 10 µg				
L2616B	-	n.v.	o	-
Rhn-IL1ra, 15 µg				
L2614B	-	o	o	+
L2615B	-	o	o	-

- nicht vorhanden
o mäßig
+ deutlich
n.v. nicht verwertbar

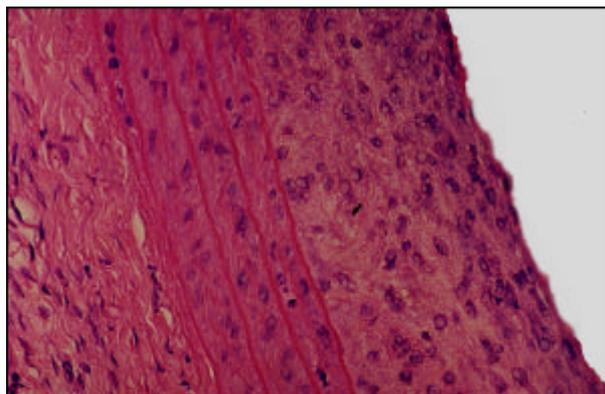
Tabelle 8: Histopathologische Beurteilung, rhn-IL1ra-Gruppe. In keinem der Schnitte konnte neointimales Infiltrat gesehen werden. Sowohl die perivaskuläre Infiltration als auch die Mediazellaktivierung fielen mäßig aus. Im Schnitt L2616B war kein perivaskuläres Gewebe zu sehen.



A. Gefäßsegment L2614B – rhn-IL1ra-Gruppe.
Originalvergrößerung $\times 10$, van Giesson



B. Gefäßsegment L2614B – rhn-IL1ra-Gruppe.
Originalvergrößerung $\times 20$, van Giesson



C. Gefäßsegment L2614B – rhn-IL1ra-Gruppe.
Originalvergrößerung $\times 40$, HE

Abbildung 10: Gefäßsegment L2614B, rhn-IL1ra-Gruppe. Auch hier zeigt sich eine Neointima. Perivaskulär scheinen sich einige Entzündungszellen zu befinden. In Bild B. sieht man die Verletzung der Media.

V. Diskussion

A. Hemmt die lokale Überexpression von IL-1ra in der Gefäßwand die Induktion neointimaler Proliferation nach Angioplastie?

Um die Effektivität von Gentransfer in verletzte Arteriensegmente und die Auswirkungen auf die neointimale Proliferation zu bewerten, wurde das Karotis-Verletzungsmodell der Ratte verwendet^{28, 29, 66}. In diesem Modell wird die Endothelschicht der linken Arterie carotis communis mit einem Ballon-Katheter entfernt und die Lamina elastica interna verletzt, ähnlich der Gefäßverletzung bei einer Stentimplantation. Die Läsion aktiviert glatte Muskelzellen, die nach zwei bis drei Tagen mit Migration und Proliferation reagieren und beginnen, eine Neointima auszubilden^{42, 122}. Das neointimale Wachstum endet in der Regel zwölf bis vierzehn Tage nach Verletzung^{32, 51}.

Das durch adenoviralen Gentransfer eingebrachte IL-1ra hat die Proliferation der Intima nicht verhindern können. Sowohl in der Kontrollgruppe der Ad-GFP-transfizierten Gefäße als auch in den durch Ad-IL1ra transfizierten Gefäßen ist die Hyperplasie ausgeprägter als in der NaCl-Kontrollgruppe.

Allerdings zeigen die Messergebnisse, dass ein anti-inflammatorischer Effekt von den transfizierten Gefäßzellen ausging. Die neointimale Proliferation der Gefäßwand reduzierte sich in den durch Ad-IL1ra transfizierten Gefäßen um 24,3% gegenüber den GFP-transduzierenden Adenoviren. Somit konnte IL-1ra die inflammatorische Reaktion abschwächen.

McCoy et al.⁷⁶ machten diesbezüglich andere Erfahrungen. Sie instillierten rekombinantes Adenovirus, das die cDNA für IL-1ra trug, endotracheal in die Lungen von Mäusen. Danach wurde dreißig Tage lang ihre bronchoalveoläre Lavage ausgewertet. Ad-IL1ra konnte die Zahl der inflammatorischen Zellen in der Lavage dabei nicht unter die durch ein Adenovirus mit

leerer Genkassette hervorgerufene Zellzahl senken. Ad-IL1ra konnte dabei dreißig Tage lang in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden.

Die Beurteilung der Histopathologie gibt jedoch keinen Hinweis auf diese These. In beiden Gruppen, Ad-IL1ra-Verumgruppe und GFP-Kontrollgruppe, war perivaskuläres und neointimales Infiltrat zu sehen. Auch die mediale Zellaktivierung gibt keinen Aufschluß darüber, denn in allen Gruppen - bis auf die Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen - war die Mediazellaktivierung zu sehen. Aufgrund der geringen Testzahl in der GFP-Kontrollgruppe von vier Tieren ist keine genaue Aussage darüber zu machen, ob sich in der GFP-Gruppe mehr Infiltrat bildete als in der Ad-IL1ra-Gruppe.

Einige andere Gruppen erreichten bereits in *in vivo* - Tiermodellen die Reduzierung der Neointima mittels adenoviralem Gentransfer. Die eingesetzten Transgene kodierten Zellzyklusinhibitoren^{49, 71, 79}, Suizidfaktoren^{86, 90} und Antagonisten von Migrations- und Wachstumsfaktoren^{23, 27, 53}.

Es stellt sich die Frage, warum es nicht zu einem deutlicheren anti-proliferativen Effekt gekommen ist. Dazu kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht.

B. Führt das Adenovirus selbst zu einer Entzündungsreaktion?

Es ist bereits länger bekannt, dass rekombinantes Adenovirus *in vitro* zelltoxisch ist^{88, 110}. Auch *in vivo* wurde ein schädigender Einfluß des Adenovirus auf die Zellen der Zellwand nachgewiesen.

Newman et al. wiesen eine Entzündung der Zellwand und die Aktivierung ihrer Zellen nach adenoviraler Transduktion mittels immunhistochemischer Färbungen auf ICAM-1, VCAM-1, MHC-II Antigen, Makrophagen und T-Zellen nach⁸⁴. ICAM-1, VCAM-1, MHC-II Antigen sind Marker der Zellaktivierung^{69, 106}. Die verwendeten Adenoviren waren AdV-LacZ und ein Adenovirus mit leerer Genkassette. Am zehnten Tag nach Transfektion waren bei beiden

Gruppen die Färbungen mit ICAM-1, VCAM-1 und T-Zellen stark positiv, sowohl in der Media als auch in der Neointima. Auch nach dreißig Tagen waren die Färbungen auf ICAM-1, VCAM-1 und T-Zellen noch stark positiv, in der Media ausgeprägter als in der Neointima⁸⁴.

Außerdem berichteten Newman et al. von einer sich deutlich ausbildenden Neointima. Diese Erfahrung machten auch wir, denn das Adenovirus Ad-GFP löste in der Gefäßwand im Vergleich zu den mit isotonischer Lösung (NaCl 0,09%) instillierten Gefäßabschnitten eine starke Reaktion und Proliferation aus. Morrisson et al.⁷⁸ dagegen berichteten nach adenoviraler Transfektion von einem 5/ β -Galaktase-Konstrukt in einer Konzentration von 2×10^9 PFU/ml in die Lungenalveolen von Schweinen von keiner sichtbaren Immunantwort. Sie beobachteten innerhalb von zehn Tagen weder einen Anstieg der inflammatorischen Zytokine, der Akute-Phase-Proteine oder eine Infiltration inflammatorischer Zellen in die Alveolarwand.

Bei hoher Dosierung ($\geq 2 \times 10^{11}$ PFU/ml) des Adenovirus wurde von Schulick et al. bei der Ratte eine komplette Denudation des Gefäßes beobachtet, wohingegen eine niedrigere Dosis ($\leq 10^{11}$ PFU/ml) keine Läsion des Gefäßes verursachte⁹⁷. Bei einer Dosierung von 10^{11} PFU/ml wurde außerdem ein mediales Infiltrat sowie der Verlust glatter Muskelzellen beobachtet⁹⁸. Nach Gentransfer eines Adenovirus mit leerer Genkassette im Kaninchenmodell wurden ein inflammatorisches Infiltrat in der Media, eine inadäquate Reaktion auf kontraktile Agonisten sowie der komplette Verlust endothelabhängiger Vasodilatation gesehen⁶¹. Channon et al. zeigten, dass innerhalb einer Stunde im Kaninchenmodell nach Infundierung eines infektiösen Titers von $\geq 4 \times 10^9$ PFU/ml endotheliale Aktivierung gesehen werden kann²⁴. Der Nachweis erfolgte über immunhistochemische Färbungen gegen ICAM-1 und VCAM-1. Ein inflammatorisches Infiltrat war nach sechs Stunden zu beobachten. *Ex vivo* inkubierte Arterien zeigten kein inflammatorisches Infiltrat.

In zu hohen Dosen verursacht das Adenovirus also eine Zellschädigung, wodurch zum einen die durch das therapeutische Instrument hervorgerufene Entzündungsreaktion verstärkt wird und zum anderen eine geringere Exprimierungsrate des Genprodukts durch die geschädigte Zelle erreicht wird. Um eine maximal erfolgreiche Transfektion ohne Zellschädigung zu erreichen, stellten Channon et al. ein Fenster zwischen $1 - 4 \times 10^9$ PFU/ml fest. Die von uns

eingesetzte Viruskonzentration lag bei 10^{10} bis 10^{11} PFU/ml. Unter Umständen war die Virus-Konzentration in unserem Versuch zu hoch und verursachte die geschilderten Zellschäden.

Wir konnten in unseren Schnitten perivaskuläres leukozytäres und makrophagenhaltiges Infiltrat sowohl in der Ad-IL1ra-Verumgruppe als auch in der GFP-Kontrollgruppe sehen. In der GFP-Kontrollgruppe, die allerdings nur aus vier Tieren bestand, war in einem Fall deutliches Infiltrat, in den anderen drei Fällen mäßiges bis geringes Infiltrat sichtbar.

Die Gefäße der Ad-IL1ra-Verumgruppe waren unterschiedlich stark von einer Infiltration der Neointima durch Entzündungszellen betroffen. In vier Fällen fiel sie deutlich, in weiteren fünf Fällen mäßig aus, die übrigen Gefäße waren frei. Perivaskulär sah man in neun Fällen deutlich ausgeprägtes, in sieben Fällen mäßig ausgeprägtes und in einem Fall geringes Infiltrat. Die Mediazellaktivierung fiel in fast allen Gefäßen mäßig aus.

Die von uns beobachtete Infiltration von Entzündungszellen deckt sich mit der Erfahrung anderer Gruppen. Zusätzlich beobachteten wir eine Verbreiterung der Media aller Gruppen gegenüber der Media in den unverletzten Gefäßen der Kontrollgruppe-rechts. Hier scheint allerdings kein Zusammenhang zu der viralen Infektion gegeben.

C. Ist die lokal erreichte IL-1ra-Konzentration ausreichend?

Die lokale IL-1ra Konzentration an der Stelle der Gefäßwandläsion blieb möglicherweise unter der wirksamen Konzentration des 100- bis 1000-fachen der Interleukin-1 β Konzentration^{6, 34, 108}.

In vitro konnte unsere Arbeitsgruppe in glatten Muskelzellen des Schweins (pSMC) die Transfektion des Ad-GFP-IL1ra-Virus, einem bizistronischen Vektor mit IL-1ra, zeigen. Dabei wurden in ELISA-Messungen IL-1ra-Werte von 3722 pg/ml gegenüber 34 pg/ml in nicht-transfizierte Zellen erreicht ($p = 0,009$); (nicht veröffentlichte Daten). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Transfektionsrate von etwa 80%.

Gegenüber nicht transfizierten Kontrollzellen wurde die Expression von IL-1ra in pSMC-Zellen nach 24 Stunden um den Faktor 109 gesteigert.

Von erfolgreicher Transduktion der Zellen der Gefäßwand mit Adenoviren wurde bereits berichtet. In einem primär endothelialen adenoviralen Gentransfer (Ad-LacZ) in gering verletzte Femoralarterien im Kaninchenmodell wurde am dritten Tag eine Infektionsrate von $36 \pm 6\%$ festgestellt. Von den transduzierten Zellen waren $75 \pm 29\%$ Endothelzellen und $25 \pm 28\%$ glatte Muskelzellen¹⁰⁰. Nach zehn Tagen war die Rate der transfizierten Endothel-Zellen gegen Null zurückgegangen, die Rate der transfizierten VSMC blieb jedoch längere Zeit relativ konstant. Erst nach dreißig Tagen konnten nur noch vereinzelt transduzierte VSCM und keine transduzierten Endothelzellen gefunden werden. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten, die ebenfalls nach vier Wochen keine Genexpressionen mehr feststellen konnten^{51, 65, 66, 104}.

Auch andere Gruppen zeigten die mögliche Transduktion glatter Muskelzellen^{50, 51, 62}. Guzman et al. (93) zeigten *in vitro* eine Infektionsrate glatter Muskelzellen mit $2,5 \times 10^7$ PFU/ml (Ad- β -gal) von 25% bei fünf Minuten Inkubationszeit und bis zu 70% bei einer Inkubationszeit von einer Stunde. Die Messung erfolgte nach 24 Stunden.

In vivo allerdings scheint die mögliche Transduktion glatter Muskelzellen, abhängig vom Zeitpunkt der Instillation nach Gefäßläsion, begrenzt. Im Ratten-Karotis-Modell zeigten Guzman et al., dass bei Instillation des Adenovirus ($0,5 - 1,0 \times 10^9$ PFU/ml) direkt nach Fogarty-Läsion nach drei Tagen nur 5% transduzierte Zellen nachweisbar sind. Mikroskopisch war zu diesem Zeitpunkt kein Endothellayer sichtbar. Es wurden fünf Segmente ausgewertet. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Instillation drei Tage nach Läsion erreicht. Erst bei Instillation sieben Tage nach Läsion wurde eine deutlich gesteigerte Transduktion sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt war fast die gesamte Oberfläche des Gefäßes mit Neointima bedeckt. Die Anzahl der transduzierten Zellen variierte drei Tage nach Instillation zwischen 10% und 75% bei drei ausgewerteten Segmenten.

Dies lässt darauf schließen, dass vor allem proliferierende Zellen durch das Virus transfiziert werden. In unserem Fall erfolgte die Instillation direkt nach De-Endothelialisierung durch den

Fogarty-Katheter. Zu diesem Zeitpunkt liegen noch keine proliferierenden Zellen vor. Möglicherweise wurde in unserem Versuch dadurch eine unzureichende Anzahl transduzierter Zellen erreicht.

Bisher wurde IL-1ra nur in Systemen des Körpers eingesetzt, in denen ein relativ träger Stoffwechsel herrscht. Antiinflammatorische Wirkung hatte rekombinantes oder adenoviral vermitteltes IL-1ra bis jetzt in Gelenkspalten^{6, 45, 72, 94} oder, endotracheal eingebracht, innerhalb der Alveolen der Lunge⁷⁸. In diesen Systemen kann die Konzentration an IL-1ra wesentlich länger konstant gehalten werden als in einem Blutgefäß.

Eine andere Möglichkeit ist, dass IL-1ra zu spät synthetisiert wurde. Es wurde gezeigt, dass Interleukin-1 β , das innerhalb zwei bis sechs Stunden nach Läsion des Gefäßes auftritt^{2, 111, 117}, die Interleukin-1 Rezeptoren hochregulieren kann¹¹⁷. Die IL-1ra Produktion der transduzierten Zellen erreicht dagegen ihr Maximum erst nach etwa zwei Tage⁹. Inzwischen wird jedoch aufgrund der hochregulierten Interleukin-1-Rezeptoren, die 100- bis 1000-fach affiner sind für Interleukin-1 β als IL-1ra^{32, 76}, deutlich mehr IL-1ra benötigt, um Interleukin-1 β zu antagonisieren. Zwar reagieren die glatten Muskelzellen der Media erst nach etwa drei bis vier Tagen mit Migration und Proliferation¹⁰⁷, aber unter Umständen ist der Stimulus, der diese Reaktion in Gang setzt, das anfangs wirkende Interleukin-1. Würde man autologe Zellen *ex vivo* transfizieren und nach 48 Stunden direkt nach Läsion in das Gefäß geben, könnte so dieses Problem möglicherweise umgangen werden. In einem ähnlichen Versuch konnten Ueno et al.¹⁰⁹ die erfolgreiche Expressierung und Wirkung des Basic Fibroblast Growth Factor zeigen.

D. Wird die neointimale Proliferation durch die intravenöse Applikation von rekombinantem sIL-1ra nach Angioplastie gehemmt?

Humanes rekombinantes IL-1ra wurde bereits *in vivo* auf eine antiinflammatorische Wirkung untersucht^{17, 48, 112, 119}. In Körperhöhlen, in denen keine Zirkulation herrscht, wie in der Gelenkhöhle oder in Alveolen, wurde ein antiinflammatorischer Effekt festgestellt. Beasley et

al. zeigten, dass *in vitro* IL-1ra antiproliferativ auf glatte Muskelzellen wirken kann¹¹. Beim Menschen wurde rekombinantes IL-1ra erfolgreich im Gelenkspalt eingesetzt^{15, 16}. Alexander et al. konnten die systemische Wirkung von rhn-IL1ra in Mäusen zeigen¹. Dabei wurden 5 × 25 mg/kg rhn-IL1ra im Zeitraum von vier Stunden intravenös verabreicht, um die Wirkung von 40 mg/kg LPS zu antagonisieren. Es stellte sich ein antiinflammatorischer, lebensverlängernder Effekt ein. Ohlsson et al. zeigten im Kaninchenmodell, dass IL-1ra die Wirkung von IL-1 β antagonisieren kann. Bei einer Gabe von 15 μ g/kg IL-1 β und 1 mg/kg rhn-IL1ra konnten signifikante Veränderungen bei Leukozytenzahl und Blutdruck festgestellt werden, noch deutlichere Ergebnisse wurden bei der Antagonisierung durch 4 mg/kg rhn-IL1ra sichtbar⁸⁵.

In unserem Versuch zeigte jedoch die intravenöse Applikation von rekombinatem IL-1ra keine Wirkung. Vermutlich war die applizierte Menge von viermalig 0,02 bzw. 0,03 mg/kg rhn-IL1ra über 72 Stunden verteilt noch zu gering, die durch die mechanische Verletzung provozierte, länger anhaltende IL-1 β -Freisetzung zu antagonisieren. Es wäre zu überlegen, ob eine Bolusgabe einer höheren Konzentration zu einem läsionsnahen Zeitpunkt (> 1 mg/kg bis zu zwei Stunden nach Läsion⁸⁵) einen Vorteil bringen würde.

VI. Zusammenfassung

Die Restenose nach koronarer Katheterbehandlung mit Stentimplantation ist eines der großen ungelösten Probleme der interventionellen Kardiologie. Die Restenose wird verursacht durch eine Neointimahyperplasie in Folge von Entzündungsprozessen ausgelöst durch die Gefäßwandverletzung. Im Rahmen dieser Entzündungsprozesse könnte Interleukin-1 eine zentrale Rolle spielen. Die vorliegende Doktorarbeit geht der Frage nach, ob im Tiermodell die Neointimahyperplasie nach Ballonverletzung der Gefäßwand durch lokale Überexpression des natürlichen Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann.

Die Versuche erfolgten am Carotis-Injury-Modell der Ratte. In diesem Modell wird in der Arteria carotis durch Fogarty-Ballon eine Gefäßläsion gesetzt, die innerhalb von 14 Tagen die Ausbildung einer Neointimahyperplasie bewirkt. Die lokale Überexpression von Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist wurde durch adenoviralen Gentransfer in einer Konzentration von 10^{10} - 10^{11} PFU erreicht. Als Kontrolle diente der adenovirale Gentransfer mit einem irrelevanten Protein (green fluorescent protein) sowie Instillation von physiologischer Kochsalzlösung ohne Viruspartikel. Primärer Endpunkt war die Dicke der Neointimahyperplasie nach 14 Tagen. Hierzu wurden die Tiere nach 14 Tagen geopfert, die Arteria carotis entnommen, fixiert und histomorphometrisch ausgewertet.

Die Neointimadicke betrug $0,134 \pm 0,04$ mm mit IL-1-Rezeptor-Antagonist transfizierten Ratten (n=18), $0,177 \pm 0,07$ mm mit green fluorescent protein transfizierten Ratten (n=4) sowie $0,093 \pm 0,01$ mm bei Gefäßwandverletzung ohne Behandlung mit Viruspartikeln (n=5). Auch wenn keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden wurden, so zeigte sich doch dem Trend nach, dass Transfektion mit IL-1-Rezeptor-Antagonist im Vergleich zur Transfektion mit einem irrelevanten Kontrollprotein zu einer etwas geringeren Neointimahyperplasie führt, dass jedoch die Neointimahyperplasie unter Kontrollbedingungen ohne Virusbehandlung nicht unterschritten wird. Dies deutet darauf hin, dass die Transfektion mit Adenoviren einen proinflammatorischen Effekt hat, der durch die Überexpression von IL-1-Rezeptor-Antagonist nur unzureichend gehemmt wird.

Möglicherweise sind die lokal erzielten Konzentrationen mit IL-1-Rezeptor-Antagonist zu gering.

Die Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass Interleukin-1 eine Rolle in der Entwicklung der Neointimahyperplasie spielt; sie lassen jedoch nicht erwarten, dass der adenovirale Gentransfer ein Ansatz zur Prävention der Neointimahyperplasie sein könnte.

VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Illustration des Gefäßaufbaus**Seite 9
- Abbildung 2: Gefäßsegment R2501B, Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen:** In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen wurde die rechte Arteria carotis communis entnommen, ohne dass zuvor das Gefäß verletzt wurde. Das dargestellte Segment entspricht in seinen Werten den Durchschnittswerten. Man sieht deutlich, dass die Intima einlagig der Media aufliegt. Es ist keine Aktivierung der Mediazellen zu erkennen.Seite 21
- Abbildung 3: Gefäßsegment L2499B, NaCl-Kontrollgruppe:** Das Gefäßsegment L2499B entspricht annähernd den Durchschnittswerten der NaCl-Kontrollgruppe. Man sieht die deutliche neointimale Proliferation. In der 40x Vergrößerung ist die mäßige Aktivierung der Media zu erkennen.Seite 22
- Abbildung 4: Kruskal-Wallis-Test:** GFP-Kontrollgruppe, NaCl-Konrollgruppe und Ad-IL1ra-Verumgruppe, Neointimadurchmesser. Dargestellt sind Mittelwert und Standartabweichung.Seite 26
- Abbildung 5: Vergleich Media-Durchmesser (mm) Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe, GFP-Kontrollgruppe:** Die Mittelwerte der Gruppen sind annähernd gleich, wie in der Boxplot-Darstellung deutlich wird. In der Ad-IL1ra-Verumgruppe mit der größten Fallzahl (n=18) ist die Streubreite am größten.Seite 27
- Abbildung 6: Vergleich Lumen-Durchmesser (mm) Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe, GFP-Kontrollgruppe und Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen:** Auffällig ist das deutlich vergrößerte Lumen der Ad-IL1ra-Gruppe gegenüber der GFP-Kontrollgruppe. Die größten luminalen Durchmesser finden sich allerdings in der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen.....Seite 27
- Abbildung 7: Vergleich Neointima-Durchmesser (mm) Ad-IL1ra-Verumgruppe, NaCl-Kontrollgruppe und GFP-Kontrollgruppe:** Die deutlichste Ausbildung einer Neointima konnte in der GFP-Kontrollgruppe gemessen werden (n=4). Die Neointima der mir Ad-IL1ra (n=18) instillierten Gefäße ist allerdings ausgeprägter als die der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe (n=5). Die Streubreite der Ergebnisse ist dabei in der Ad-IL1ra-Gruppe ebenso wie in der GFP-Kontrollgruppe relativ groß.Seite 28
- Abbildung 8: Gefäßsegment L1830B, Ad-IL1ra-Verumgruppe:** Nach 14 Tagen ist deutlich die Proliferation der Intima zu erkennen. Die Adventitia ist teilweise fibrosiert (B.). Die Mediazellaktivität fällt gemäßigt aus. Das gezeigte Segment entspricht in seinen Werten annähernd den Durchschnittswerten.Seite 29
- Abbildung 9: Gefäßsegment L2608B, GFP-Kontrollgruppe:** In diesem Segment aus der GFP-Kontrollgruppe zeigt sich die ausgeprägte Proliferation der Neointima deutlich. Die Adventitia scheint fibrosiert. Perivaskulär finden sich relativ wenige Entzündungszellen. Das Gefäß entspricht in etwa dem Durchschnittsbefund.Seite 30

-
- Abbildung 10: Gefäßsegment L2614B, rhn-IL1ra-Gruppe:** Auch hier zeigt sich eine Neointima. Perivaskulär scheinen sich einige Entzündungszellen zu befinden. In Bild B. sieht man die Verletzung der Media.Seite 33
- Tabelle 1: OP-Daten/Entnahmedaten.** In fünf Fällen wurde statt des B-Segments das distale A-Segment ausgewertet.Seite 16
- Tabelle 2: Gefäßparameter der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen sowie der NaCl-Kontrollgruppe.** In keinem der Gefäße der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen war eine neointimale Proliferation zu erkennen. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen waren 17 Tiere auswertbar, in der NaCl-Kontrollgruppe waren es fünf Tiere.Seite 18
- Tabelle 3: Histopathologische Beurteilung, Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen und NaCl-Kontrollgruppe.** In der NaCl-Kontrollgruppe war in einer der Gruppen ein entzündliches Infiltrat der Neointima zu sehen. Perivaskular dagegen war jedes Gefäß in unterschiedlicher Ausprägung betroffen. Eine mäßige bis starke Mediazellaktivierung war ebenfalls in jedem der Gefäße zu sehen. Die Media war nur im Gefäß L2496B rupturiert. In der Kontrollgruppe mit unbehandelten Gefäßen dagegen war in keinem der Gefäße ein Infiltrat, Mediazellaktivierung oder Mediaruptur zu sehen gewesen. Nur in einem Gefäß konnte ein geringes perivaskuläres Infiltrat gesehen werden.Seite 20
- Tabelle 4: Gefäßparameter der GFP-Kontrollgruppe, NaCl-Kontrolle und Ad-IL1ra-Verumgruppe.....**Seite 23
- Tabelle 5: Histopathologische Beurteilung, Ad-IL1ra-Verumgruppe.** Die Ausbildung einer Neointima fiel in der Ad-IL1ra-Gruppe unterschiedlich aus. In einigen Fällen war kein, in anderen Fällen geringes bis umfassendes neointimales Infiltrat zu sehen. Die perivaskuläre Infiltration fiel insgesamt mäßig bis deutlich aus. L1839B konnte perivaskulär nicht ausgewertet werden, da das perivaskuläre Gewebe fehlte. Eine Mediazellaktivierung fand in fast allen Zellen gemäßigt statt.Seite 24
- Tabelle 6: Histopathologische Beurteilung, GFP-Kontrollgruppe.**Seite 25
- Tabelle 7: Gefäßwandparameter der rhn-IL1ra-Gruppe.** Die Tiere bekamen 30 min vor Fogarty-Läsion sowie 24 und 48 Stunden danach 10 µg bzw. 15 µg rhn-IL1ra i.v. verabreicht. Die Opferung erfolgte nach 14 Tagen (14d). Im Vergleich mit den Kontrolltieren ist der Lumendurchmesser der rhn-IL1ra-Gruppe um 9,92% kleiner und die Neointima 19,35% breiter. Auffällig ist die starke Stenose des Tieres mit weniger rhn-IL1ra.Seite 31
- Tabelle 8: Histopathologische Beurteilung, rhn-IL1ra-Gruppe.** In keinem der Schnitte konnte neointimales Infiltrat gesehen werden. Sowohl die perivaskuläre Infiltration als auch die Mediazellaktivierung fielen mäßig aus. Im Schnitt L2616B war kein perivaskuläres Gewebe zu sehen.Seite 32

VIII. Literaturverzeichnis

- 1 Alexander HR, Doherty GM, Buresh CM, Venzon DJ, Norton JA: A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J Exp Med*; 1991. 173:1029-1032
- 2 Andersson J, Björk L, Dinarello CA, Towbin H, Andersson U: Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *European Journal of Immunology*; 1992. 22:2617-2623
- 3 Arend WP, Coll BP: Interaction of recombinant monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist with rheumatoid synovial cells. *Cytokine*; 1991. 3(5):407-13
- 4 Arend WP, Malyak M, Guthridge C, Gabay C: Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. *Annual Reviews of Immunology*; 1998. 16:27-55
- 5 Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP: Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist. *J Clin Invest*; 1990. 85:1694-97
- 6 Arend WP: Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol*; 1993. 54:167-227
- 7 Austin GE et al. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*; 1985. 6:369-375
- 8 Bakker AC, Joosten LAB, Arntz OJ, Helsen MMA, Bendale AM, van de Loo FAJ, van den Berg WB: Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum*; 1997. 40:893-900
- 9 Bandara G, Mueller GM, Galea-Lauri J, Tindal MH, Georgescu HI, Suckanek MK, Hung GL, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH: Intraarticular expression of biologically active interleukin-1 receptor antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993. 90:10764-68
- 10 Bauters C, Isner JM: The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis*; 1997. 40(2):107-16
- 11 Beasley D, McGuiggin ME, Dinarello CA: Human vascular smooth muscle cells produce an intracellular form of interleukin-1 receptor antagonist. *Am J Physiol*; 1995. 269(4 Pt 1):C961-8
- 12 Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA jr: Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol*; 1985. 121(3):394-403

-
- 13 Bonin PD, Fici GJ, Singh JP: Interleukin-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells in coordination with PDGF of a monocyte derived growth factor. *Exp Cell Res*; 1989. 181:475-82
 - 14 Bresnihan B, Cunnane G: Interleukin-1 receptor antagonist. *Rheumatic Disease Clinics of North America*; 1998 Aug. 24(3):615-28
 - 15 Bresnihan B: The prospect of treating rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Bio Drugs*; 2001. 15(2):87-97
 - 16 Bresnihan B: The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*; 2001. 30(5 Suppl 2):17-20
 - 17 Bugarski D, Jovic G, Kataranovski M, Ivanovic Z, Petakov M, Stojanovic N, Milenkovic P: Effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on endogenous interleukin-1 levels in normal and irradiated mice. *Physiol Res*; 2000. 49(3):355-62
 - 18 Bush D, Hoffman T, Del Rosario J, Eiriksson H, Rome JJ: Frequency of Restenosis after Balloon Pulmonary Arterioplasty and its Causes. *Am J Cardiol*; 2000. 86:1205-1209
 - 19 Califf RM: Restenosis: the cost to society. *Am Heart J*; 1995. 130:680-684
 - 20 Cartmell T, Luneshi GN, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Poole S: Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J Physiol*; 2001. 531(Pt 1):171-180
 - 21 Cavender DE, Haskard DO, Joseph B, Ziff M: Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J Immunol*; 1986. 136:203-7
 - 22 Chamberlain J, Gunn J, Francis S, Holt C, Crossman D: Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res*; 1999. 44(1):156-65
 - 23 Chang MW et al.: Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p12 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of coronary balloon angioplasty. *J Clin Invest*; 1995. 96:2260-2268
 - 24 Channon KM, Quian HS, Youngblood SA, Olmez E, Shetty GA, Neplioueva V, Blazing MA, George SE: Acute host-mediated endothelial injury after adenoviral gene transfer in normal rabbit arteries: impact on transgene expression and endothelial function. *Circ Res*; 1998. 82(12):1349-51
 - 25 Chensue SW, Bienkowski M, Eessalu TE, Warmington KS, Hershey SD, Lukacs NW: Endogenous IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. *J Immunol*; 1993. 151:3654-62
 - 26 Chevalier B, Glatt B, Royer T, Guyon P: Comparative results of short versus long stenting. *J Am Coll Cardiol*; 1997. 29(suppl A):415A

-
- 27 Claudio PP, Fratta L, Farina F, Howard CM, Stassi G, Numata S, Pacilio C, Davis A, Lavitrano M, Volpe M, Wilson JM, Trimarco B, Giordano A, Condorelli G: Adenoviral RB2/p130 gene transfer inhibits smooth muscle cell proliferation and prevents restenosis after angioplasty. *Circ Res*; 1999. 85:1032-1039
 - 28 Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*; 1983. 49:327-333
 - 29 Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest*; 1983. 49:208-215
 - 30 Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*; 1985. 56:139-145
 - 31 Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: The type II "decoy" receptor: a novel regulatory pathway or interleukin-1. *Immunology Today*; 1994. 15:562-566
 - 32 Creighton WM, Taylor AJ, Dichek DA, Dong G, Roberts AB, Schulick AH, Mannam P, Virmani R: Regional variability in the time course of TGF-beta 1 expression, cellular proliferation and extracellular matrix expansion following arterial injury. *Growth Factors*; 1997. 14(4):297-306
 - 33 Di Febbo C, Baccante G, Reale M, Castellani ML, Angelini A, Cucurullo F, Porreca E: Transforming growth factor beta 1 induces IL1ra production and gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*; 1998. 136:377-382
 - 34 Dinarello CA, Thompson RC: Blocking IL-1:interleukin-1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. *Immunology Today*; 1991. 19:404-410
 - 35 Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*; 1996. 87:2095-2147
 - 36 Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP: Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem*; 1991. 266:10331-10336
 - 37 Durante W, Schini VB, Kroll MH, Catovsky S, Scott-Burden T, White JG, Vanhoutte PM, Schafer AI: Platelets inhibit the reduction of nitric oxide synthesis by interleukin-1 beta in vascular smooth muscle cells. *Blood*; 1994. 83(7):1831-8
 - 38 Eisenstein SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*; 1990. 343:341-46
 - 39 Epstein FH: Cardiovascular disease epidemiology. A journey from the past into the future. *Circulation*; 1996. 93:1755-1764
 - 40 Evans CH, Robbins PD: The interleukin-1 receptor antagonist and its delivery by gene transfer. *Receptor*; 1994 Spring. 4(1):9-15

-
- 41 Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizzaro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F: Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest*; 1994. 94:449-453
 - 42 Fingerle J, Muller RM, Kuhn H, Pech M, Baumgartner HR: Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril. A study in balloon catheter-injured rat carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 1995. 15(11):1945-1950
 - 43 Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Nann I, et al.: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med*; 1994. 331:496-501
 - 44 Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris ND, Jeffrey S, Carter ND, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW, Crossman DC: Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*; 1999. 99:861-866
 - 45 Fukumoto T, Matsukawa A, Ohkawara S, Tagaki K, Yoshinaga M: Administration of neutralizing antibody against rabbit IL-1 receptor antagonist exacerbates lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res*; 1996. 45:479-85
 - 46 Gabay C, Gigley J, Sipe J, Arend WP, Fantuzzi G: Production of interleukin-1 receptor antagonist by hepatocytes is regulated as an acute-phase protein in vivo. *European Journal of Immunology*; 2001 Feb. 31(2): 490-499
 - 47 Granowitz EV, Santos AA, Poutsika DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM, Dinarello CA: Production of interleukin-1 receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet*; 1991. 338:1423
 - 48 Grehan S, Uhlar CM, Sim RB, Herbert J, Whitehead AS: Expression of a biologically active recombinant mouse IL-1 receptor antagonist and its use in vivo to modulate aspects of acute phase response. *J Immunol*; 1997. 159(1):369-78
 - 49 Gunn J, Holt CM, Francis SE, Sheperd L, Grohmann M, Newman CM, Crossman DC, Cumberland DC: The effect of oligonucleotides to c-myc on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty. *Circ Res*; 1997. 80:520-531
 - 50 Guzman RJ, Hirschowitz EA, Brody SL, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T: In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1994. 91:107320-36
 - 51 Guzman RJ, Lemarchand P, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T: Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima. *Circulation*; 1993 Dec. 88(6):2838-48
 - 52 Hancock WW, Adams DH, Wyner LR, Sayegh MH, Karnovsky MJ: CD4+ mononuclear cells induce cytokine expression, vascular smooth muscle cell proliferation, and arterial occlusion after endothelial injury. *Am J Pathol*; 1994. 145(5):1008-14

-
- 53 Hanna AK et al: Antisense basic fibroblast growth factor gene transfer reduces neointimal thickening after arterial injury. *J Vasc Surg*; 1997. 25:320-325
 - 54 Hannum CH, Wolcox DJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC: Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*; 1990. 343(6256):336-40
 - 55 Hasdai D, Scheinowitz M, Leibowitz E, Sclarovski S, Eldar M, Barak V: Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart*; 1996. 76:24-28
 - 56 Haskill S, Martin G, van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, Arend WP, Ralph P: cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1991. 88:3681-85
 - 57 Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D: Functions of interleukin-1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1996. 93:11008-13
 - 58 Ibelgaufs H: Dictionary of Cytokines. Weinheim/Germany, VCH Verlagsgesellschaft mbH
 - 59 Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Bottinger C, Duff GW, Schömig A: Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonists gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *Journal of the American College of Cardiology*; 2000 Dec. 36(7):2168-73
 - 60 Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM: Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Invest Med*; 1995. 43:28-38
 - 61 Lafont A, Loirand G, Pacaud P, Vilde F, Lemarchand P, Escande D: Vasomotor dysfunction early after exposure of normal rabbit arteries to an adenoviral vector. *Hum Gene Ther*; 1997. 8:1033-1040
 - 62 Lamfers MLM, Lardenoy JHP, de Vries MP, Aalders MC, Engelse MA, Grimbergen JM: In vivo suppression of restenosis in balloon-injured rat carotid artery by adenovirus-mediated gene transfer of the cell surface-directed plasmin inhibitor ATF.BPTI. *Gene Ther*; 2001. 8(7):534-41
 - 63 Lederer JA, Czuprynski CJ: Species-specific binding of IL-1, but not the IL-1 receptor antagonist, by fibroblasts. *Cytokine*; 1994. 6(2):154-61
 - 64 Lee RT, Briggs WH, Cheng GC, Rossiter HB, Libby P, Kupper T: Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 alpha and IL-1 receptor antagonist. *Journal of Immunology*; 1997 Nov 15. 159(10):5084-8
 - 65 Lee SW, Trapnell BC, Rade JJ, Virmani R, Dichek DA: In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res*; 1993. 73:797-807

-
- 66 Lemarchand P, Jones M, Yamada I, Crystal RG: In vivo gene transfer and expression in normal, uninjured blood vessels using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *Circ Res*; 1993. 72(5):1132-8
- 67 Lennard AC: Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit Rev Immunol*; 1995. 15:77-105
- 68 Libby P, Warner AJC Warner, Friedman GB: Interleukin-1: A Mitogen for Human Vascular Smooth Muscle Cells That Induces the Release of Growth-Inhibitory Prostanoids. *Journal of Clinical Investigations*; 1988 Feb. 81:487-498
- 69 Libby P, Li H: Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest*; 1993. 92:558-539
- 70 Loppnow H, Bil R, Hirt S, Schönbeck U, Herzberg M, Werdan K, Rietschel ET, Brandt E, Flad HD: Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood*; 1998 Jan 1; 91(1):134-141
- 71 Maillard L, Van Belle E, Smith RC, Le Roux A, Deneffe P, Steg G, Barry JJ, Branellec D, Isner JM Walsh K: Percutaneous delivery of the gax gene inhibits vessel stenosis in a rabbit model of balloon angioplasty. *Cardiovasc Res*; 1997. 35:536-546
- 72 Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, Anderle SK, Brown RR, Baldwin AS jr, Haskill JS, Schwab JH: Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1996. 93:402-406
- 73 Malyak M, Guthridge JM, Hance KR, Dower SK, Freed JH, Arend WP: Charakterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*; 1998. 161(4):1997-2003
- 74 Malyak M, Smith MF, Abel AA, Arend WP: Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol*; 1994. 14(1):20-30
- 75 Matsushima H, Roussel MF; Matsushima K, Hishinuma A, Sherr CJ: Cloning and expression of murine interleukin-1 receptor antagonist in macrophages stimulated by colony-stimulating factor 1. *Blood*; 1991. 78:616-23
- 76 McCoy RD, Davidson BL, Roessler BJ, Huffnagle GB, Simon RH: Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: effects on vector-induced inflammation. *Gene Ther*; 1995. 2(7):437-42
- 77 McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE; Wgnall JM, Jenkins NA, Brannan CI, et al.: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J*; 1991. 10(10):2821-32
- 78 Morrison D, Murtaugh M: Adenovirus-mediated expression of interleukin-1 receptor antagonist in swine cells in vitro and in vivo. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 2001. 78:71-81
-

-
- 79 Muller DW: The role of proto-oncogenes in coronary restenosis. *Prog Cardiovasc Dis*; 1997. 40:117-28
- 80 Muzio M, Polentarutti N, Facchetti F, Peri G, Doni A, Sironi M, Transidico P, Salmona M, Introna M, Mantovani A: Characterization of type II intracellular IL-1 receptor antagonist (IL-1ra): a depot IL-1ra. *Eur J Immunol*; 1999. 29(3):781-8
- 81 Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, de Giola L, Introna M, Mantovani A, Colotta F: Cloning and Characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J Exp Med*; 1995. 182:623-628
- 82 Narins CR, Holmes DR, Topol EJ: A call for provisional stenting. The balloon is back! *Circulation*; 1998. 97:1298-1305
- 83 Newman P, Kakkar VV, Kanse SM: Modulation of endothelin receptor expression in human vascular smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *FEBS Lett*; 1995. 363(1-2):161-4
- 84 Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schulick AH, Virmani R, Sukhova G, Libby P, Dichek DA: Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest*; 1995. 96(6):2955-65
- 85 Ohlsson K, Björk P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC: Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*; 1990. 348(6301):550-2.
- 86 Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG: Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*; 1994. 265:781-784
- 87 Otanis K, Nita I, Macaulay W, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH: Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol*; 1996. 156:3556-62
- 88 Pereira HG: A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses. *Virology*; 1958.6:601-611
- 89 Pietersma A, Kofflard M, de Wit LE, Stijnen T, Koster JF, Serruys PW, Sluiter W: Late lumen loss after coronary angioplasty is associated with the activation status of circulating phagocytes before treatment. *Circulation*; 1995. 91(5):1320-5
- 90 Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH: Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature Mol*; 1998. 4:222-227
- 91 Porreca E, Di Febbo C, Barbacane RC, Panara MR, Cuccurullo F, Conti P: Effect of interleukin-1 receptor antagonist on vascular smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis*; 1993. 99(1):71-8
-

-
- 92 Raines EW, Dower SK, Ross R: Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*; 1989. 243:393-6
 - 93 Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM, Hartman JW, Davidson BL: Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo. *J Clin Invest*; 1993. 92:1085-92
 - 94 Roessler BJ, Hartman JW, Vallance DK, Latta JM, Janich SL, Davidson BL: Inhibition of interleukin-1-induced effects in synoviocytes transduced with the human IL-1 receptor antagonist cDNA using an adenoviral vector. *Hum Gene Ther*; 1995. 6:307-16
 - 95 Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*; 1999. 138:S419-S420
 - 96 Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin-1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *Journal of Immunology*. 128:2177-2182
 - 97 Schulick AH, Dong G, Newman KD, Virmani R, Dichek DA: Endothelium-specific in vivo gene transfer. *Circ Res*; 1995. 77:475-485
 - 98 Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dichek DA: In vivo gene transfer into injured carotid arteries: optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation*; 1995. 91:2407-2414
 - 99 Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al.: A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*; 1994. 331(8):489-95
 - 100 Shingu M, Nobunaga M, Ezaki I, Yoshioka K: Recombinant human IL-1 beta and TNF-alpha stimulate production of IL-1 alpha and IL-1 beta by vascular smooth muscle cells and IL-1 alpha by vascular endothelial cells. *Life Sci*; 1991.49(3):241-6
 - 101 Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A: Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*; 1996. 97(3):769-76
 - 102 Shuck ME, Eessalu TE, Tracey DE, Bienkowski MJ: Cloning, heterologous expression and characterization of murine interleukin 1 receptor antagonist protein. *J Immunol*; 1991. 21:2775-80
 - 103 Smith JD, Breslow JL: The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med*; 1997. 242:99-109
 - 104 Steg PG, Feldman LJ, Scoazec JY, Tahlil O, Barry JJ, Boulechfar S, Ragot T, Isner JM, Perricaudet M: Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector. *Circulation*; 1994. 90:1648-1656
 - 105 Stylianou E, O'Neill LA, Rawlinson L, Edbrooke MR, Woo P, Saklatvala J: Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem*; 1992. 267(22):15836-41

-
- 106 Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P: Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation*; 1993. 88(4 Pt 1):1788-1803
- 107 Topol EJ: *The Biology of Restenosis (Chapter 92)*. Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia - New York., Lippincott-Raven Publishers; 1998:2465-2489
- 108 Turunen MP, Hiltunen MO, Ruponene M et al.: Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes. *Gene Ther*; 1999. 6:6-11
- 109 Ueno H et al.: Adenovirus-mediated transfer of a dominant-negative H-ras suppresses neointimal formation in balloon-injured arteries in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 1997. 17:898-904
- 110 Valentine RC, Pereira HG: Antigens and the structure of adenovirus. *J Mol Biol*; 1965. 13:13-20
- 111 Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin-4: interleukin-4 suppresses interleukin-1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1992. 89:4076
- 112 Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, De Luigi A, De Simoni MG, Sperk G, Andell-Jonsson S, Lundkvist J, Iverfeldt K, Bartfai T: Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocyte overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2000. 97:11534-11539
- 113 Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM, Berger AE: Transforming growth factor- β mediates IL-1 dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*; 1993. 150:3553
- 114 Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA: Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumour necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. *Journal of Clinical Investigations*; 1991. 87:1925-1935
- 115 Wang X, Feuerstein GZ, Clark RK, Yue TL: Enhanced leucocyte adhesion to interleukin-1 beta stimulated vascular smooth muscle cells is mainly through intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res*; 1994. 28(12):1808-14
- 116 Wang X, Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Feuerstein GZ, Ohlstein EH: Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ Res*; 1996. 78(2):322-8
- 117 Wang X, Romanic AM, Yue T, Feuerstein GZ, Ohlstein EH: Expression of Interleukin-1 β , Interleukin-1 receptor and Interleukin-1 Receptor Antagonist mRNA in Rat Carotid Artery after Balloon Angioplasty. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2000. 271:138-142
-

- 118 Watanabe N, Kobayashi Y: Selective release of a processed form of interleukin-1 α . *Cytokine*; 1994. 6:597-601
- 119 Yamada J, Zhu SN, Streitlein JW, Dana MR: Interleukin-1 receptor antagonist therapy and induction of anterior chamber-associated immune deviation-type tolerance after corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 2000. 41(13):4203-8
- 120 Yue TL, Wang XK, Olson B, Feuerstein G: Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induces transforming growth factor-beta, (TGF-beta 1) production by rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 1994. 204(3):1186-92
- 121 Zahedi KA, Seldin MF, Rits M, Ezekowitz RAB, Whitehead AS: Mouse IL-1 receptor antagonist protein. Molecular characterization, gene mapping, and expression of mRNA in vitro and in vivo. *J Immunol*; 1991. 146:4228-33
- 122 Zeymer U, Fishbein MC, Forrester JS, Cercek B: Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry in rat aorta after balloon denudation. Comparison with thymidine and bromodeoxyuridine labeling. *Am J Pathol*; 1992. 141(3):685-690

IX. Lebenslauf

CHRISTINE NINA BERGER, * 14. JULI 1976 (MÜNCHEN)

AUSBILDUNG

- 1995* **Ernst-Mach-Gymnasium Haar, München**
Abitur in den Fächern Deutsch, Biologie, Geschichte, Latein.
- Sept 1995 - April 1996* **Schwanthaler Kunstschule, München**
- April 1996 - Nov 1996* **Ludwig-Maximilians-Universität, München**
Neuere und neueste Geschichte
- Nov 1996 - Juli 2001* **Technische Universität München**
Vorklinik
Physikum 19. August 1998
Klinik
1. Staatsexamen 31. August 1999
2. Staatsexamen 19. März 2002
3. Staatsexamen 8. Mai 2003

MEDIZINISCHE ARBEITSERFAHRUNG

- April 1999* **Dr. Dirk Feike, Facharzt für Neurologie und Psychiatrie, München**
Famulatur
- Sept - Okt 1999* **Klinikum Rechts der Isar/München, I. Medizinische Klinik**
Famulatur
- März 2000* **Deutsches Herzzentrum München, Kinderkardiologische Station**
Famulatur

- September 2000* **Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein/München, Chirurgische Station**
Famulatur
- Nov - Dez 2001* **Johns Hopkins Hospital, Baltimore/Maryland**
Wissenschaftliche Mitarbeit
- April - Juni 2002* **University of the Witwatersrand, Johannesburg/Südafrika, Department of Paediatrics**
Praktisches Jahr
- Juni - August 2002* **Krankenhaus München-Schwabing, Kinderklinik**
Praktisches Jahr
- August - Dez 2002* **Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München/Innere Abteilung**
Praktisches Jahr
- Dez - März 2003* **Inselspital Bern/Schweiz, Kinderchirurgische Abteilung**
Praktisches Jahr
- Juli 2003 - Dez 2004* **Kinderorthopädische Klinik Aschau**
Ärztin im Praktikum

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei folgenden Personen für das Gelingen dieser Arbeit bedanken:

Ich danke Prof. F.-J. Neumann für sein Vertrauen sowie die interessanten Erfahrungen, die ich im Rahmen dieser Arbeit sammeln durfte. Ich danke Frau Dr. Ute Sandler für ihre kompetente und ausdauernde Betreuung. Bei den Assistentinnen des Experimentellen Labors des Deutschen Herzzentrum München möchte ich mich sehr herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die humorvolle Zusammenarbeit bedanken, die über einige schwere Stunden hinweggeholfen.

Vor allem möchte ich mich aber bei meiner Mutter bedanken, die leider die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erleben durfte. Ihre vielen kleinen und großen Weisheiten waren und sind mir ständige und liebe Begleiter.

Meinem Vater danke ich für sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und seine zweite Chance.

Meiner lieben Schwester Nora danke ich als bester Freundin.

Meiner Oma danke ich für die kompetente Durchsicht der Arbeit und für viele nette Nachmittage.

In alphabetischer Reihenfolge möchte ich Karin Andres, Tina Dalary, Judith Hübner und Barbara Zauner danken, für 14 Jahre Freundschaft.

Herrn Rainer Mörike danke ich unter anderem für die beständige Mutzusprache, dass auch diese Arbeit einmal zum Schluss kommen würde.

Ende