

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen  
Lehrbereich Physiologie I  
Direktor: Professor Dr. E. Betz

**Kultivierung von Zellen  
aus Atheromen des Menschen und die  
Beeinflussung ihres Wachstums**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
(Theoretische Medizin)  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
DR. MED. UNIV. RAINER VOISARD  
aus Augsburg

1992

Dekan: Professor Dr. med. H.-D. Wehner  
1. Berichterstatter: Professor Dr. med. E. Betz  
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. K. R. Karsch

---

gedruckt 1992 bei Hans-Joachim Köhler, Druck & Reprografie, Tübingen

## INHALTSVERZEICHNIS

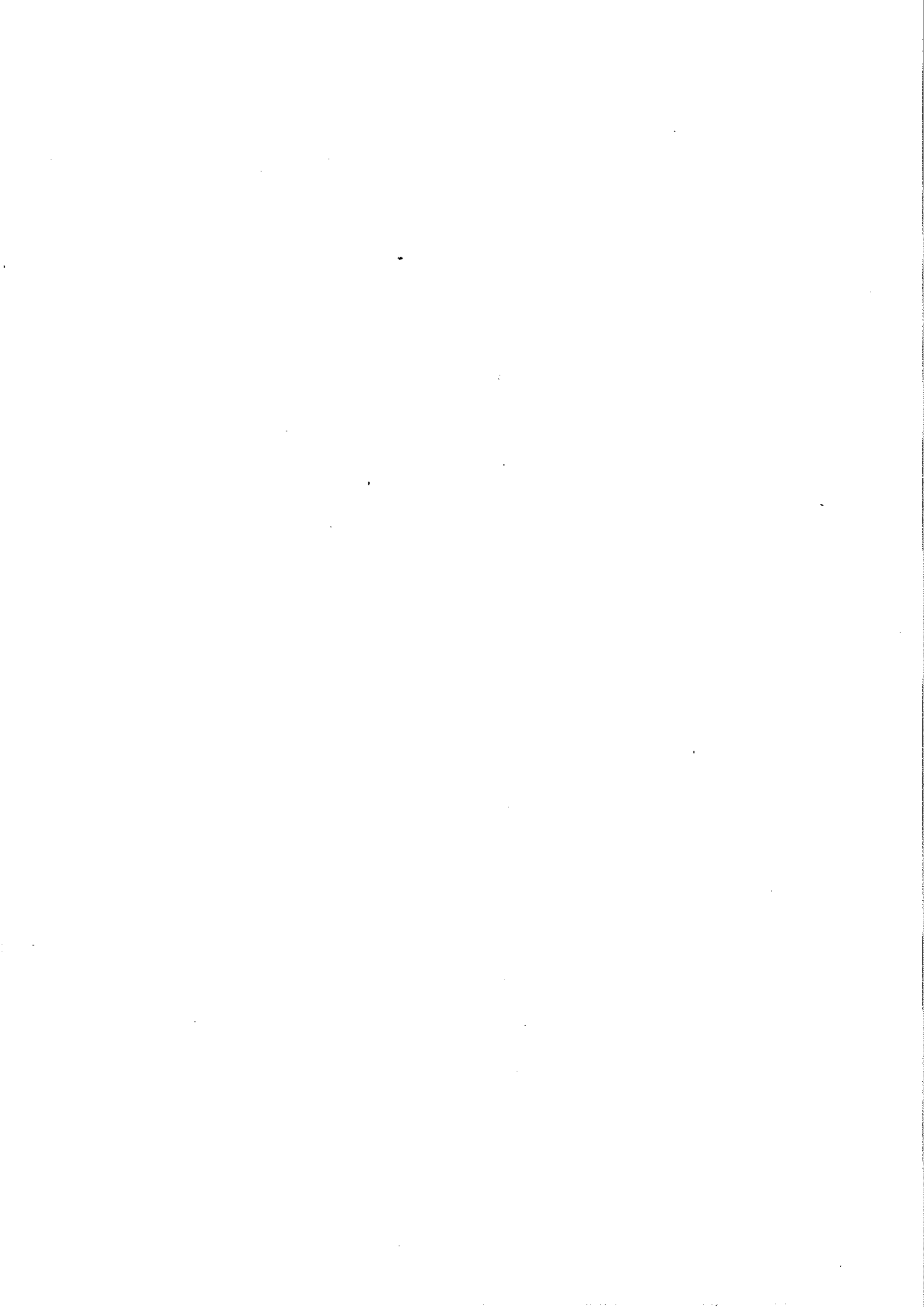
<b>A. Einleitung</b> .....	1
1. Der Aufbau der Gefäßwand .....	1
2. Die Pathogenese der Atherosklerose .....	2
3. Rekanalisierungstechniken .....	4
4. Kultivierung von Zellen aus atherosklerotischen Plaques .....	4
5. Die Thematik der vorliegenden Arbeit .....	5
<b>B. Material</b> .....	7
1. Zellkultur .....	7
1.1. Zellausgangsmaterial .....	7
1.2. Kulturmedien und Seren .....	7
1.3. Temperatur, Begasung und pH-Wert .....	8
1.4. Pufferlösungen .....	9
1.5. Enzymlösungen .....	9
1.6. Adhäsions- und Wachstumsfaktoren .....	10
1.7. Testsubstanzen .....	11
1.8. Kulturgefäße .....	12
2. Zytologie und Immunologie .....	12
2.1. Fixative und Permeabilisierungslösungen .....	12
2.2. Pufferlösungen .....	12
2.3. Farbstoffe und Färbelösungen .....	13
2.4. Erstantikörper (primäre Antikörper) .....	13
2.5. Zweitantikörper (sekundäre Antikörper) und Färbereagenzien .....	14
2.7. Einbettungsmedium .....	14
3. Mikroskopie und Mikrofotographie .....	14
<b>C. Methoden</b> .....	16
1. Etablierung von Primärkulturen .....	16
1.1. Plaquezellen .....	16
1.1.1. Feuchtgewichtbestimmung des Plaquematerials .....	16
1.1.2. Zellisolierung .....	16
1.2. Glatte Muskelzellen aus der Media .....	16

1.3. Endothelzellen .....	17
1.4. Fibroblasten .....	18
<b>2. Routinekultivierung .....</b>	<b>18</b>
2.1. Routinekultivierungstechnik .....	18
2.2. Adhäsionsfaktoren .....	18
2.3. Konditionierte Medien .....	19
2.4. Kryolagerung der Zellen .....	19
<b>3. Zellkultur-Testsysteme .....</b>	<b>20</b>
3.1. Populationsdynamik und Zellstatus .....	20
3.2. Klonkulturen und Klonierungseffizienz .....	22
3.3. Zellmigrationstest .....	22
3.4. Zytotoxizitätstest .....	23
3.5. Deckglaskulturen .....	23
<b>4. Zytologische Färbungen .....</b>	<b>23</b>
4.1. Giemsa-Färbung .....	24
4.2. Coomassie-Giemsa-Färbung .....	24
4.3. Fluorchromierung der DNA .....	24
<b>5. Indirekte Immunfluoreszenztechnik .....</b>	<b>25</b>
5.1. Antigen-Darstellung in kultivierten Zellen .....	25
5.1.1. Fixierung und Permeabilisierung .....	25
5.1.2. Methodik .....	26
<b>D. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>1. Kultivierung von Plaquezellen des Menschen .....</b>	<b>27</b>
1.1. Plaqueextraktion .....	27
1.1.1. Simpson-Katheter (p-SAC) .....	27
1.1.2. Thrombendarterektomie (OP) .....	28
1.2. Aufarbeitung des Plaquematerials .....	33
1.2.1. Explantat-Technik .....	33
1.2.2. Enzymatische Dissaggregation .....	33
1.3. Identifizierung der Zellen und Zytoskelett-Darstellung .....	35
1.4. Morphologie der Plaquezellen .....	39
1.5. Klonierungseffizienz .....	40

1.6. Wachstumsverhalten der Plaquezellen .....	41
1.6.1. Zellgrößenverteilung .....	41
1.6.2. Proliferative Effizienz .....	43
1.6.3. Wachstumsraten .....	44
1.7. Migrationsverhalten der Plaquezellen .....	50
1.7.1. Migration pro mm Wundrandlänge .....	50
1.7.2. Migrationsgeschwindigkeit .....	51
2. Einflüsse auf das Wachstumsverhalten von Plaquezellen .....	51
2.1. Adhäsionsfaktoren .....	51
2.2. Serumkonzentrationen .....	53
2.3. Konditionierte Medien .....	55
2.4. ECGF und PDGF .....	57
3. Medikamenten-Testungen .....	59
3.1. Thrombocytenaggregationshemmer .....	59
3.1.1. Acetylsalicylsäure (ASS) .....	59
3.1.1.1. Wirkung von ASS auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	60
3.1.1.2. Wirkung von ASS auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen .....	60
3.1.1.3. Wirkung von ASS auf Plaquezellen aus Primär- und Restenosen (Dosis-Wirkungskurve) .....	60
3.1.1.4. Wirkung von ASS auf die Migration von Plaquezellen .....	60
3.1.1.4.1. Zellmigration pro mm Wundrandlänge	60
3.1.1.4.2. Migrationsgeschwindigkeit .....	63
3.1.1.5. Wirkung von ASS auf die Migration und Prolifer- ation von Plaquezellen (Dosis-Wirkungskurve)	63
3.1.1.6. Wirkung von ASS auf den pH-Wert der Kulturen	65
3.1.2. Dipyridamol (DPD) .....	65
3.1.2.1. Wirkung von DPD auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	67
3.1.2.2. Wirkung von DPD auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen .....	67
3.1.2.3. Wirkung von DPD auf die Migration von Plaque- zellen .....	69

3.1.2.3.1. Zellmigration pro mm Wundrandlänge	69
3.1.2.3.2. Migrationsgeschwindigkeit .....	69
3.1.2.4. Wirkung von DPD auf die Migration und Proliferation von Plaquezellen (Dosis-Wirkungskurve)	69
3.1.3. Kombination von Acetylsalicylsäure (ASS) und Dipyridamol (DPD) .....	72
3.1.3.1. Wirkung von ASS und DPD auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	72
3.1.3.2. Wirkung von ASS und DPD auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen .....	72
3.2. Fibrinolytika .....	73
3.2.1. Streptokinase (SK) .....	73
3.2.1.1. Wirkung von SK auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	73
3.2.1.2. Wirkung von SK auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen .....	73
3.2.2. Urokinase (UK) .....	73
3.2.2.1. Wirkung von UK auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	75
3.2.2.2. Wirkung von UK auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen .....	75
3.2.3. Rekombinierter Plasminogen human-Aktivator (t-PA)	75
3.2.3.1. Wirkung von t-PA auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand .....	75
3.2.3.2. Wirkung von t-PA auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen .....	78
3.3. Beta-Blocker .....	78
3.3.1. Propranolol (PRO) .....	78
3.3.1.1. Wirkung von PRO auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen .....	78
3.3.1.2. Wirkung von PRO auf Plaquezellen aus koronaren Stenosen .....	78
3.4. Calciumantagonisten .....	80
3.4.1. Diltiazem (DIL) .....	80
3.4.1.1. Wirkung von DIL auf primär-stenosierende Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen	80

3.4.1.2. Wirkung von DIL auf re-stenosierende Plaquezellen aus peripheren Stenosen .....	80
E. Diskussion .....	83
1. Kultivierung von Plaquezellen des Menschen .....	83
2. Einflüsse auf das Wachstumsverhalten .....	87
3. Medikamenten-Testungen .....	89
3.1. Thrombozytenaggregationshemmer .....	91
3.2. Fibrinolytika .....	93
3.3. $\beta$ -Rezeptoren-Blocker .....	95
3.4. Calciumantagonisten .....	96
4. Eine mögliche Rolle der Zellkulturtechnik in der Atheroskleroseforschung .....	97
F. Zusammenfassung .....	99
G. Literaturverzeichnis .....	102
H. Abkürzungen .....	130





## A. Einleitung

Die Atherosklerose wird wegen ihres oft jahrelangen symptomlosen Verlaufs bezüglich ihrer Gefährlichkeit in der Regel unterschätzt. Aus der Mortalitätsstatistik der Bundesrepublik Deutschland von 1984 geht hervor, daß über 53% der Todesfälle durch Herz- und Kreislauferkrankungen verursacht wurden. Die Grundkrankheit war in den meisten Fällen eine Atherosklerose. Definitionsgemäß versteht man laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) unter dem Begriff "Atherosklerose" eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Durch die zunehmende Gefäßverengung wird die Blutversorgung distal des betroffenen Abschnittes eingeschränkt oder gänzlich unterbunden. Falls z.B. Herzkranzgefäße oder hirnersorgende Gefäße betroffen sind, können lebensbedrohliche klinische Konsequenzen wie Myokardinfarkt bzw. cerebrale Durchblutungsstörungen resultieren.

### 1. Der Aufbau der Gefäßwand

Die entscheidenden Vorgänge bei der Atherogenese finden in der mittleren und inneren Gefäßschicht statt, die von innen nach außen aus 3 Schichten besteht [10,11,37,69,120,153,155,187]: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia, kurz Intima, Media und Adventitia genannt. Die Intima regelt den Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausch aus dem Blut in die Gefäßwand und besteht aus einer einlagigen Schicht von Endothelzellen (EC) und einem darunterliegenden subendothelialen Raum. Dieser ist in manchen Gefäßabschnitten zellfrei. Durch eine elastische Membran, die Lamina elastica interna, grenzt sie sich von der Media ab. Die Media besteht aus Lagen helical verlaufender glatter Muskelzellen (SMC) und gefensterten elastischen Membranen, die zusammen ein elastisch-muskulöses System bilden und für die Regulierung der Gefäßspannung zuständig sind. Die äußerste Schicht, die Adventitia, besteht aus lockerem Bindegewebe und dient dem Einbau der Blutgefäße in die Umgebung; durch sie verlaufen Nerven, Lymphbahnen und Vasa vasorum.

## 2. Die Pathogenese der Atherosklerose

Der Entstehung der Arteriosklerose liegt ein multifaktorielles Ursachengefüge zugrunde [94,95,96,162,170,231]. Epidemiologische, biochemische und zellbiologische Untersuchungen konnten zeigen, daß die wichtigsten atherogenen Risikofaktoren Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus und der arterieller Hochdruck sind. Wenn es nicht gelingt, die Risikofaktoren durch Umstellung der Lebensgewohnheiten, medikamentöse Therapie oder spezielle apparative Techniken [102] zu reduzieren, entwickelt sich bei einer großen Zahl der Betroffenen eine atherosklerotische Gefäßerkrankung. Die strukturellen und funktionellen Veränderungen der Gefäßwand bei diesem Prozeß sind mannigfaltig [15,26,94,136,160,162,173]. Über die eigentlichen Vorgänge bei der Atherogenese gibt es zahlreiche Theorien [8,9,96,128,136,139,160,161,162,163,176]. Wie von Betz et al. zusammengefasst [15], dürften jedoch folgende Prozesse das Geschehen bestimmen:

- Permeabilitätszunahme des Endothels für Makromoleküle aus der Blutbahn und dadurch direkter Einstrom dieser Makromoleküle in den subendothelialen Raum und zwischen die Muskelzellen der Media
- Modulation der normalen (kontraktilen) SMC aus der Media zu metabolisch aktivierten SMC [186,191]
- Einwanderung (Migration) der aktivierten Zellen aus der Media in die Intima
- Migration von weißen Blutzellen in die Intima
- Vermehrung (Proliferation) der eingewanderten SMC innerhalb der Intima durch Zellteilung
- Produktion von Matrixmaterial durch die in die Intima gewanderten Zellen (SMC)
- Aufnahme von Lipiden durch die im subendothelialen Raum liegenden Zellen
- Absterben von Zellen mit Nekrose der zentralen Regionen der Plaque nach Erreichen einer bestimmten Größe
- Ablagerung von Calcium in die nekrotisierten Regionen und Calcium-Mineralisierung von kollagenen und elastischen Lamellen und kollagenen Fasern in der Gefäßwand

Von diesen zahlreichen Vorgängen wird übereinstimmend die Migration und Proliferation der SMC aus der Media in den subendothelialen Raum (Abb. 2) als die entscheidende gefäßverengende Komponente in der Frühphase der Atherogenese

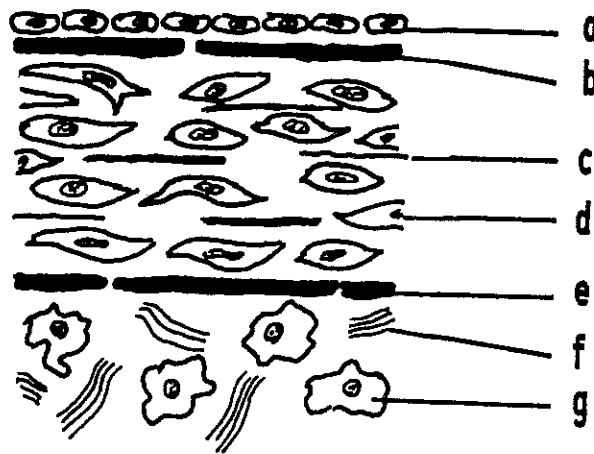


Abb. 1: Darstellung des dreischichtigen Gefäßwandaufbaues: a = Endothelzellschicht, b = Lamina elastica interna, c = elastische Lamellen, d = glatte Muskelzelle, e = Lamina elastica externa, f = Kollagenbündel, g = Fibroblast/Fibrozyt.

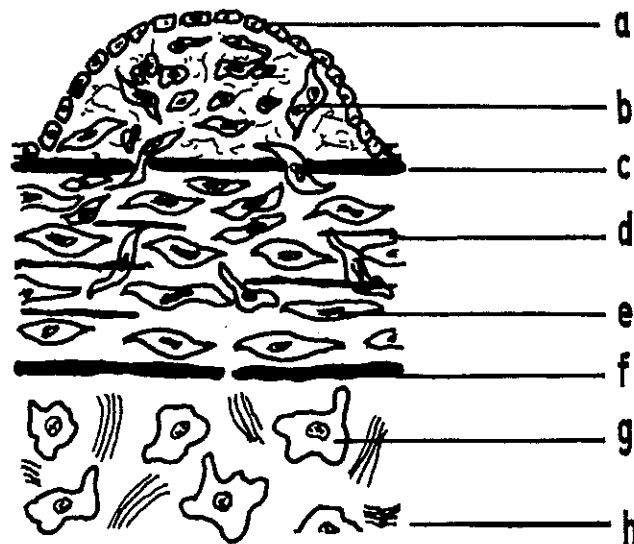


Abb. 2: Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen (e) aus der Media in den subendothelialen Raum (b). a = Endothelzellen, c = Lamina elastica interna, d = elastische Lamellen, f = Lamina elastica externa, g = Fibroblast/Fibrocyt, h = Kollagenbündel

beurteilt [26,83, 95,96,97,161,171,175,230]. Die normale Funktion der SMC in der Gefäßwand besteht in der Regulation der Gefäßwandspannung durch abgestufte Kontraktion [24]. Die SMC in der Intima besitzen jedoch einen anderen Phänotyp als die SMC in der Media [26,27,135,152]. Ausgelöst durch atherogene Reize verwandeln sich die kontraktilen SMC der Gefäßwand in metabolisch aktivierte SMC.

### **3. Rekanalisierungstechniken**

Da die Atherosklerose jahrzehntelang symptomlos verlaufen kann, liegen beim Auftreten der ersten Beschwerden oftmals bereits beträchtliche Gefäßeinengungen (Stenosen) vor. Neben den etablierten operativen Techniken, bei denen das verengte Gefäß durch eine Prothese ersetzt oder das stenosierte Segment durch einen Bypass umgangen wird, besteht seit Anfang der siebziger Jahre durch die Entwicklung der perkutanen transluminalen Angioplastie durch Grüntzig eine alternative Behandlungsmethode [87].

Obwohl die Ballondilatation nach wie vor am häufigsten angewandt wird, konnten sich in den vergangenen Jahren zahlreiche andere perkutane Verfahren etablieren [39,60,78,99,100,103,104,110,111,113,114,167,178,179,180,181,184,185]. Eine für die hier vorgelegte Arbeit besonders interessante Technik ist die Atherektomie mit dem Simpson-Katheter [99,100,181], da bei dieser Methode stenosierendes Plaquematerial aus dem verengten Gefäßsegment geborgen werden kann und für weitere zellbiologische Untersuchungen zur Verfügung steht. Bedauerlicherweise werden die beeindruckenden Erfolge der Kathetertechnik durch hohe Restenosierungsraten geschmälert [61,65,87,123,130,158,196]. Die mechanischen, thermischen, elektrischen und chemischen Methoden, die zur Entfernung des Plaquematerials eingesetzt werden, wirken selbst als starke proliferationsauslösende Stimuli und führen in etwa 30% zu einem Wiederverschluß des behandelten Gefäßsegments.

### **4. Kultivierung von Zellen aus atherosklerotischen Plaques**

Die technischen Möglichkeiten zur Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen bestehen seit etwa 1970 [70,159,224]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Berichte über Funktion [28,79,84], Differenzierung

[19,28,30,31,32,34,37,38,71,86,91,142,200] und das Wachstum [30,33,71,80,81,107,108,131] von Endothelzellen und glatten Muskelzellen überwiegend der tierischen Gefäßwand publiziert. Während Untersuchungen mit Gefäßwandzellen des Menschen bereits relativ selten durchgeführt werden, beschäftigen sich noch weniger Arbeitsgruppen mit der Kultivierung von Zellen aus atherosklerotischen Plaques des Menschen.

Bei der Kultivierung von SMC aus der unveränderten Gefäßwand muß berücksichtigt werden, daß innerhalb weniger Tage in Kultur eine Änderung des Phänotyps stattfindet. Die kontraktilen SMC wandeln sich in metabolisch aktive SMC um, die auf die Zugabe von Serummitogenen mit Zellteilung reagieren [33,34,35,200]. Da dieser Prozeß unter Kulturbedingungen reversibel verläuft, wurde hierfür der Begriff der "phänotypischen Modulation" eingeführt. Im Gegensatz zur "Transformation" ist hierunter eine spontane, reversible Veränderung von der überwiegend kontraktilen SMC in die überwiegend synthetische oder mitotisch aktive SMC und umgekehrt zu verstehen [188,189,190]. Ob bei der Kultivierung von SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial, die ja bereits eine "Modulation" durchgemacht haben, eine neuerliche "phänotypische Modulation" *in vitro* durchlaufen wird oder nicht, ist nicht geklärt. Somit kann nicht sicher geklärt werden, ob der Phänotyp *in vitro* auch der Differenzierung *in vivo* entspricht.

Der Vorteil, mit den Zellen arbeiten zu können, die eine wichtige Rolle bei der Atherogenese spielen, muß durch die aufwendige Beschaffung des Untersuchungsmaterials und die schwierigen Kultivierungsbedingungen erkauft werden. Neben den Tiermodellen [18,209,210] und der Organkultur [68] stellt die Kultivierung von Plaquezellen des Menschen sicherlich eine wertvolle Ergänzung der Arterioskleroseforschung dar. Ob die erhaltenen Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation übertragen werden können, oder ob die kultivierten Zellen bereits erheblich verändert sind, kann zur Zeit noch nicht abschließend beantwortet werden.

## **5. Die Thematik der vorliegenden Arbeit**

Der erste Teil der vorliegenden Untersuchungen beschäftigt sich mit der Kultivierung von SMC aus atherosklerotischen Läsionen des Menschen. Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten, wurde die ebenfalls erfolgreich durchgeführte Kultivierung von EC nicht berücksichtigt. Die Gewinnung des Plaquematerials erfolgte durch Atherektomie (periphere Arterien) und intraoperative Entnahmen (periphere und koronare Arterien). Die Wachstumsraten und die Zellgrößenverteilung der isolierten Zellen wurde analysiert.

Im zweiten Teil wurden die SMC verschiedenen Kulturbedingungen unterworfen. Neben der Migrationsfähigkeit und der Klonierungsfähigkeit wurde der Effekt von Kollagenbeschichtung der Kulturschalen untersucht. Des Weiteren wurden die Zellen unterschiedlichen Serumkonzentrationen ausgesetzt und mit konditioniertem Medium kultiviert. Abschließend wurden die Kulturen unter der Einwirkung von endothelialeem Wachstumsfaktor (ECGF) und Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) kultiviert.

Im dritten Teil erfolgten Untersuchungen über den Einfluß von Medikamenten auf das Wachstumsverhalten der SMC. Nachdem auf zellulärer Ebene die Migration und Proliferation entscheidende Ereignisse der Atherogenese darstellen, besteht großes Interesse daran, diesen Prozeß medikamentös zu hemmen. Während eine primäre Prophylaxe der Atherogenese wohl nur über eine Reduktion der Risikofaktoren möglich scheint, wäre ein medikamentöser Ansatz zur Reduktion der Restenose-Raten nach Angioplastie vorstellbar. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Medikamente, die bereits klinisch zur Vor- und Nachbehandlung bei Angioplastien eingesetzt werden, auf ihren Effekt auf kultivierte Plaquezellen überprüft.

## **B. Material**

### **1. Zellkultur**

#### **1.1. Zellausgangsmaterial**

Die Bereitstellung einer ausreichenden Menge von Plaquematerial zur Isolierung von glatten Muskelzellen war nur durch die enge Kooperation mit Kliniken in München, Salzburg und Ulm möglich. Im einzelnen stand stenosierendes Gewebe aus folgenden Gefäßarealen zur Verfügung:

- Stenosierendes Plaquematerial aus der A. femoralis superficialis, der A. iliaca und der A. poplitea, welches mit einem perkutanen Simpson Atherektomie-Katheter extrahiert wurde
- Plauegewebe aus den Koronarien, Bypassvenen-Implantaten, der A. femoralis superficialis, der A. iliaca, der A. poplitea und der A. carotis, das operativ durch Thromendarterektomie entfernt wurde

#### **1.2. Kulturmedien und Seren**

Für die Anzucht der glatten Muskelzellen wurden folgende Kulturmedien bzw Kulturmedienkombinationen verwendet: 1 Teil Waymouth's MB 752/1 (WM, Pulvermedium; Gibco BRL) + 1 Teil Ham F 12 Nutrient Mixture (Ham F 12, Pulvermedium; Gibco BRL).

Das Ansetzen der Medien erfolgte prinzipiell mit Ampuwa-Wasser (steril und pyrogenfrei, Fresenius); zur Pufferung in den Normalbereich wurden die notwendigen Mengen  $\text{NaHCO}_3$  zugesetzt.

Vor Zugabe der Seren und Antibiotika wurden die Kulturmedien mit einer Sterilfiltrationsbombe SM 16 249 (Sartorius) mit Vorfilter 200S SM 13400 (Sartorius) und Hauptfilter Ultipor N<sub>66</sub> TM Nylon 66 (Pall) oder 100N SM 11 107 (Sartorius) sterilfiltriert. Alternativ hierzu Sterilfiltration mit dem Sterivex Schlauchpumpen-Sterilfiltrationskit und Sterivex-GS Kerzenfilter mit Füllglocke (Millipore).

Nach Ansetzen der Medien wurden Sterilproben entnommen und 3-7 Tage bei

37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Kontaminationen untersucht. Um die Ausbreitung eventueller bakterieller Infektionen in den Zellkulturen zu erschweren, wurde den Kulturmedien routinemäßig 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep, 100x, Gibco BRL) als Antibiotikum zugegeben. Bei Verdacht auf eine mykotische Kontamination wurde in einzelnen Fällen 2,5 µg/ml Amphotericin B (Gibco BRL und Boehringer Mannheim) als Antimykotikum zugesetzt.

Den chemisch voll definierten Kulturmedien muß ein bestimmter Anteil an Serum zugegeben werden. Das Serum liefert Hormone, Wachstumsfaktoren, Bindungs- und Adhäsionsproteine, Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme. Es wurden folgende Seren verwendet:

- Fetales Kälberserum (fcs, Chargen 70 506, 70 233, 71 025, 70 918; Sebak und Charge 40G7089; Gibco BRL)
- Pferdeserum (hs, Charge 10 F0472; Gibco BRL)

Vor der Verwendung der Seren wurden diese zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 min. lang auf 56° C erwärmt, anschließend portioniert und bei -20°C/-80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Je nach Verwendungszweck wurden den Kulturen unterschiedliche Mengen und Kombinationen von Seren sowie Puffer und Lösungsmittel zugesetzt:

- Transport und Präparationsmedium: Serumfreies Kulturmedium + 15mM HEPES (sterile Pufferlösung, 1 mol/l in Wasser; Serva) + Pen/Strep + Amphotericin B
- Routinekulturmedium: Kulturmedium + 15% Serum + Pen/Strep
- Ruhekulturmedium: Kulturmedium + 1% Serum + Pen/Strep
- Einfriermedium: Kulturmedium + 20% fcs + 5% hs + 7,5% DMSO (Serva) + Pen/Strep

### 1.3. Temperatur, Begasung und pH-Wert

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus 5060 EC/CO<sub>2</sub>) bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch den CO<sub>2</sub>-Partialdruck wird das CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Puffersystem der Kulturmedien (NaHCO<sub>3</sub>



-Gehalt: 1,9 g/l) auf pH 7,2 - 7,4 eingestellt und konstant gehalten.

#### 1.4. Pufferlösungen

Wenn nicht anders angegeben, stammen sämtliche aufgeführten Chemikalien in p.a. -Qualität von der Fa. Merck. Alle Pufferlösungen für die Zellkultur wurden grundsätzlich mit pyrogenfreiem Wasser (Ampuwa, Fresenius) hergestellt.

- PBS<sup>-</sup>: Phosphate Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium, pH 7,2. 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fertige Tabletten, Oxoid) ad 1000 ml Wasser.
- PBS<sup>+</sup>: Phosphate Buffered Saline mit Calcium und Magnesium, pH 7,2. Wie PBS<sup>-</sup>, zusätzlich 0,1 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O und 0,132 g/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O.
- Versen: EDTA-Lösung 0,02%ig, pH 7,2. 200 mg Ethylendiamintetraacetat ad 1000 ml PBS<sup>-</sup>.
- Hepes: Pufferlösung 1 mol/l, steril, Serva Heidelberg.

#### 1.5. Enzymlösungen

Alle Lösungen für die Zellkultur wurden grundsätzlich mit pyrogenfreiem Ampuwa-Wasser angesetzt.

- Trypsin-Versen: Trypsin-EDTA-Lösung 0.05%ig, pH 7,2. 500 mg Trypsin (1:250 aus Rinderpankreas, Aktivität 3-4 U/mg; Serva) ad 1000 ml Versenlösung. 2mg/ml Phenolrot als Indikator zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach nochmals auf pH 7,2 eingestellt, sterilfiltriert, portioniert und bei -20°C gelagert.
- Dispase II: Dispase Reinheitsgrad II. Gelöst in Puck's Salzlösung, Aktivität 2,4 U/ml (Boehringer Mannheim).
- Kollagenase: Kollagenase CLS III Worthington (229 U/mg, Charge 45S 8973; Seromed/Biochrom); Kollagenase aus Clostridium hi-

stolytikum (0,24 U/mg, Charge 11111-7628-77; Boehringer Mannheim).

- Elastase: Elastase aus Schweinepankreas, Lyophilisat oder stabilisierte Kristallsuspension, ca. 70 U/mg, Chargen 1096 4720-01, 1153 0520-04, 10804 722-19; (Boehringer Mannheim), Lyophilisat, 22 U/mg, Charge 140 68C (Serva), Lyophilisat, 101 U/mg, Charge 310 88C (Serva). Nur die Verwendung der Elastase der Fa. Boehringer ergab einen hohen Prozentsatz vitaler Zellen.
  
- Dispase/Kollagenase: 1 mg Kollagenase/ml Dispase II.
  
- Kollagenase/Elastase: Für 10 ml gebrauchsfertige Enzymlösung in HEPES-gepuffertem Kulturmedium: 18 mg Kollagenase, 2 mg Elastase und zur Hemmung enzymatischer Fremdaktivitäten 10 mg Trypsininhibitor aus Sojabohne (54 IU/mg Lyophilisat, ; Serva). Vor Gebrauch angesetzt und mit Einmal-Filterhalter (Porengröße 0,2 µm, FP 030/3; Schleicher & Schuell) sterilfiltriert.

#### 1.6. Adhäsions- und Wachstumsfaktoren

- Lathyrinisches Rattenkollagen Typ I:

Gebrauchslösung: 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure. Lathyrinisches Rattenkollagen Typ I von Boehringer Mannheim (Charge 61261 500).

Für die Zellkultur wurden die folgenden Wachstumsfaktoren verwendet. Die neu angesetzten Lösungen wurden mit DynaGard 0,2 µm-Filtern (geringes Totvolumen; Tecnomara) sterilfiltriert.

- ECGF: Endothelial Cell Growth Factor. Charge 60 7896 00; Boehringer Mannheim. Stammlösung (20x): 1 mg/ml in PBS<sup>-</sup> [126].

- PDGF: CR Platelet-Derived Growth Factor aus Thrombozyten des Menschen, HBS-Antigen und HTLV III-Antikörper nicht nachweisbar, 90% rein in der SDS-PAGE, Proteinkonzentration 5 µg/ml. Chargen 87-1110 und 88-5045; Flow Laboratories/Collaborative Research Inc. Zur Vermeidung unspezifischer Oberflächenadsorption bei der Entnahme verdünnt mit 2 mg/ml Rinderserumalbumin in PBS<sup>+</sup>.

## 1.7. Testsubstanzen

1.7.1. Acetylsalicylsäure: (Serva, Heidelberg). Lösungsmittel: 70% Ethanol.  
1 molare Stammlösung: 180mg/ml.

1.7.2. Dipyridamol: (Thomae). Lösungsmittel: 99.8% Ethanol. 0,1 molare  
Stammlösung: 50mg/ml.

1.7.3. Acetylsalicylsäure + Dipyridamol: Lösungsmittel: 99.8% Ethanol. Stammlö-  
sung: s. 1.7.1 + 1.7.2.

## 1.7.4. Fibrinolytika

- Streptokinase: (Deutsche KabiVitrum GmbH, München). 50 bis 85 mg  
Trockensubstanz enthalten 250.000 IE Streptokinase; Lösungsmittel:  
Ampuwa-Wasser (Fresenius) Stammlösung: 50.000 IE/ml.

- Urokinase: (medac GmbH, Hamburg). 98,7 bis 103,5 mg Trockensub-  
stanz enthalten 250.000 IE Urokinase; Lösungsmittel: Ampuwa-Wasser  
(Fresenius). Stammlösung: 50.000 IE/ml.

- Plasminogen human-Aktivator, rekombiniert: (Thomae GmbH, Biberach).  
933 mg Trockensubstanz enthalten 20 mg Plasminogen human-Aktiva-  
tor, rekombiniert; Lösungsmittel: Ampuwa-Wasser (Fresenius). Stamm-  
lösung: 500.000 U/ml.

1.7.5. Propranolol: (Sigma Chemie, Deisenhofen). Lot. 76 F 0616. Lösungsmittel:  
PBS<sup>-</sup>. 0,01 molare Stammlösung: 3 mg/ml.

1.7.6. Diltiazem: (Gödecke AG, Berlin). Lösungsmittel: Ampuwa-Wasser (Fresenius). 0,01 molare Stammlösung: 5 mg/ml.

### 1.8. Kulturgefäße

Zellkulturgefäße für die Routinekultivierung (Primärkulturen, Massenkulturen, dünne Massenkulturen):

- Kulturschale Ø 6 cm, Wachstumsfläche 21 cm<sup>2</sup> (Falcon 3002F, Costar 3060)
- Kulturschale Ø 10 cm<sup>2</sup>, Wachstumsfläche 55 cm<sup>2</sup> (Falcon 3003, Costar 3100)
- Gewebekulturflasche, Wachstumsfläche 75 cm<sup>2</sup> (Costar 3375 und 3376)

Zellkulturgefäße für Wachstumskurven und Substanz-Testungen:

- Mehrfachkulturschale (Multiplatte 6), Wachstumsfläche pro Vertiefung 9,6 cm<sup>2</sup> (Falcon 3046, Greiner 657 160, Costar 3406 und 3506)

Zellkulturgefäße für Deckglaskulturen:

- Mehrfachkulturschale (Multiplatte 12), Wachstumsfläche pro Vertiefung 4 cm<sup>2</sup> (Costar 3512)

## 2. Zytologie und Immunologie

Wenn nicht anders angegeben, stammen sämtliche aufgeführten Chemikalien in p.a.-Qualität von der Fa. Merck.

### 2.1. Fixative und Permeabilisierungslösungen

- 3,5%ige Formalinlösung in PBS<sup>-</sup>/PBS<sup>+</sup>
- 70%iges Ethanol
- Methanol p.a., gekühlt auf -20°C
- 1%iges Triton x-100 (rein; Serva) in PBS<sup>+</sup>

### 2.2. Pufferlösungen

- Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 7,2. Lösung A: 9,08 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua dest. Lösung B: 11,88 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua dest. Zum Gebrauch wurden 4 Teile Lösung A und 6 Teile Lösung B gemischt und der pH auf 7,2 eingestellt.

### 2.3. Farbstoffe und Färbelösungen

- 2%ige und 6%ige Giemsalösung (Azur-Eosin-Methylenblau) in Sörensen Puffer, pH 7,2. Unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.
- 0,02%ige Coomassielösung (Serva Blau G; Serva) in 20%igem Methanol und 5%iger Essigsäure. Unmittelbar vor Gebrauch aus 0,2%iger Stammlösung angesetzt.
- 0,1%ige Kernechtlösung. 5 g Aluminiumsulfat ad 100 ml Aqua dest., aufgekocht und 0,1 g Kernechtrot zugegeben.
- 0,5% ige Trypanblaulösung in physiologischer Kochsalzlösung (Serva).
- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid; Serva). Stammlösung (50x); 5 µg/ml PBS
- TRITC-Phalloidin (Sigma und Molecular Probes Inc.). Methanolische Stammlösung portioniert, das Methanol bei Raumtemperatur verdunsten lassen und Proben bei - 20°C gelagert. Zum Gebrauch in PBS aufgenommen. Arbeitskonzentration: 2 µg/ml.

### 2.4. Erstantikörper (primäre Antikörper)

Alle Antiseren wurden portioniert, bei -20°C/-80°C aufbewahrt, vor Gebrauch entsprechend mit PBS<sup>-</sup> verdünnt und 10 min. mit 13 000 rpm zentrifugiert (Heraeus Sepatech Biofuge A). Deutlich bessere Ergebnisse in Bezug auf die Verminderung der unspezifischen Antikörperadsorption wurden entweder mit dem Filtrieren durch 0,2 µm-Filter (DynaGard, Tecnomara) oder durch Zentrifugation mit Mikrozentrifugenfiltern (Porengröße 0,22 µm; Tecnomara und Millipore) erzielt. Der optimale Antikörper-Titer wurde vor der routinemäßigen Verwendung für jedes Antiserum getrennt ermittelt.

#### - *Antiseren gegen Aktin*

- Monoclonal anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (Charge 80 40 78); Progen Biotechnik): Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den NH<sub>2</sub>-Terminus des glattmuskulären  $\alpha$ -Aktin. Synthetisch hergestelltes Dekapeptid. Verdünnung: 1:10 in PBS<sup>-</sup>.

#### - *Antiseren gegen Intermediärfilamente*

- Monoclonal anti-desmin (Charge VII; Camon): Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Desmin. Klon DE-R-11. Fertige Gebrauchslösung.

- Monoclonal anti-vimentin (Charge 67F-4807; Sigma): Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Vimentin. Klon V9. Verdünnung: 1:30 in PBS<sup>-</sup>.
- *Antiseren gegen Mikrotubuli*
  - Monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Amersham Buchler): Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen  $\alpha$ -Tubulin. Verdünnung: 1:5 in PBS<sup>-</sup>.
- *Antiseren gegen Zelloberflächen- und Extrazellulärmatrixproteine*
  - Anti-Factor VIII-related Antigen (Charge 017 065; Ortho Diagnostic Systems): Anti-Serum aus Kaninchen gegen Human-Faktor VIII, keine Verdünnung.

## 2.5. Zweitantikörper (sekundäre Antikörper) und Färbereagenzien

Portionierung, Lagerung und Reinigung wie unter B.2.4. beschrieben.

- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, FITC-konjugiert.  
(FITC-labeled goat anti-rabbit IgG; Miles 1:50 in PBS<sup>-</sup>, Dianova 1:30 in PBS<sup>-</sup>).
- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, TRITC-konjugiert.  
(TRITC-labeled goat anti-rabbit IgG; Miles 1:80 in PBS<sup>-</sup>, Dianova 1:30 in PBS<sup>-</sup>).
- Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege, FITC-konjugiert.  
(FITC-labeled goat anti-mouse IgG; Dianova 1:10 in PBS<sup>-</sup>, Sigma 1:30 in PBS<sup>-</sup>).
- Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege, TRITC-konjugiert.  
(TRITC-labeled goat anti-mouse IgG; Dianova; 1:30 in PBS<sup>-</sup>).

## 2.6. Einbettungsmedium

- Mowiol 4-88 (Farbwerke Hoechst). Das Ansetzen des Einbettungsmediums erfolgte wie von Dartsch [41] beschrieben: 12 g Mowiol wurden in 30 g Glycerin (fluoreszenzfrei) unter intensivem Rühren gelöst (extrem zähflüssig). Nach Zugabe von 30 ml Aqua dest. wurde die Suspension nach kurzem Rühren 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zugabe von 60 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer (2,42 g Tris ad 100 ml Aqua dest.; pH-Wert mit 0,1 N HCl auf 8,5 eingestellt) und 10 min. bei 56°C leicht gerührt. Danach für 15 min. bei 5000 g zentrifugiert (Labofuge GL; Heraeus Sepatech), den klaren Überstand portioniert und bei -20°C aufbewahrt [148].

## 3. Mikroskopie und Mikrofotographie

- Nikon TMS-Inversmikroskop mit ELWD-Kondensor und dem Phasenkon-

trast-Objektiven CF Plan Achromat 4/0,13 DL und CF Plan Achromat 10/0,3 DL.

- Nikon Diaphot TMD-Inversmikroskop mit ELWD-Kondensor und den Phasenkontrast-Objektiven CF Plan Achromat 4/0,13 DL, CF Plan Achromat 10/0,3 DL, CF Achromat 20/0,4 DL mit Deckglaskorrektur und CF Plan Achromat 40/0,55 DL ELWD mit Deckglaskorrektur.

Zusätzlich Inkubator-Set für Temperaturkonstanthaltung und Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit Filterblöcken für Blau-, Grün- und UV-Anregung (siehe unten) und Nikon FE-2-Kameragehäuse für die Mikrofotographie.

- Nikon Optiphot-Mikroskop mit den Hellfeldobjektiven CF Planapochromat 4/0,20, CF Planapochromat 10/0,40, Plan-Neofluar 25/0,8 Öl-Wasser-Glycerin (Zeiss), CF Planapochromat 40/1,0 Oil, CF Planapochromat 60/1,4 Oil und CF Planapochromat 100/1,35 Oil.

Zusätzlich Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit Filterblöcken für Blau-, Grün- und UV-Anregung. Für die Mikrofotographie ausgerüstet mit einer Nikon UFX-II-35-Mikrofotoeinrichtung für Spot- und Teilintegralmessung in Kombination mit dem Projektionsokularen PL-2,5x und PL-5x.

Filterkombination für Grün-Anregung:

Erregerfilter EX 546/10, Dichroicspiegel DM 580, Sperrfilter BA 580

Filterkombination für Blau-Anregung:

Erregerfilter EX 470-490, Dichroicspiegel DM 510, Sperrfilter BA 520

Filterkombination für UV-Anregung:

Erregerfilter EX 365/10, Dichroicspiegel DM 400, Sperrfilter BA 420 (UV-1A)

Erregerfilter EX 330-380, Dichroicspiegel DM 400, Sperrfilter BA 420 (UV-2A)

Erregerfilter EX 330-380, Dichroicspiegel DM 400, Sperrfilter BA 435 (UV-2B)

## C. Methoden

### 1. Etablierung von Primärkulturen

#### 1.1. Plaquezellen

##### 1.1.1. Feuchtgewichtbestimmung des Plaquematerials

Nach dem sterilen Transport der Gewebeprobe in einer HEPES-gepufferten (15 mM) Transportlösung ohne Serumzusätze wurde das Medium sorgfältig abgesaugt und die Plaquestückchen mehrmals mit PBS<sup>-</sup> gespült, um Erythrozyten und locker anhaftende Bindegewebsanteile zu entfernen.

Leere sterile Kunststoffröhrchen wurden mit der Feinwaage gewogen. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Plaquestückchen unter sterilen Bedingungen in die Kunststoffröhrchen überführt und neuerlich das Gewicht bestimmt, die Differenz der beiden Gewichte ergab das Feuchtgewicht.

##### 1.1.2. Zellisolierung

Etwa ein Drittel des zerkleinerten Plaquematerials wurde nach der Explant-Technik ausgelegt. Hierfür wurde das Plaquewebe in ca 1 x 1 mm große Stückchen zerteilt und für 3 h an der leicht befeuchteten Kulturschale angetrocknet. Anschließend wurde die Schale mit 5 ml Kulturmedium versorgt und zur routinemäßigen Kultivierung in den Brutschrank gestellt. Die verbleibenden Gewebeproben wurden über einen Zeitraum von 180 min. im Schüttelwasserbad bei 37°C enzymatisch disaggregiert. Folgende Enzymmischung wurde verwendet: 10 ml HEPES-gepuffertes Kulturmedium mit 18 mg Kollagenase, 2 mg Elastase und 10 mg Trypsin-Inhibitor. Nach Zugabe von 20% fetalem Kälberserum wurden die Zellen 10 min. mit 170 g zentrifugiert und ausgesät. Als Kulturmedium wurde eine 1/1 Mischung aus Waymouth's MB 752/1 und Ham F 12 verwendet unter Zugabe von 15% fetalem Kälberserum verwendet. Die Kultivierung wurde bei 37°C in einer wasserstoffgesättigten Atmosphäre mit 7% CO<sub>2</sub> + 93% Luft durchgeführt [43,48,49].

#### 1.2. Glatte Muskelzellen aus der Media

Für die Versuche mit glatten Muskelzellen aus der normalen Media wurden kryogelagerte Zellen verwendet, die freundlicherweise von Dr. Dartsch und Dr. Roth zur Verfügung gestellt wurden.



Die Isolierung der glatten Muskelzellen erfolgte durch Dr. Dartsch und Dr. Roth nach folgendem Prinzip [48,165]:

Die Endothelzellschicht wurde, wie bei der Isolierung von Endothelzellen beschrieben (siehe Abschnitt C.1.3.), enzymatisch disaggregiert und die gewonnenen Zellen bei Bedarf weiter kultiviert. Zur völligen Entfernung eventuell noch adhärerender Endothelzellen wurde das Gefäß 10 min. bei 37°C mit einer Trypsin- Versen-Lösung behandelt.

Danach wurde die Media streifenweise von der Adventitia abgezupft und entweder als Explant ausgelegt oder, wie unter C.1.1.2 beschrieben, enzymatisch disaggregiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt C.2.1. dargelegt, bei ausreichender Zellzahl wurden die Zellen kryogelagert (siehe Abschnitt C.2.4.).

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Kulturmedium mit einer Temperatur von 37°C in das Röhrchen mit den kryogelagerten Zellen. Der so gewonnenen Zellsuspension wurde die gewünschte Menge Medium zugegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellcounter erfolgte die Aussaat in Kulturschalen in einer Konzentration von 2000 bis 3000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

### 1.3. Endothelzellen [224]

Nach steriler Entnahme für Bypass-Operationen wurden nicht benötigte Venenstücke unserem Labor zur Verfügung gestellt. Nach sofortiger Überführung in das Transportmedium (Zusammensetzung wie unter B.1.2. beschrieben), wurden die Venen ohne Verzögerung aufgearbeitet. Hierbei wurde die Vene in einer Präparationsschale mit Silikonauflage aufgespannt und longitudinal eröffnet. Nach sorgfältigem Spülen mit PBS<sup>-</sup> wurde die Vene in einer stählernen Aufspannvorrichtung mit dem Lumen nach oben fixiert und so mit Silikon abgedichtet, daß nur Endothelzellen mit der Enzymlösung in Berührung kamen. Die enzymatische Zellisolierung wurde über einen Zeitraum von 20 min. mit einem Gemisch aus Kollagenase/Dispase unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension mit 20% fetalem Kälberserum bei 170g über 10 min. erfolgte die Aussaat in mit Kollagen beschichtete Kulturschalen.

#### 1.4. Fibroblasten

Nach steriler Entnahme der Hautstückchen im Verlauf von dermatologischen Eingriffen wurden die Gewebeproben in das Transportmedium (B.1.2.) überführt. Im Labor wurde das Transportmedium entfernt und mehrmals mit PBS<sup>-</sup> gespült. Mit dem Präparationsbesteck wurde das Unterhautfettgewebe sorgfältig entfernt und das Hautpräparat in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Würfel zerteilt. Ungefähr ein Drittel der Hautstückchen wurde nach der Explantat-Methode ausgelegt, mit den restlichen Gewebeproben wurde eine enzymatische Disaggregation durchgeführt (wie in Abschnitt C.1.1.2. beschrieben).

### 2. Routinekultivierung

#### 2.1. Routinekultivierungstechnik

Routinemäßig wurden die glatten Muskelzellen als sog. "Massenkulturen" (Aussaat etwa 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) kultiviert. Die Zellen waren bei "normalem Wachstum" mit etwa 0,3 Populationsverdopplungen/Tag nach etwa 7 Tagen und 2 Populationsverdopplungen konfluent, d.h. jeder verfügbare Platz der Kulturschale war mit Zellen besetzt. Danach wurden die Zellen entweder durch Trypsin- oder Dispase II-Behandlung von der Unterlage abgelöst und in der entsprechenden Zelldichte in neue Kulturschalen ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels Zählkammer nach Neubauer oder mit dem Zellcounter CASY 1 (siehe C.2.1.) durchgeführt.

Sogenannte "dünne Massenkulturen" (Aussaat etwa 1.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden in einzelnen Ausnahmefällen zur routinemäßigen Überprüfung der Zellgestalt angelegt.

In Abhängigkeit von der Wachstumsfläche der Kulturschalen- oder flaschen wurden folgende Medienmengen zur routinemäßigen Zellkultivierung verwendet:  
21 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche: 5 ml, 55 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche: 10 ml, 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche: 15 ml und 165 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche: 30 ml.

#### 2.2. Adhäsionsfaktoren

*Beschichtung der Kulturschalen mit Kollagen Typ I (lathyritisches Kollagen):*

Auf dem Kulturschalenboden wurden pro cm<sup>2</sup> 0,5 µl lathyritisches Rattenhautkollagen (1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure) mit einem Gummispatel verteilt und unter

UV-Licht etwa 30 min lang getrocknet. Bis zur Verwendung wurden die Schalen steril aufbewahrt.

### **2.3. Konditionierte Medien**

Glatte Muskelzellen aus primär- und restenosierendem Plaquematerial wurden wie in Abschnitt C.1.1.2. beschrieben isoliert und kultiviert. In der log-Phase wurde nach zwei Tagen das Kulturmedium steril entnommen und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte wie unter C.1.4. beschrieben. In der log-Phase wurde das Kulturmedium steril entnommen und bei  $-20^{\circ}$  bis zur Verwendung eingelagert.

### **2.4. Kryolagerung der Zellen**

Um für spätere Experimente gleiches Zellausgangsmaterial zu haben, wurden die nicht direkt in Experimenten eingesetzten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung gelagert. Die Zellen wurden zunächst durch Trypsinbehandlung von der Unterlage abgelöst und ausgezählt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension (5 min. bei 1100 rpm = 170 g; Hettich Universal 2S) wurde der Überstand abgesaugt und die sedimentierten Zellen so in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, daß die Zellzahl  $1 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde in 1 ml-Portionen in eiskalte Einfrierröhrchen mit Schraubverschluß (Costar Bio-Freeze Vials 2328) abgefüllt. Durch einen speziell optimierten und standardisierten dreistufigen Einfrierprozeß wurden die Zellen sukzessive im Einfrieraufsatz (Handi Freezing Tray; Taylor Wharton) über flüssigem Stickstoff im Verlauf von 60 min heruntergekühlt. Danach wurden die Röhrchen direkt in flüssigem Stickstoff gelagert (Lagerungsbehälter Biogel P-40; L'Air Liquide). Die Überlebensrate der so eingefrorenen und gelagerten Zellen lag nach dem ebenfalls standardisiertem Auftauen und der Neuaussaat - unabhängig von dem in vitro-Alter, dem Zelltyp oder der Herkunft - zwischen 60% und 90%.

## 2. Zellkultur-Testsysteme

### 2.1. Populationsdynamik und Zellstatus

Das Wachstumsverhalten einer diploiden Zellkultur wird in drei Hauptphasen unterteilt [115,151]:

#### - *Anlaufphase (lag-Phase)*

In dieser ersten Phase nach der Zellaussaat findet nur eine geringe Zunahme der Zellzahl statt. In dieser Periode der Adaptation setzen sich die Zellen auf dem neuen Substrat fest, breiten sich aus und beginnen zu metabolisieren.

#### - *Exponentielle Wachstumsphase (log-Phase)*

Die exponentielle Wachstumsphase schließt sich direkt an die Anlaufphase an und ist durch die exponentielle Zunahme der Zellzahl aufgrund der hohen mitotischen Aktivität charakterisiert.

#### - *Stationäre Phase (Plateau-Phase)*

Die exponentielle Wachstumsphase adhärenter Zellen ist in der Regel dann beendet, wenn durch die Zellvermehrung ein einschichtiger Zellrasen (Monolayer) entstanden ist. Die Zellkultur ist konfluent, d.h. jeder verfügbare Raum des Substrates ist besetzt und alle Zellen stehen in engem Kontakt zu ihren Nachbarn.

Um die Zellproliferation oder die Populationsdynamik einer Kultur zu untersuchen, wurden 2.000 bis 3.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät (Multiplatte 6). Nach dem vollständigem Absetzen und Ausbreiten der Zellen nach 16-24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Von diesem Zeitpunkt ab wurden die Medienwechsel während der gesamten Inkubationszeit - je nach erreichter Zelldichte - in 2 -3 tägigem Abstand durchgeführt.

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf das Proliferationsverhalten der kultivierten Zellen zu untersuchen, wurden die Testsubstanzen in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und nach dem ersten Mediumwechsel den Kulturen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. In die Kontrollschalen ohne Substanz wurde die entsprechende Menge steriles Lösungsmittel pipettiert. Bei jedem Medienwechsel wurden die Substanzen ebenfalls erneuert.

Zur Bestimmung der Zellproliferation genügte es, den Anfangs- und Endpunkt zu bestimmen, d.h. die Anzahl der abgesetzten und ausgebreiteten Zellen und die nach Abschluß des Versuchs erreichte Zellzahl. Für die Untersuchung der Populationsdynamik wurde prinzipiell gleich vorgegangen, jedoch wurde die erreichte Zellzahl alle 2 Tage bestimmt. Pro Zeitwert wurden 2-3 Vertiefungen einer Multiplatte ausgezählt. Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung (10 min. bei 37°C) von der Unterlage abgelöst, entsprechend der erreichten Zellzahl mit isotonomischer Kochsalzlösung verdünnt und durch Pipettieren vereinzelt. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Zellzahl und Zellgrößenverteilung mit einem Zellcounter (CASY 1; Schärfe Systems).

Aus den so erhaltenen Daten konnten folgende charakteristische Größen für eine bestimmte Zellpopulation bzw. einen Testansatz abgeleitet werden:

- Aktueller Zellstatus, d.h. Zellgrößenverteilung und mittlere Zellgröße, Homogenität einer Population, Subpopulationen
- Aussaat-effizienz in % = Anzahl der ausgebreiteten Zellen x 100/Anzahl der ausgesäten Zellen = Prozentsatz der Zellen, die sich nach 24 bzw. 48 h abgesetzt und ausgebreitet haben
- Proliferative Effizienz in % = Zahl der Gewebeprobe(n), aus denen über 500 000 Zellen kultiviert werden können x 100/Anzahl aller aufgearbeiteten Gewebeprobe(n)
- Anzahl der Populationsverdopplungen =  $\log N_1 - \log N_0 / \log 2$  mit  $N_1$  = geerntete Zellzahl und  $N_0$  = ausgesäte Zellzahl
- Wachstumsrate = Populationsverdopplungsrate/Tag
- Verdopplungszeit =  $1/\text{Wachstumsrate}$  = die Zeit, in der sich eine Zellpopulation verdoppelt
- Kumulative Populationsverdopplungen = Summe aller Populationsverdopplungen einer Zellkultur; gibt das in vitro-Alter einer Zellkultur an.

- Inhibition bzw Stimulation in % =  $\frac{\text{Anzahl der Zellen unter Substanzeinwirkung}}{\text{Anzahl der Zellen ohne Substanzeinwirkung}} \times 100$
- ED 50 = Konzentration eines Medikamentes in der Dosis-Wirkungskurve bei Erreichen von 50% der maximalen möglichen Wirkung

## 2.2. Klonkulturen und Klonierungseffizienz

Ein Zellklon ist eine Population von Zellen, die aus einer Einzelzelle durch mitotische Teilung hervorgegangen ist. Für die Etablierung von Klonkulturen und zur Bestimmung der Klonierungseffizienz wurden in der Regel 20 - 100 Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät. Um trotz der geringen Zellzahl eine möglichst rasche Konditionierung des Kulturmediums zu erreichen und gleichzeitig die Zellen während der gesamten Inkubationszeit von 12 - 14 Tagen mit Nährstoffen zu versorgen, wurde das Medienvolumen auf die Hälfte reduziert. Durch Verdunstung betrug der durchschnittliche Medienvolumenverlust/Woche etwa 20% des Ausgangsvolumens. Daher wurde nach 6 - 8 Tagen die entsprechende Menge steriles Wasser zur Aufrechterhaltung der Osmolarität von 280 - 300 mosm/l zugegeben. Beim Auszählen (Keimzählgerät BZG 28; WTW) wurden nur solche Klone mit mindestens 30 Zellen (etwa 5 Populationsverdopplungen einer Einzelzelle) berücksichtigt. Die Berechnung der Klonierungseffizienz wurde nach folgender Formel vorgenommen: Klonierungseffizienz in % =  $\frac{\text{Zahl der gezählten Klone}}{\text{Zahl der ausgesäten Zellen}} \times 100$ . Im Gegensatz zur Aussaat-effizienz berücksichtigt die Klonierungseffizienz nicht nur die Zahl der Zellen, die sich abgesetzt haben, sondern auch die Zahl der Zellen, die in der Lage sind, sich durch Teilung zu vermehren. Die Klonierungseffizienz kann somit als Kriterium zur Bestimmung der Teilungs- und Lebensfähigkeit von Zellen in Kultur herangezogen werden [150].

## 2.3. Zellmigrationstest

Zur Durchführung des Migrationstests wurden die Zellen bis zur Konfluenz gezüchtet und anschließend 2 weitere Tage in Ruhekulturmedium inkubiert. Der Zellrasen wurde dann in einer Modifikation der Methode von Bürk [23] mit Hilfe einer Rasierklinge und eines Wattestäbchens "verletzt", d.h. ein zellfreier Raum geschaffen. Nach dem Waschen mit PBS<sup>+</sup> und einem Mediumwechsel wurde für weitere 48 Stunden in 1%-igem Ruhekulturmedium plus Testsubstanz weiter in-

kubiert. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte wie unter Abschnitt C.2.1. beschrieben. Nach Fixierung und Färbung der Zellen wurde die Zahl der ausgewanderten Zellen/mm Wundrandlänge durch Auszählen der Zellkerne jenseits des Wundrandes bestimmt. Die Ermittlung der Migrationsgeschwindigkeit in  $\mu\text{m}/\text{Std}$  erfolgte durch Teilen der Wanderungstrecke der ersten Zellfront durch die Inkubationsdauer ab Schnitt.

#### **2.4. Zytotoxizitätstest**

Die Untersuchung und Beurteilung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen wurde entweder im Rahmen einer Proliferationsstudie vorgenommen oder anhand der folgenden Kriterien beurteilt: Lyse der Zellen, Zellgestalt, Bildung langer zytoplasmatischer Ausläufer, intrazelluläre Vakuolenbildung, Abrunden und Ablösen der Zelle.

#### **2.5. Deckglaskulturen**

Zur Untersuchung der Zytoskelett-Strukturen in kultivierten Zellen wurden diese in einer Dichte von  $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  auf entfettete runde Glas-Deckgläser (Durchmesser 13 - 16 mm, Multimed) in 12-Lochplatten ausgesät. Nach 24-48 h, d.h. nach dem vollständigem Absetzen und Ausbreiten der Zellen, wurden die Zellen entsprechend der beabsichtigten Färbung weiter bearbeitet.

##### *Entfetten der Deckgläser:*

Deckgläser in 30%-igem wäßrigem BM-flüssig (Chromschwefelsäureersatz; Biomed) 30 min. gekocht, mindestens 1 h in fließendem Leitungswasser gespült, mit Aceton unter mehrmaligem Schütteln im Wärmeschrank getrocknet und vor der Verwendung für die Zellkultur autoklaviert.

### **3. Zytologische Färbungen [118,157,195]**

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsgänge bei Raumtemperatur und entsprechend temperierten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden 15 min. mit 3,5%iger Formalinlösung fixiert und gegebenenfalls 10 - 15 min. mit 70%igem Ethanol nachfixiert.

### 3.1. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist eine Routinefärbung und für die mikrofotografische Dokumentation wenig geeignet. Formalin- und ethanolfixierte Zellkulturen aus Aqua dest. oder nach Lufttrocknung: 30 min. mit 2%iger Giemsalösung in Sörensen-Puffer, pH 7,2, gefärbt; mehrmals sorgfältig mit Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet. Ergebnis: Zellkern rotviolett gefärbt, Zytoplasma schwach rot.

### 3.2. Coomassie-Giemsa-Färbung

Formalin- und ethanolfixierte Zellkulturen aus Aqua dest.: 2 - 5 min. in 0,02%iger Coomassielösung in 20%igem Methanol und 5%iger Essigsäure gefärbt (ständige mikroskopische Kontrolle); sorgfältig mit Aqua dest. gewaschen und ggf. luftgetrocknet; 15 min. lang mit 6%iger Giemsalösung in Sörensen-Puffer, pH 7,2, gefärbt; sorgfältig mit Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet. Ergebnis: Zellkern rotviolett gefärbt, Zytoplasma blauviolett.

### 3.3. Fluorochromierung der DNA

Zur Darstellung des Zellkernes von Zellen und in Geweben wurden DNA-bindende Farbstoffe mit hoher Fluoreszenzintensität bei UV-Anregung verwendet. Da Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen häufig sind und erhebliche Verfälschungen der Testergebnisse zur Folge haben können, diente die Fluorochromierung der DNA gleichzeitig als Nachweis von Mykoplasmen. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) reagiert speziell mit A/T-reichen Sequenzen der Doppelstrang-DNA und kann sowohl für fixierte Zellen als auch für lebende Zellen verwendet werden.

#### *Lebende Zellen in Kulturschalen oder auf Deckgläsern:*

Zellkulturen einmal mit DAPI-Methanol (0,1 µg/ml) gewaschen, danach einmal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, 15 - 30 min. bei 37°C im Brutschrank mit DAPI-Methanol inkubiert, dreimal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und unter PBS<sup>+</sup> mikroskopiert mit einer Auflichtfluoreszenz-Einrichtung für UV-Anregung (Inversmikroskop). Ergebnis: Zellkerne intensiv blau gefärbt, Nukleoli dunkel. Mykoplasmen erscheinen als gleichmäßig geformte, kleine hell aufleuchtende Punkte oder Ansammlungen auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma.



*Formalinfixierte Zellen:*

Bei gleicher Methodik wurde die DAPI-Stammlösung mit PBS<sup>-</sup> anstelle von Methanol verdünnt.

*Die regelmäßige Überwachung aller Human-Zellkulturen ergab keine Anhaltspunkte für Mykoplasmen-Kontaminationen.*

### 3.6. TRITC-Phalloidin

Die giftigen Bestandteile des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) sind in erster Linie die Amatoxine. Die Phallotoxine sind vergleichsweise wenig toxisch und zeichnen sich bei der Mikroinjektion in lebende Zellen dadurch aus, daß sie mit hoher Affinität stöchiometrisch an das intrazelluläre, polymerisierte F-Aktin binden, dessen Struktur stabilisieren und die Polymerisation des globulären G-Aktins zum F-Aktin fördern und auch die Zellbewegung und das Zellwachstum beeinflussen [245]. Beim TRITC-Phalloidin, das in einer dreistufigen Synthese aus Phalloidin gewonnen wird, wird die Affinität zu F-Aktin durch die Einführung des Fluorophors um den Faktor 6 - 7 gegenüber der Ausgangsverbindung reduziert; seine Toxizität ist um das 50-fache geringer als das Phalloidin selbst [66,227,233].

*Formalinfixierte und Triton X-100-permeabilisierte Zellen aus PBS<sup>-</sup>:*

10 - 15 min. im Dunkeln mit TRITC-Phalloidin (2 µg/ml PBS<sup>-</sup>) inkubiert, mehrmals sorgfältig mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, in Mowiol eingebettet und mikroskopiert mit Auflichtfluoreszenz bei Grün-Anregung. Ergebnis: Aktinfilamente ("stress fibers") fluoreszieren intensiv rot.

## 4. Indirekte Immunfluoreszenztechnik [33,109]

### 4.1. Antigen-Darstellung in kultivierten Zellen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsgänge bei Raumtemperatur und entsprechend temperierten Lösungen durchgeführt.

#### 4.1.1. Fixierung und Permeabilisierung

- a. 6 min. mit Methanol bei -20°C fixiert und permeabilisiert
- b. 10 min. mit 3,5%iger Formalinlösung fixiert, danach 2 min. mit 1%iger Triton X-100-Lösung permeabilisiert

- c. 10 min. mit 3,5%iger Formalinlösung fixiert, danach 6 min. mit Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  permeabilisiert
- d. 15 min. mit 0,75%igem Glutaraldehyd fixiert, 2 min. mit 1%iger Triton X-100-Lösung permeabilisiert, Aldehydgruppen mit frischer  $\text{NaBH}_4$ -Lösung reduziert (dreimal je 4 min. unter  $\text{H}_2$ -Entwicklung). Alternativ zur  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion: 5 min. 0,1 M Glycin in PBS<sup>+</sup>

*Anwendung der entsprechenden Fixierungs- und Permeabilisierungsmethode zur Darstellung von:  $\alpha$ -Aktin: a; Vinkulin: b,c; Desmin; Vimentin: a,d; Mikrotubuli: a, d; Fibronectin, Faktor VIII-related Antigen: a.*

#### **4.1.2. Methodik**

Fixierte Zellen aus PBS<sup>-</sup>: 45 bis 60 min. mit dem entsprechend verdünnten spezifischen Erstantikörper bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert; kurz mit PBS<sup>-</sup> gewaschen; 60 bis 90 min. mit dem entsprechend verdünnten FITC- oder TRITC-konjugiertem Zweitantikörper bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert; sorgfältig mit PBS<sup>-</sup> gewaschen; eingebettet in Mowiol und mikroskopiert mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung.

Die gleichzeitige Mehrfachmarkierung verschiedener Proteinstrukturen mit Antikörpern ist nur dann möglich, wenn eine Kreuzreaktion der Erstantikörper auszuschließen ist und außerdem die Zweitantikörper gegen Immunglobuline verschiedener Spezies gerichtet sind. Die dargestellte Methodik wurde dahingehend modifiziert, daß in Schritt 1. mit beiden spezifischen Erstantikörpern und in Schritt 3. mit beiden spezifischen und unterschiedlich konjugierten Zweitantikörpern inkubiert wurde.

Wurde eine Kombination von indirekter Immunfluoreszenz mit fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. DAPI, TRITC-Phalloidin) vorgenommen, erfolgte die Inkubation mit der entsprechenden Farbstofflösung als letzter Schritt vor dem Einbetten in Mowiol.

## D. Ergebnisse

### 1. Kultivierung von Plaquezellen des Menschen

Zur Aufarbeitung stand sowohl Plaquematerial zur Verfügung, das mit einem perkutanen Simpson Atherektomie-Katheter [99,100,180,181] extrahiert wurde, als auch Plaquematerial, das durch Thrombendarterektomie intraoperativ entfernt wurde. Mit beiden Entnahmetechniken wurde sowohl primär-stenosierendes, als auch re-stenosierendes Gewebe entnommen.

#### 1.1. Plaqueextraktion

##### 1.1.1. Simpson-Katheter (p-SAC)

Insgesamt wurden 26 Patienten mit hochgradig verschlossenen oder sogar völlig okkludierten Gefäßen mit dem perkutanen Simpson Atherektomie-Katheter (p-SAC) behandelt [99,100]. Bei dieser interventionellen Technik wird perkutan in der Leiste ein Katheter eingeführt, der bis zur Engstelle vorgeschoben wird. An der Spitze des Katheters befindet sich eine halboffene Metallhülse, in der mit 2000 rpm ein Rundmesser rotiert. Durch das Aufblasen eines Ballons an der Rückseite wird die Metallhülse auf das stenosierende Gewebe gedrückt, das nun durch Vorschieben des beweglichen Rundmessers abgetragen und in einer distal gelegenen Metallkammer abgelagert wird. Sofort nach Extraktion im Klinikum Großhadern, München, erfolgte die sterile Verschickung des Materials im HEPES-gepuffertem Medium (15 mM) zur Aufarbeitung ins Physiologische Institut in Tübingen. Mit dem Simpson-Katheter wurde Plaquematerial aus folgenden Gefäßlokalisationen entnommen:

- A. femoralis superficialis
- A. poplitea
- A. iliaca
- A. renalis.

Bei 20 Patienten (Alter:  $62 \pm 13$  Jahre,  $\bar{x} \pm SD$ ) handelte es sich um den ersten Eingriff am betreffenden Gefäßsegment und somit um primär-stenosierendes Plaquematerial (Abb. 3). Bei 6 Patienten (Alter:  $66 \pm 9$  Jahre,  $\bar{x} \pm SD$ ) wurden früher bereits Manipulationen an dieser Stelle durchgeführt, somit lag in diesen Fällen re-stenosierendes Gewebe vor (Abb. 5).

Nach angiographischen Kriterien wurde der Stenosierungsgrad bei primär-stenosierenden Läsionen von  $96 \pm 7 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $28 \pm 19 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) gesenkt, bei restenosierenden Läsionen von  $89 \pm 7 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) auf  $19 \pm 14 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ). Für beide Gruppen gemeinsam errechnete sich durchschnittlich vor Intervention ein Stenosierungsgrad von  $95\% \pm 8 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ), der nach Intervention auf  $26 \pm 19 \%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) reduziert wurde. Zur Überprüfung des Erfolges wurde bei fraglichen Fällen eine angioskopische Kontrolle durchgeführt [5].

Insgesamt wurden 187 Plaquezylinder aufgearbeitet, 149 aus Primärstenosen und 38 aus Restenosen. Pro Atherektomie variierte die Anzahl der entnommenen Gewebestückchen beträchtlich; sie schwankte zwischen einer und 17 Entnahmen. Bei Primärstenosen errechneten sich durchschnittlich  $7.5 \pm 6.0$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) Zylinder pro Eingriff und bei Restenosen  $6.3 \pm 4.5$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) Zylinder pro Eingriff. Das Gesamtgewicht des aufgearbeiteten Plaquegewebes betrug 1879 mg, hiervon entfielen 1609 mg auf Primärstenosen und 270 mg auf Restenosen. Pro Zylinder betrug das Durchschnittsgewicht bei den Primärstenosen 10.8 mg, bei den Restenosen 7.1 mg. Das Feuchtgewicht des gesamten extrahierten Plaquematerials pro Eingriff schwankte bei Primärstenosen deutlich; hier ergaben sich Werte zwischen 6 mg und 347 mg, durchschnittlich wurden  $80 \pm 78$  mg ( $\bar{x} \pm SD$ ) Plaquegewebe entnommen. Bei Plaquematerial aus re-stenosierenden Läsionen schwankte das Feuchtgewicht pro Eingriff zwischen 15 mg und 95 mg, durchschnittlich ergaben sich  $54 \pm 31$  mg ( $\bar{x} \pm SD$ ).

Die Kultivierung der Plaquezellen erfolgte durch enzymatische Disaggregation oder durch Auslegen nach der Explantat-Technik [6,7,42,49]. Durchschnittlich konnten pro 100 mg Plaquegewebe etwa 50 000 Zellen isoliert werden. Mehr als die Hälfte der isolierten Zellen setzte sich wegen irreversibler Schäden an der Zellmembran nicht auf dem Boden der Kulturschale ab.

#### 1.1.2. Thrombendarterektomie (OP)

Das Plaquegewebe wurde im Rahmen des normalen Operationsverlaufes entfernt (Bypass-Implantation, Rekanalisation, Gefäßprothesen-Implantation), so daß dem Patienten hierdurch keine zusätzlichen Belastungen entstanden. Sofort nach Extraktion in der gefäßchirurgischen Abteilung des Klinikums Großhaderns, München und der Abteilung für Herzchirurgie der Landeskrankenanstalten Salzburg, wurde das Material unter sterilen Bedingungen in einem HEPES-gepufferten Medium (15 mM) zur Aufarbeitung ins Physiologische Institut nach Tübingen geschickt.

Patient	Alter/ Geschlecht	Stenosegrad %		Lokalisation	Plaqueszylinder	Feuchtgewicht in mg	Wachstumsraten in PD/die
		prä	post				
1. D.M.	73 a / w	95	15	A. fem. sup.	5	52	n.g.
2. P.K.	63 a / m	100	15	A. fem. sup.	14	184	n.g.
3. F.J.	45 a / m	100	30	A. fem. sup.	7	81	n.g.
4. M.E.	70 a / w	100	100	A. fem. sup.	4	57	0.188 P1
5. D.R.	48 a / w	99	10	A. fem. sup.	3	21	n.g.
6. S.M.	73 a / m	99	30	A. fem. sup.	21	167	n.g.
7. S.C.	64 a / w	99	30	A. fem. sup.	22	347	n.g.
8. S.J.	61 a / m	100	15	A. fem. sup.	7	51	n.g.
9. E.O.	80 a / m	80	30	A. fem. sup.	14	124	0.147 P1
10. T.J.	41 a / w	95	20	A. renalis	3	23	n.g.
11. R.W.	48 a / m	100	50	A. fem. sup.	5	43	n.g.
12. B.V.	63 a / m	100	30	A. fem. sup.	11	98	n.g.
13. H.F.	54 a / m	95	15	A. poplitea	1	6	n.g.
14. S.A.	75 a / w	100	30	A. fem. sup.	9	88	n.g.
15. M.F.	64 a / m	95	15	A. fem. sup.	2	102	n.g.
16. L.M.	38 a / w	100	25	A. fem. sup.	2	14	0.204 P1
							0.187 P2
							0.308 P3
17. P.H.	78 a / w	95	15	A. fem. sup.	3	8	n.g.
18. Z.C.	89 a / m	100	30	A. fem. sup.	3	33	n.g.
19. L.O.	60 a / m	70	20	A. fem. sup.	3	36	n.g.
20. B.E.	58 a / m	95	30	A. fem. sup.	10	74	0.487 P1

Abb. 3: Datenblatt für primär-stenosierendes Plaquematerial, Entnahme mit p-SAC. (n.g. = nicht gemacht).

Patient	Alter/ Geschlecht	Lokalisation	Feuchtgewicht in mg	Wachstumsraten in PD/die
1. O.T.	69 a / m	A. fem. sup.	900	0.220 P1
2. S.W.	57 a / m	Aorta abd.	2948	0.181 P1
3. B.A.	67 a / m	A. fem. sup.	38	n.g.
4. H.L.	71 a / m	A. carotis	865	0.281 P1
5. M.K.	55 a / m	Aorta abd.	3204	n.g.
6. H.S.	59 a / m	A. fem. sup.	727	n.g.
7. G.W.	77 a / m	A. carotis	650	n.g.
8. S.J.	77 a / m	A. fem sup.	842	n.g.
9. **	56 a / w	LAD-Bypass	77	n.g.
10. **	65 a / w	LCA	237	0.233 P1
11. **	61 a / m	A. carotis	460	n.g.
12. **	68 a / w	RCA	206	0.104 P1
13. **	58 a / m	LAD-Bypass	50	n.g.
14. **	60 a / m	RCA	685	n.g.
15. **	41 a / m	RCA	362	n.g.
16. **	67 a / w	RCA	165	n.g.
17. **	56 a / m	LCA	52	n.g.
18. **	61 a / m	LCA	67	n.g.

Abb. 4: Datenblatt für primär-stenosierendes Plaquematerial, operative Entnahme. (n.g. = nicht gemacht).

Restenosierendes Plaquematerial (p-SAC)									
Patient	Alter/ Geschlecht	Stenosegrad % prä	Stenosegrad % post	Lokalisation	Plaquezylinder	Feuchtgewicht in mg	Wachstumsraten in PD/die		
1. B. *	73 a / w	90	0	A. fem. sup.	6	95	0.525 P1		
							0.493 P2		
							0.245 P6		
2. B.S.	52 a / w	99	10	A. fem. sup.	15	79	0.750 P2		
							0.798 P3		
							0.000 P5		
3. F.G.	59 a / m	80	35	A. fem. sup.	2	23	n.g.		
4. M.A.	75 a / m	85	30	A. iliaca	1	15	n.g.		
5. D.M.	75 a / w	*	*	A. fem. sup.	6	58	n.g.		
6. **	62 a / m	*	*	A. fem. sup.	8	*	0.500 P0		

Restenosierendes Plaquematerial (OP)									
Patient	Alter/ Geschlecht	Lokalisation	Feuchtgewicht in mg	Wachstumsraten in PD/die					
1. P.F.	55 a / m	A. fem. sup.	2534	0.495 P1					
2. R.C.	64 a / w	A. carotis	103	0.332 P1					
3. **	69 a / m	RCA	199	0.698 P1					

Abb. 5: Datenblatt für re-stenosierendes Plaquematerial, Entnahme mit p-SAC und bei operativen Eingriffen.

Durch dieses Verfahren wurde primär-stenosierendes Plaquematerial von 18 Patienten (Alter:  $63 \pm 9$  Jahre) und re-stenosierendes Plaquematerial von 3 Patienten (Alter:  $63 \pm 6$  Jahre) extrahiert (Abb. 4, Abb. 5). Die Entnahme erfolgte aus folgenden Gefäßlokalisationen:

- A. femoralis superficialis
- Aorta abdominalis
- A. carotis
- Aortocoronare Venenbypässe
- Aa. coronariae (RCA, LCA)

Bei der operativen Entnahme war die Ausbeute an Plaquematerial deutlich höher als bei der perkutanen Intervention. Das Gesamt-Feuchtgewicht des extrahierten Gewebes lag bei 15 371 mg, auf Primärstenosen entfielen 12 535 mg, auf Restenosen 2 836 mg.

Das Gewicht des extrahierten Plaquematerials pro Eingriff schwankte extrem und reichte von 38 mg bis 3 204 mg, das durchschnittliche Gewicht bei operativer Entnahmen betrug  $732 \pm 935$  mg ( $\bar{x} \pm SD$ ).

Erwartungsgemäß zeigte sich eine klare Korrelation zwischen dem Gefäßkaliber und dem pro Eingriff entnommenem Plaquematerial:

A. coronaria:	$219 \pm 176$ mg ( $\bar{x} \pm SD$ )
A. carotis:	$519 \pm 280$ mg ( $\bar{x} \pm SD$ )
A. fem. sup.:	$1008 \pm 823$ mg ( $\bar{x} \pm SD$ )
Aorta abd.:	$3076 \pm 128$ mg ( $\bar{x} \pm SD$ )

Insgesamt lag das Feuchtgewicht des intraoperativ entfernten Plaquegewebes deutlich über dem mit dem p-SAC entfernten. Inwieweit dies eine Auswirkung auf die proliferative Effizienz und die Populationsverdopplungsraten hat, wird in Abschnitt D.1.6.2. u. D.1.6.3. dargestellt.

Ebenso wie beim perkutan extrahierten Gewebe konnten aus 100 mg Plaquegewebe etwa 50 000 Zellen isoliert werden. Die Zahl der Zellen, die sich nicht auf dem Substrat absetzen konnten lag deutlich über 50 %.



## **1.2. Aufarbeitung des Plaquematerials**

Um aus dem extrahierten Plaquematerial Zellen zu gewinnen wurden zwei Techniken angewendet (Übersichtsdarstellung in Abb. 6):

1. Die Explantat-Technik
2. Die enzymatische Disaggregation

### **1.2.1. Explantat-Technik**

Bei der Explantat-Technik kam es in der Regel nach 3 - 4 Tagen zum Auswachsen der ersten Zellen aus dem explantierten Gewebe-Stückchen. Voraussetzung hierfür war allerdings, daß das Explantat festen Kontakt zur Bodenfläche finden konnte. In etwa 25% der explantierten Plaquestückchen bildete sich ein dichter Zellrasen um das explantierte Plaquestückchen (Abb. 7).

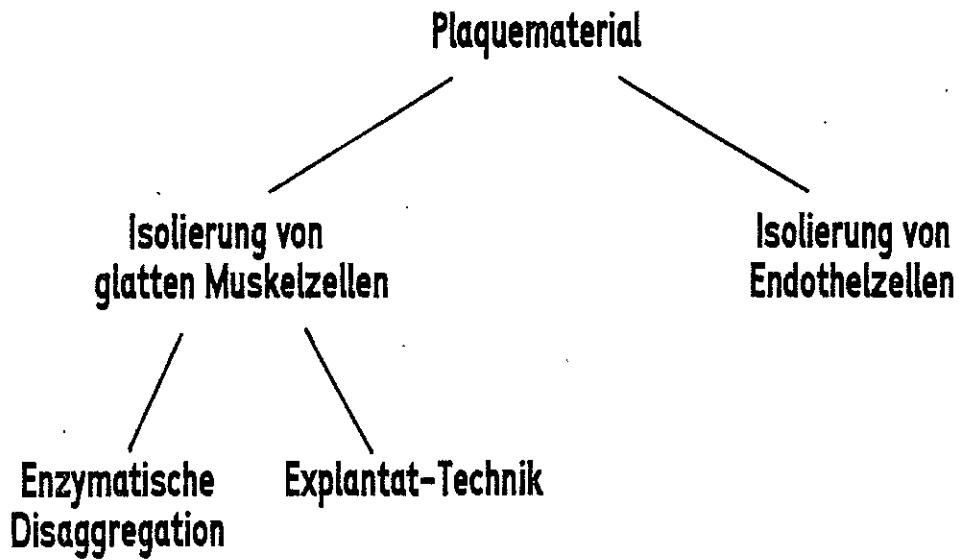
Der Prozeß des Auswachsens aus dem Explantat gliedert sich in Migration und Proliferation. Teilweise handelt es sich hierbei somit um eine Wiederholung des Vorgangs bei der Atherogenese, da die Zellen in der Plaque bereits von der Media in den subendothelialen Raum ausgewandert sind, nachdem sie die Transformation vom kontraktilen Mediamyozyten zum metabolisch aktiven Myozyten durchgemacht haben.

Die Zellen, die aus dem Explantat auswachsen, stellen somit eine Selektion von Zellen dar, die bereits zum zweiten Mal die Migration und Proliferation durchführen können. Da darüberhinaus nicht alle Zellen gleichzeitig aus dem Explantat migrieren und proliferieren, erhält man Zellen mit unterschiedlichem und schwer abschätzbaren *in vitro*-Alter. Aus diesem Grunde wurden Zellen, die durch Explantat-Technik gewonnen wurden, nicht für Proliferationsstudien herangezogen.

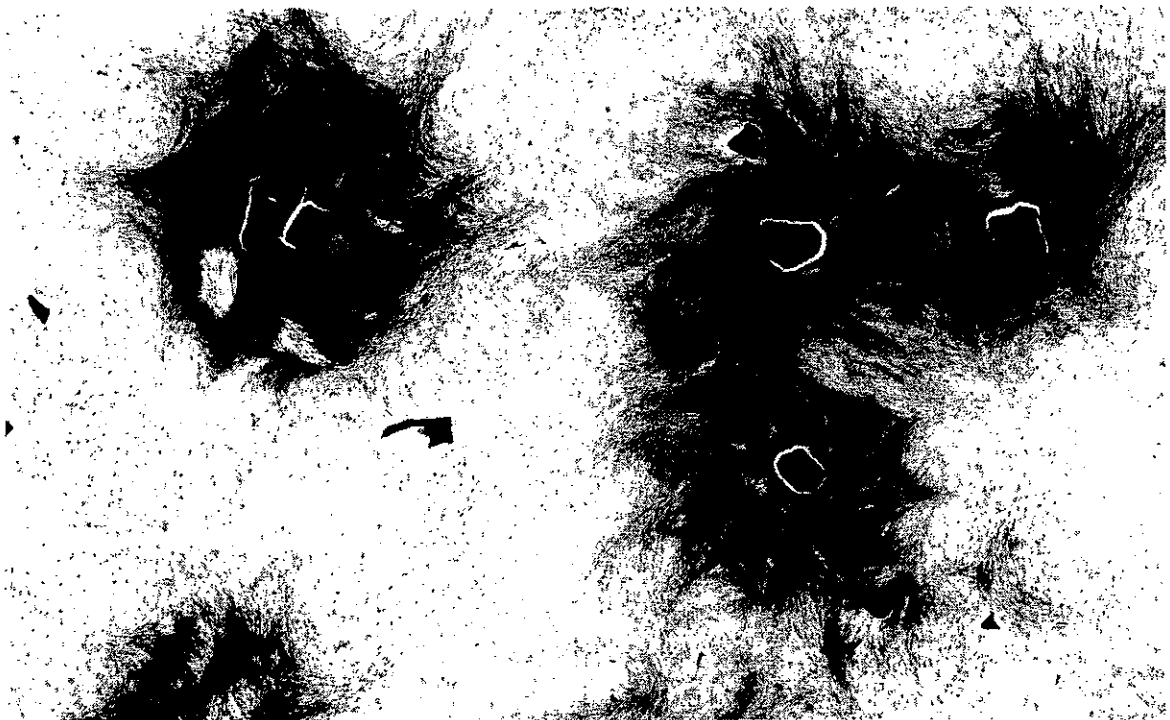
### **1.2.2. Enzymatische Disaggregation**

Bei dieser Technik werden alle Zellen, die im Verlauf der Atherogenese einmal die Migration und Proliferation aus der Media in den subendothelialen Raum durchgeführt haben, aus der atherosklerotischen Plaque isoliert.

Da die Lösung aus dem Plaquegewebe für alle Zellen gleichzeitig erfolgt, haben alle Zellen das gleiche *in vitro* Alter. Allenfalls wäre eine gewisse Selektion von



**Abb. 6:** Aufarbeitungsübersicht für die Isolierung von Zellen aus Plaquematerial: Isolierung von glatten Muskelzellen: Enzymatische Disaggregation und Explantat-Technik. Isolierung von Endothelzellen: Enzymatische Disaggregation.



**Abb. 7:** Explantat-Technik: Nach 3 Wochen haben sich um die explantierten Plaquestückchen dichte Zellhöfe gebildet. Coomassie-Giemsa-Färbung. Vergrößerung: 5-fach.

Zellen zu diskutieren, die gegen die Enzymlyse resistent sind. Im Gegensatz zur Explantat-Methode müssen diese Zellen nicht ein zweites Mal die Migration durchführen.

Diese Zellen sind sehr gut für Proliferationsstudien in vitro geeignet.

### **1.3. Identifizierung der Zellen und Zytoskelett - Darstellung**

Jede eukaryontische Zelle ist von einem komplexen Netzwerk aus Proteinfasern durchzogen. Dieses sogenannte Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen, Zellbewegung, Zellteilung und der Aufrechterhaltung der Zellgestalt. Im Einzelnen unterscheidet man drei Hauptbestandteile:

- Aktin-haltige Mikrofilamente mit einer Dicke von 6 nm
- Intermediäre Filamente mit einer Dicke von 7 -11 nm
- Mikrotubuli mit einer Dicke von etwa 20 nm

Glatte Muskelzellen zeichnen sich durch das Vorkommen von glattmuskulärem  $\alpha$ -Aktin im Zytoskelett aus [149,205,206]. 1985 und 1986 ist es gelungen, gegen das N-terminale Ende des glattmuskulären  $\alpha$ -Aktins monoklonale Antikörper herzustellen [85,183]. Diese Antikörper sind kommerziell erhältlich (siehe Abschnitt B 2.4.) und wurden in den dargestellten Untersuchungen zur Zellidentifikation eingesetzt. Über 80% der isolierten Zellen zeigten eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin (Abb. 8, Abb. 9) und konnten somit als glatte Muskelzellen (SMC) identifiziert werden [42,49].

Bei der Gruppe der intermediären Filamente lassen sich drei Gruppen unterscheiden [121,122,193].

Die Mehrheit der isolierten SMC zeigte eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen Vimentin (Abb. 10). Die Vimentinfasern durchzogen als wellenförmige Fasern mit strahlenförmigem Verlauf das Zytoplasma, wie bereits für 3T3-Zellen beschrieben [72]. Nur etwa 1% der kultivierten SMC reagierte positiv mit Antikörpern gegen Desmin. Die Mikrotubuli ordneten sich als "Microtubule Organizing Centers" um den Zellkern an und strahlten als Netzwerk bis in die kleinsten Zellausläufer (Abb. 11).

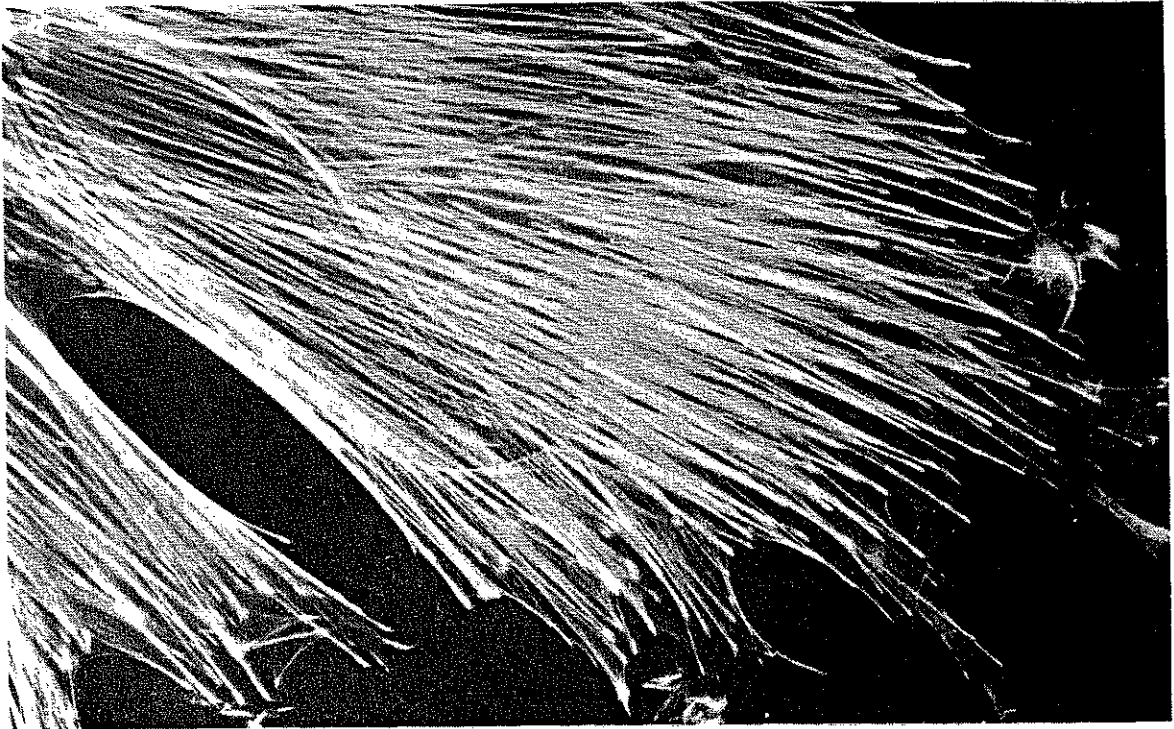


Abb. 8: Durch positive Reaktion mit monoklonalen Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin konnte die weit überwiegende Zahl der Plaquezellen als glatte Muskelzellen identifiziert werden. Auflichtfluoreszenz. Vergrößerung: 450-fach.

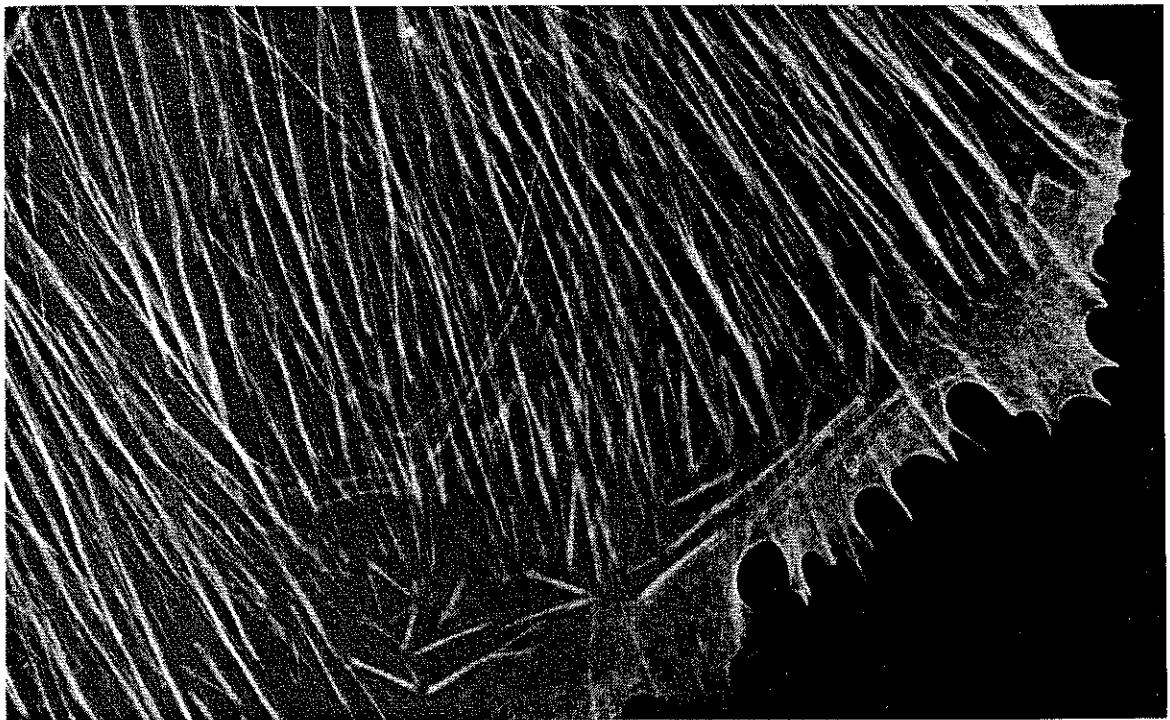


Abb. 9: Positive Reaktion mit monoklonalen Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin. Auflichtfluoreszenz. Vergrößerung: 700-fach.

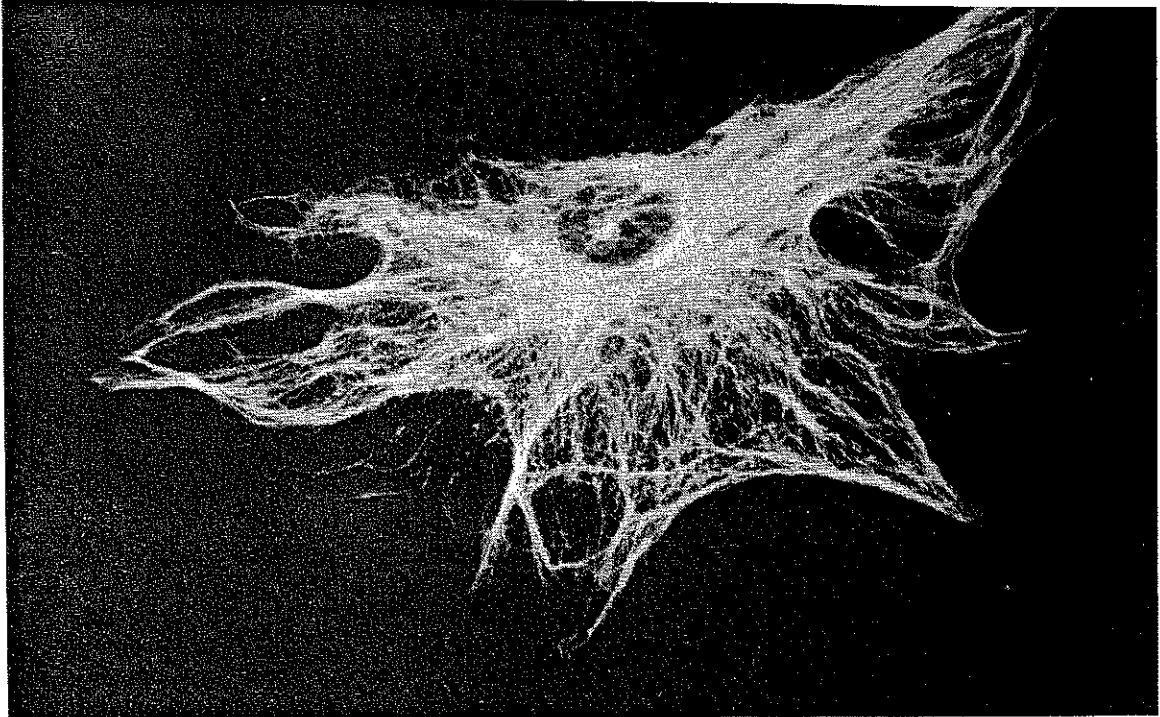


Abb. 10: Vimentin-Darstellung bei SMC aus stenosierendem Plaquematerial. Die Vimentin-Bündel verlaufen strahlenförmig von der Umgebung des Zellkerns zur Peripherie. Auflichtfluoreszenz. Vergrößerung: 570-fach.

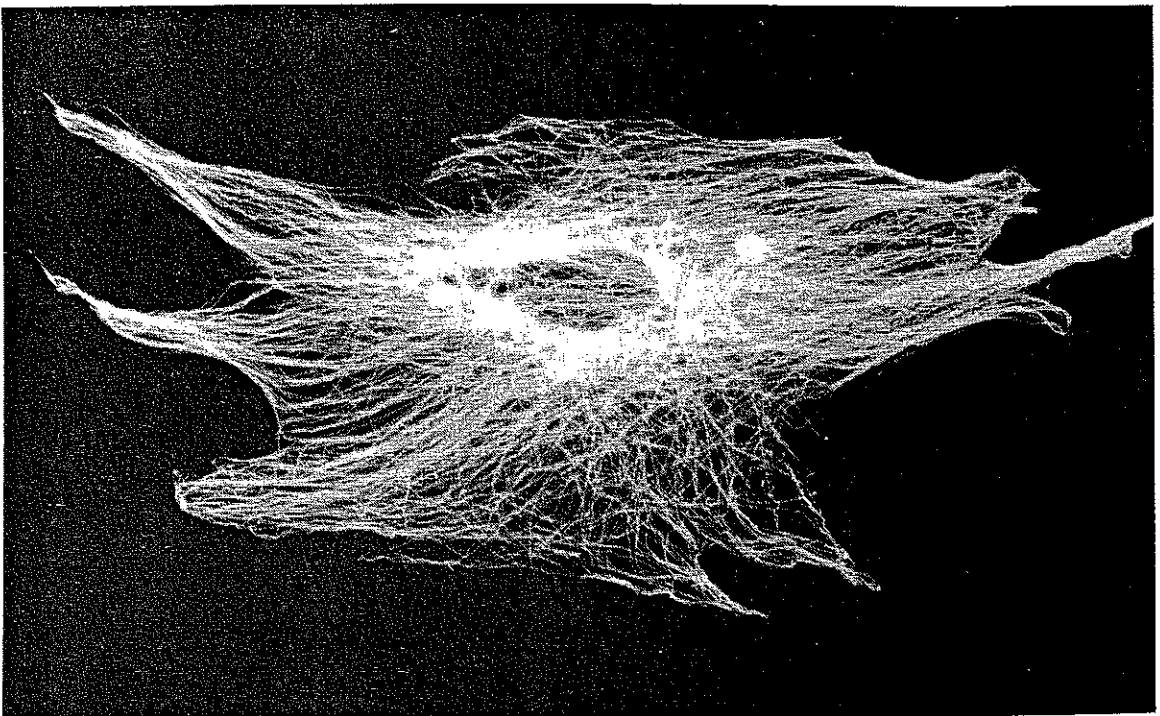


Abb. 11: Darstellung der Mikrotubuli mit indirekten Immunfluoreszenz. Von sog. 'Mikrotubuli-Organizing Centers' im perinukleären Bereich verlaufen die Mikrotubuli in Richtung Zellperipherie. Auflichtfluoreszenz. Vergrößerung: 570-fach.

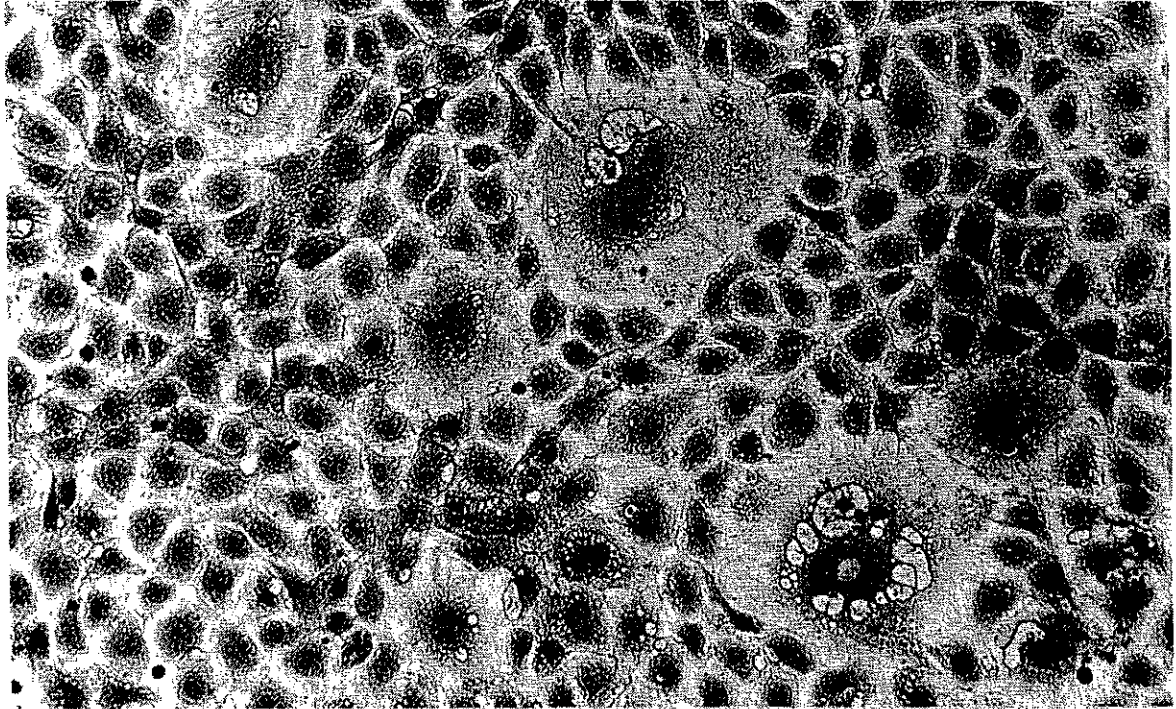


Abb. 12: Endothel-Zellen mit typischem 'cobblestone'-Wachstumsmuster.  
Coomassie-Giemsa-Färbung. Vergrößerung: 175-fach.

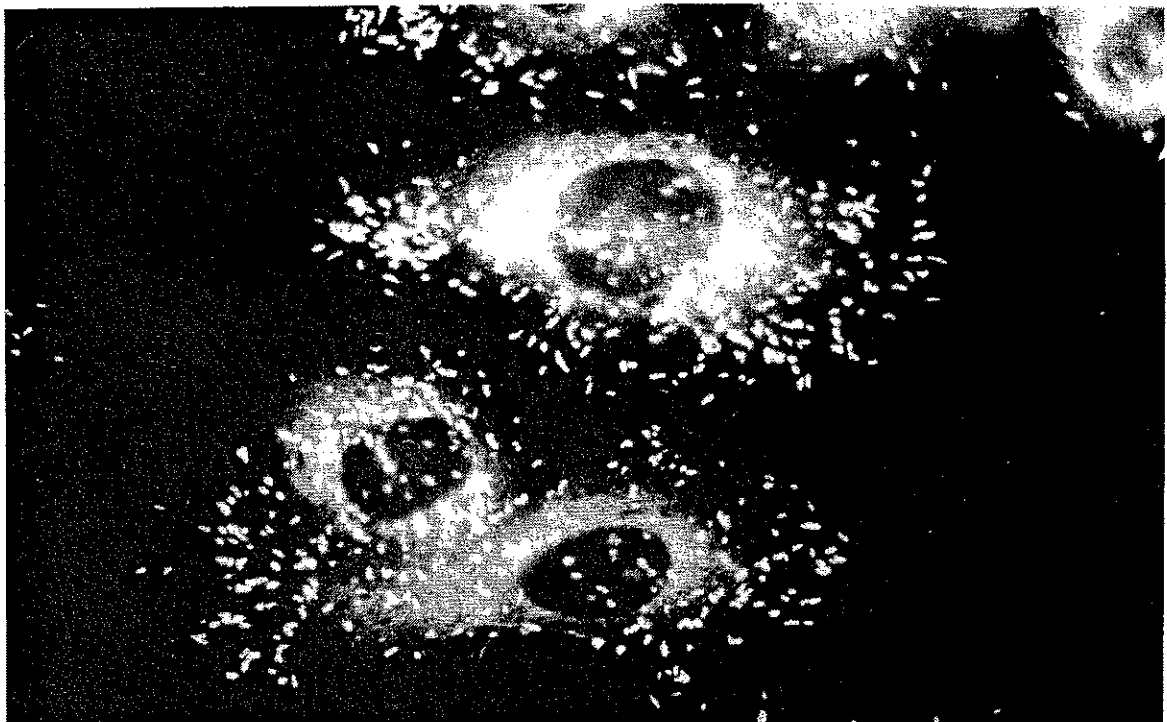


Abb. 13: Positive Reaktion mit Faktor-VIII assoziiertem Antigen zur Identifikation  
von Endothelzellen. Auflichtfluoreszenz. Vergrößerung: 700-fach.

Lediglich bei koronarem Plaquematerial zeigten sich vereinzelt Endothelzellen in Kultur (Abb. 12). Die Identifikation konnten durch positive Reaktion mit Antikörpern gegen das Faktor VIII-assoziierte Antigen (Abb.13) durchgeführt werden [107]. Da die Kulturbedingungen jedoch nicht für Endothelzellen ausgelegt waren, war ein Nachweis dieser Zellen bereits in der ersten Subkultur nicht mehr möglich.

#### 1.4. Morphologie der Plaquezellen

Nach Aussaat und Absetzen der Zellen nahmen die SMC eine spindelförmige Gestalt an. Obwohl die Größe der einzelnen Zellen erheblich schwankte, hatte die Mehrheit der ausgebreiteten Zellen in etwa eine Länge von etwa 100 - 200  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 20 - 50  $\mu\text{m}$ . Mit zunehmendem Alter und abnehmendem Zellwachstum vergrößerte sich der Zellumfang und nahm eher segelförmige Umrisse an, die an Fibroblasten erinnerten. Im Gegensatz zu Endothelzellen sind SMC kaum kontakthibiert; aus diesem Grunde kam es nach Erreichen der Konfluenz zur Ausbildung des für SMC typischen "hill and valley"-Musters (Abb 14).

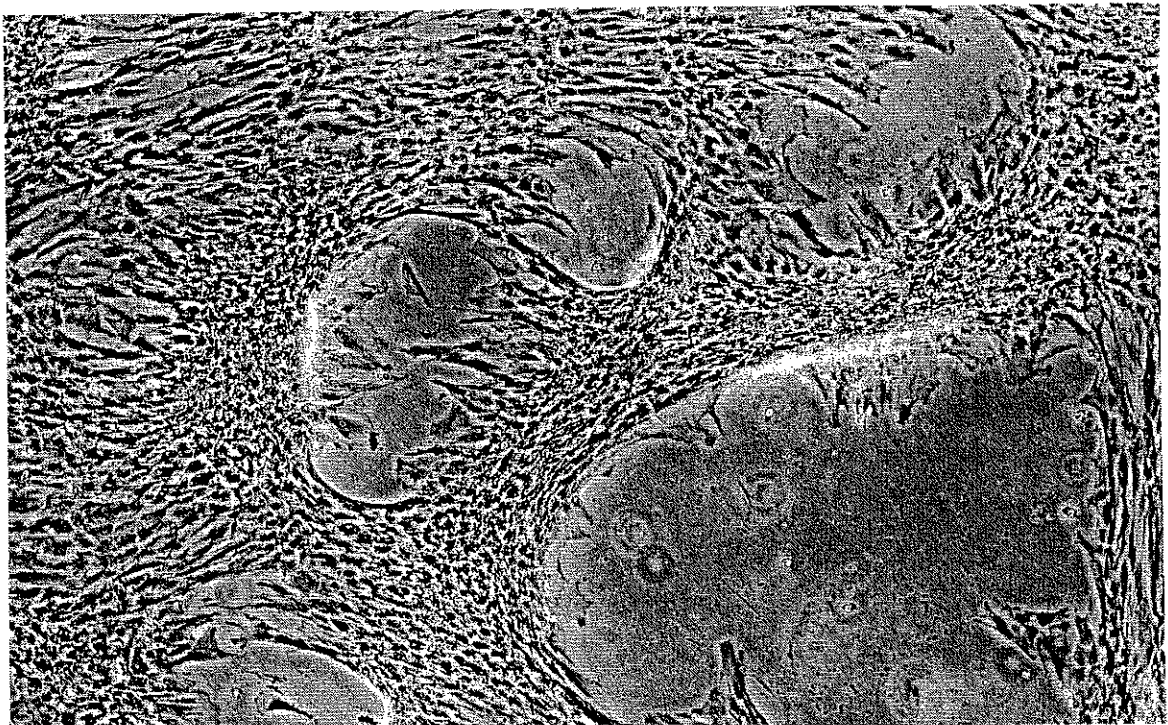


Abb. 14: Das Ausbilden des 'hill and valley' - Musters entsteht durch das Über-  
einanderschichten der Zellen und ist ein morphologisches Merkmal zur Identifi-  
zierung von glatten Muskelzellen. Phasenkontrast. Vergrößerung: 35-fach.

Ein weiteres typisches Merkmal von kultivierten SMC ist in der Bildung von "nodules" (Abb. 15, Abb. 16) zu sehen. Hierunter versteht man lokale Übereinanderschichtungen der Zellen bereits vor Erreichen der Konfluenz. Sowohl die Bildung der "hill and valley"-Strukturen als auch die Bildung der "nodules" sind typisch für SMC, die zusätzlich zur indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Zellidentifikation herangezogen werden können.

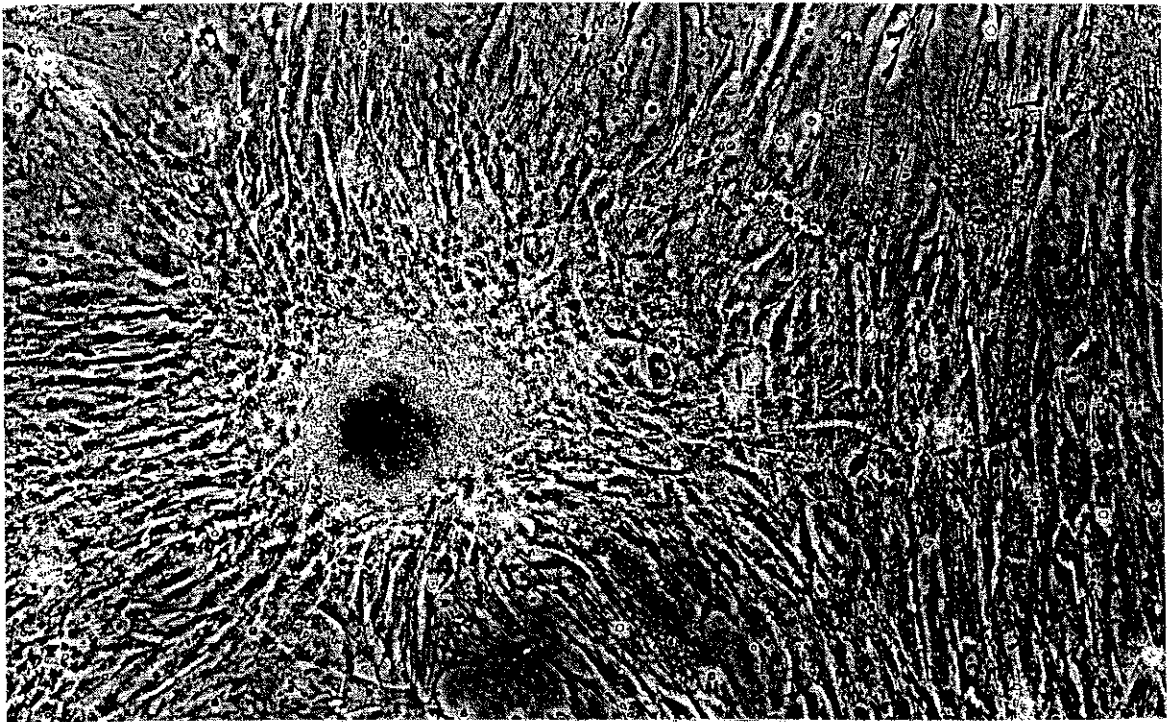


Abb. 15: Kultivierte glatte Muskelzellen mit sogenannten 'nodules', einem typischem morphologischem Kennzeichen für glatte Muskelzellen. Phasenkontrast. Vergrößerung: 35-fach.

### 1.5. Klonierungseffizienz

Mit SMC aus der unveränderten Gefäßwand konnten in wenigen Versuchsansätzen definierte Klone erhalten werden. Wegen der geringen und stark schwankenden Anzahl der Klone konnte jedoch eine Klonierungseffizienz nicht angegeben werden. Mit SMC aus primärstenosierenden atherosklerotischen Läsionen gelang überhaupt keine Klonierung, bei restenosierenden Läsionen wurden klonähnliche Strukturen erzielt. Da diese Strukturen jedoch nicht eindeutig auf eine Ausgangszelle zurückgeführt werden konnten, war auch hier die Angabe einer Klonierungseffizienz nicht möglich.



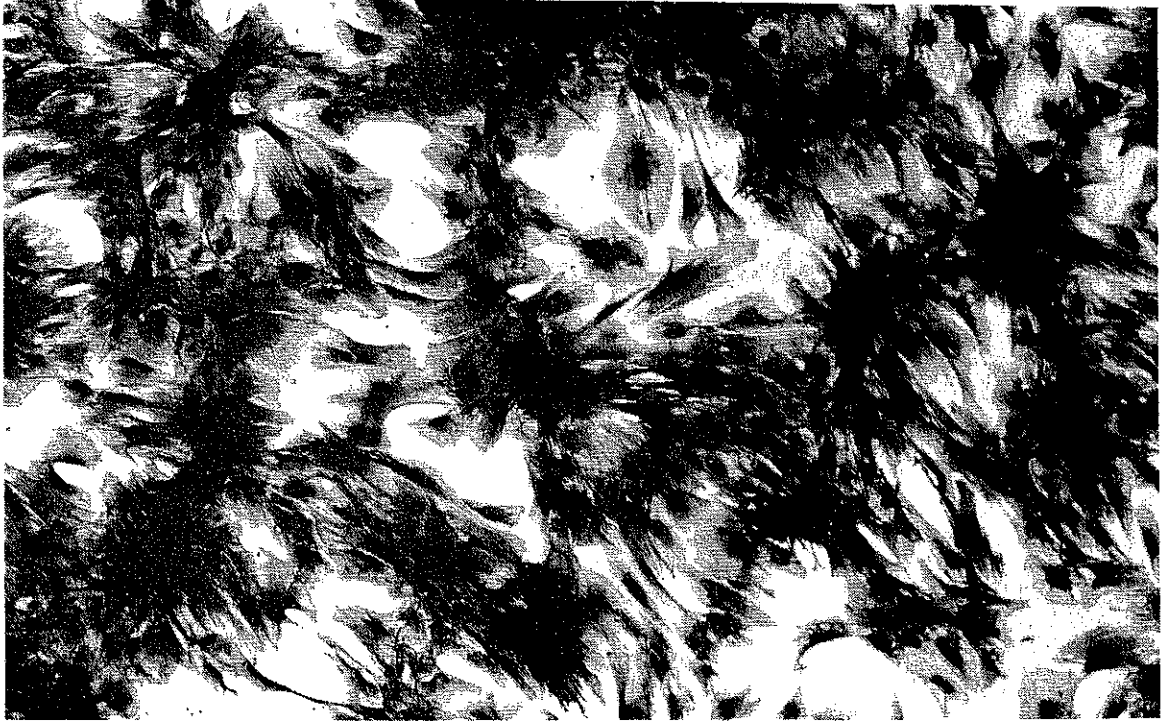


Abb. 16: Zahlreiche 'nodules' in einer Kultur von glatten Muskelzellen. Coomassie-Giemsa-Färbung. Vergrößerung: 85-fach.

## 1.6. Wachstumsverhalten der Plaquezellen

### 1.6.1. Zellgrößenverteilung

Detaillierte Bestimmungen der Zellgrößenverteilung wurden erst in der ersten Subkultur durchgeführt, da die Zellzahl in Primärkulturen nicht ausreichend war. Bei allen Plaquezellen zeigte sich ein hoher Anteil an Zelldebris, der bei SMC aus der unveränderten Gefäßwand nicht beobachtet wurde. Bei Plaquezellen aus primär-stenosierenden Läsionen (Abb. 17 A) war der Anteil an Zelldebris höher als bei Plaquezellen aus restenosierenden Läsionen (Abb. 17 B). Mit zunehmendem in vitro-Alter kam es bei Plaquezellen aus restenosierendem Gewebe ebenfalls zu einem Ansteigen des Zelldebris [49].

Ein weiterer wichtiger Unterschied zu SMC aus der gesunden Gefäßwand wurde bei der Zellgrößenverteilung der isolierten Plaquezellen deutlich. Während bei SMC aus der unveränderten Gefäßwand lediglich eine Häufung der Zelldurchmesser beobachtet wurde, konnten bei allen Plaquezellen zwei Durchmessermaxima beschrieben werden (Abb. 17). Unter der Vorstellung, daß es sich hierbei

um zwei Subpopulationen handeln könnte, wurden die beiden Maxima SP-1 und SP-2 genannt. Für die SMC aus Plaquematerial, das mit dem p-SAC extrahiert wurde (p-SAC-SMC), ergaben  $18.6 \pm 5 \mu\text{m}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) für die SP-1 und  $27.1 \pm 3 \mu\text{m}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) für die SP-2. Obwohl auch bei Plaquezellen aus primär-stenosierenden Läsionen die Mehrheit der Zellen zur SP-1 gehörte (Abb. 17 A), war bei Plaquezellen aus restenosierendem Gewebe dieser Prozentsatz noch höher (Abb. 17 B).

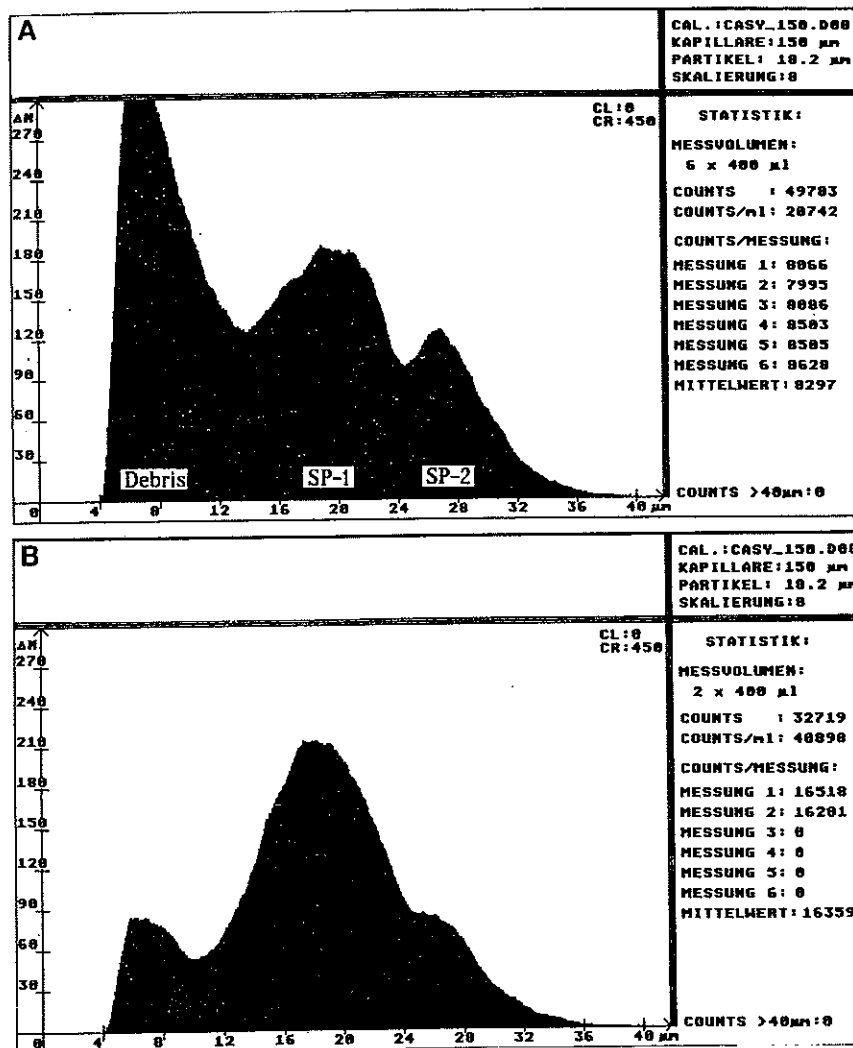


Abb. 17: Darstellung der Zellgrößenverteilung von glatten Muskelzellen aus primär-stenosierendem (A) und aus re-stenosierendem Plaquematerial (B). Es können zwei Subpopulationen (SP-1 und SP-2) unterschieden werden.

### 1.6.2. Proliferative Effizienz

Die Kultivierung von Plaquezellen erwies sich erwartungsgemäß als schwierig. Obwohl es in fast allen Fällen gelang, einige SMC zu isolieren und in die Kulturschale zu transferieren, war es nur wenigen Zellen möglich, sich auf dem Substrat abzusetzen und mit der Proliferation zu beginnen.

In den Fällen, in denen die Proliferation begonnen wurde, kam es in einigen Fällen zum spontanem Einstellen der mitotischen Tätigkeit, bevor genügend Zellen für die Aussaat einer Wachstumskurve vorlagen. Um eine Wachstumskurve über den Zeitraum von etwa 14 Tagen mit Doppel- bzw. Dreifach-Kontrollen durchführen zu können, werden bei der angestrebten Aussaatdichte von 2000-3000 Zellen/cm<sup>2</sup> etwa 500 000 bis 750 000 Zellen benötigt.

Die proliferative Effizienz "E" in Prozent wurde definiert als die Anzahl der Gewebeproben, aus denen sich über 500 000 Zellen züchten ließen / Gesamtzahl der aufgearbeiteten Proben x 100. Sie gibt somit den Prozentsatz der Gewebeproben an, aus denen sich eine Wachstumskurve etablieren ließ.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse errechnet:

Für die gesamte Patientengruppe ohne weitere Einschränkung ergab sich eine proliferative Effizienz von 34%. Hierbei machte es keinen nennenswerten Unterschied, ob das Plaquematerial mit dem p-SAC oder intraoperativ entfernt wurde: 30% proliferative Effizienz in der p-SAC-Gruppe, 38% in der OP-Gruppe.

Interessant war die Untergliederung der gesamten Patientengruppe nach Primärstenosen und nach Restenosen. Bei primär-stenosierendem Plaquematerial betrug die proliferative Effizienz 24%, bei re-stenosierendem Plaquematerial jedoch 77%. Dieses Ergebnis weist auf einen aktivierten Zustand der Plaquezellen aus restenosierendem Plaquewebe hin.

Die weitere Untergliederung der Primärstenosen und Restenosen, je nachdem welche Technik zur Extraktion des Plaquematerial angewendet wurde, bestätigte bei beiden Techniken den aktivierten Zustand der SMC aus restenosierendem Plaquematerial:

Für Primärstenosen ergab sich in der p-SAC-Gruppe eine proliferative Effizienz von 20%, in der OP-Gruppe von 28%. Obwohl beide Werte klar unter der proliferativen Effizienz für re-stenosierendes Plaquematerial lagen, ergab sich somit bei operativ entferntem Plaquematerial eine etwas höhere proliferative Effizienz. Bei restenosierendem Plaquematerial wurden bei beiden Extraktionstechniken wesentlich höhere Werte erzielt: 66% proliferative Effizienz in der p-SAC-Gruppe und sogar 100% in der OP-Gruppe. Operativ extrahiertes Gewebe ließ sich auch hier öfter zur Anlage einer Wachstumskurve verwenden als p-SAC-Material.

Zusammenfassend war bei restenosierendem Plaquematerial die proliferative Effizienz mit 77% signifikant erhöht im Vergleich zu primärstenosierendem Plaquematerial mit 24%. Bei operativer Plaqueextraktion lagen die Werte jeweils höher als bei Plaqueextraktion mit dem p-SAC.

Ein Einfluß des Patientenalters auf die proliferative Effizienz des Plaquematerials wurde nicht beobachtet. Sowohl bei Primärstenosen wie bei Restenosen lag das Patientenalter durchschnittlich immer zwischen 60 und 70 Jahren.

### 1.6.3. Wachstumsraten

Trotz optimierter Kulturbedingungen konnte nur aus einem relativ geringen Teil der aufgearbeiteten Proben genügend Zellen für einen Proliferationstest gezüchtet werden. Um die Wachstumsraten der SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial (Plaque-SMC) einordnen zu können, bietet sich der Vergleich mit SMC aus der unveränderten Gefäßwand (Media-SMC) an. Die Wachstumsraten für Media-SMC werden mit etwa 0.35 PD/Tag angegeben [40], bei eigenen Untersuchungen erreichten Media-SMC ein Wachstum von 0.4 PD/Tag (siehe Abschnitt D.2.1.).

Ohne Berücksichtigung der Extraktionstechnik ergaben sich für alle vorliegenden Wachstumskurven von Primär-SMC in der ersten Passage ein Wachstum von  $0.220 \pm 0.1$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ). Diese Zahl liegt unter der Wachstumsgeschwindigkeit der SMC aus der unveränderten Gefäßwand. Aus Abb. 3 geht hervor, daß bei einem Patienten die Primär-SMC ein Wachstum von 0.487 PD/Tag aufwiesen. Bei diesem 58 jährigem Patienten wurde die Plaqueextraktion mit dem p-SAC

durchgeführt. Während des Eingriffs kam es zur Perforation der Gefäßwand mit dem Katheter, so daß bei der Plaqueextraktion wohl auch Anteile der Media entnommen wurden. Hieraus erklärt sich die hohe Wachstumsrate, die über der sonst für Primär-SMC typischen Wachstumsrate liegt.

Bei SMC aus restenosierenden Läsionen zeigte sich ein deutlich erhöhtes Wachstum der Zellen [44,49,51,53,213]. Aus den graphischen Darstellungen (Abb. 18, Abb. 19) wird das unterschiedliche Wachstum besonders deutlich. Bei Zugrundelegung aller verfügbaren Kurven ohne Unterscheidung zwischen p-SAC-Extraktion und operativer Extraktion des Plaquematerials ergab sich durchschnittlich in der ersten und zweiten Passage ein Wachstum von  $0.550 \pm 0.1$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ). Diese Rate liegt klar über den durchschnittlichen Raten für Primär-SMC und für SMC aus der unveränderten Gefäßwand. In einem Fall (siehe Tabelle) eines 52 jährigen Patienten war das Wachstum der Plaquezellen so extrem gesteigert (0.750 PD/Tag), daß fast die Wachstumsgeschwindigkeit von malignen Tumorzellen erreicht wurde (die Fibrosarkom-Zelllinie "SSK 2" erreichte im Labor beispielsweise eine Wachstumsrate von 0.8 PD/Tag).

Die weitere Untergliederung der Primär-SMC und der Re-SMC nach der angewendeten Extraktionstechnik lieferte ähnliche Ergebnisse:

Soweit es sich um primärstenosierendes Plaquematerial handelte, lagen die durchschnittlichen Wachstumsraten für p-SAC-SMC mit  $0.257 \pm 0.1$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ) etwas über den durchschnittlichen Wachstumsraten für OP-SMC mit  $0.191 \pm 0.05$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ). In beiden Fällen sind die Wachstumsraten wieder deutlich erniedrigt im Vergleich zu den SMC aus der unveränderten Gefäßwand.

Wenn restenosierendes Plaquegewebe kultiviert wurde, betrug die Wachstumsraten für p-SAC-SMC  $0.592 \pm 0.1$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ) und für OP-SMC  $0.508 \pm 0.2$  PD/Tag ( $\bar{x} \pm SD$ ) und lagen somit unabhängig von der Extraktionsmethode deutlich im stimulierten Bereich. Die Methode der Plaqueextraktion spielte weder bei Primär-SMC noch bei Re-SMC eine Rolle. Immer waren die Primär-SMC in ihrem Wachstum deutlich verlangsamt, die Re-SMC klar stimuliert.

Das extrem gesteigerte Wachstum der Re-SMC blieb über mehrere Passagen erhalten, bevor die Wachstumsraten sich wieder verlangsamt und schließlich

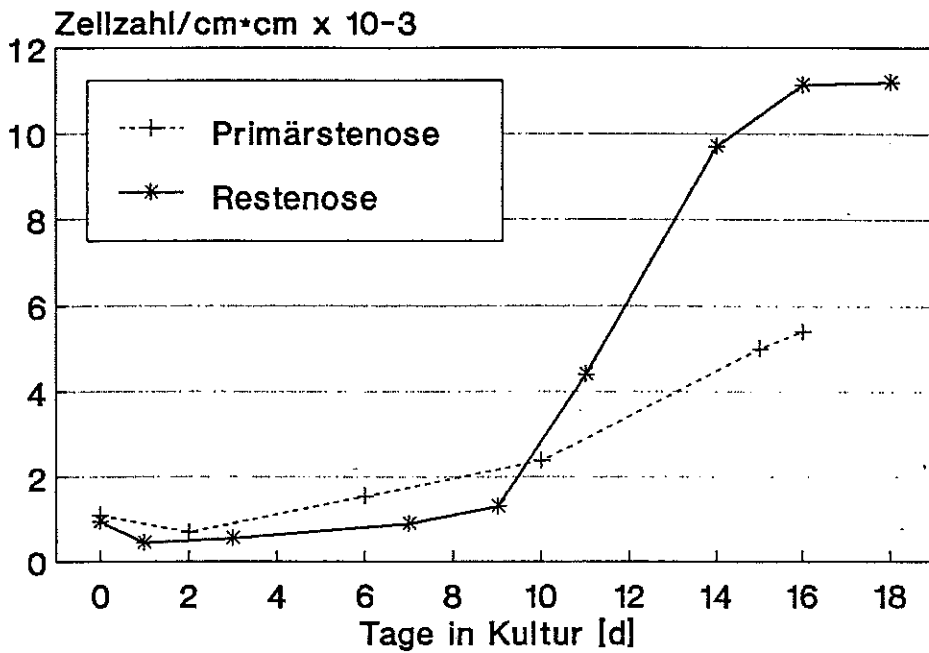


Abb. 18: Wachstumskurve für SMC aus primär- und re-stenosierendem Plaquematerial der A. fem. sup. (operative Entnahme). SMC aus re-stenosierendem Plaquematerial zeigen ein deutlich erhöhtes Wachstum.

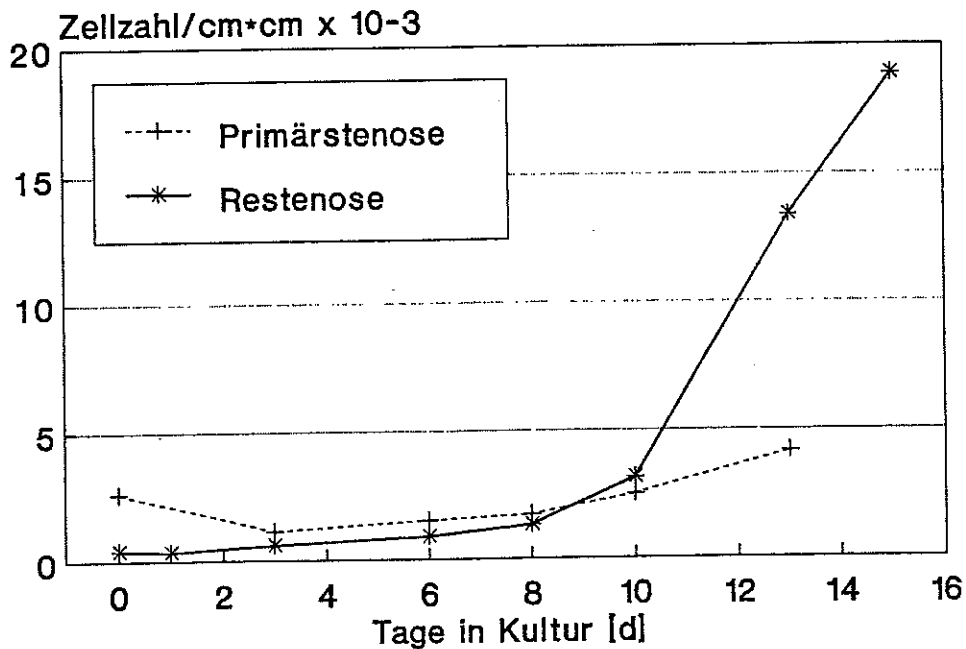


Abb. 19: Wachstumskurve für SMC aus primär- und re-stenosierendem koronarem Plaquematerial (operative Entnahme). Die Wachstumsraten der SMC aus re-stenosierendem Plaquematerial sind deutlich stimuliert.

eine Seneszenz der Re-SMC zu beobachten war. Dieser Ablauf kann anhand der Tabelle nachvollzogen werden: Bei p-SAC Restenose Pat. Nr. 1 betrug das Wachstum in der ersten Passage 0.525 PD/Tag, in der zweiten Passage 0.499 PD/Tag und in der sechsten Passage 0.245 PD/Tag. Eine Seneszenz der Zellen trat erst in der zehnten Passage auf.

Bei den untersuchten SMC aus restenosierendem Plaquematerial trat die Seneszenz der Plaquezellen um so früher auf, je schneller das Wachstum in den frühen Passagen war. Während bei p-SAC Restenose Pat. Nr. 1 mit einer maximalen Wachstumsrate von 0.525 PD/Tag die Seneszenz erst in der zehnten Passage erreicht wurde, trat sie bei p-SAC Restenose Pat. Nr. 2 mit einer maximalen Wachstumsrate von 0.798 PD/Tag bereits in der fünften Passage auf. Diese Zusammenhänge müssen sicherlich noch an einer größeren Anzahl von Restenosen untersucht werden.

Basierend auf unterschiedlichen Zelldurchmessern konnten zwei Subpopulationen der SMC unterschieden werden. Ein unterschiedliches Wachstumverhalten der SMC in Abhängigkeit vom Zelldurchmesser war zwar in einzelnen Fällen nachweisbar, bei genauer Analyse aller zur Verfügung stehender Daten zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten. Bei Primär-SMC waren beide Populationen verlangsamt, bei Re-SMC beide Populationen stimuliert (Abb. 20 - Abb. 24). Es spricht daher von seiten des Wachstumsverhaltens nichts dafür, daß die Zellen der SP-1 die aktive Rolle bei der Proliferation übernehmen, bzw. daß die Zellen der SP-2 aus seneszenten und hypertrophierten Zellen besteht.

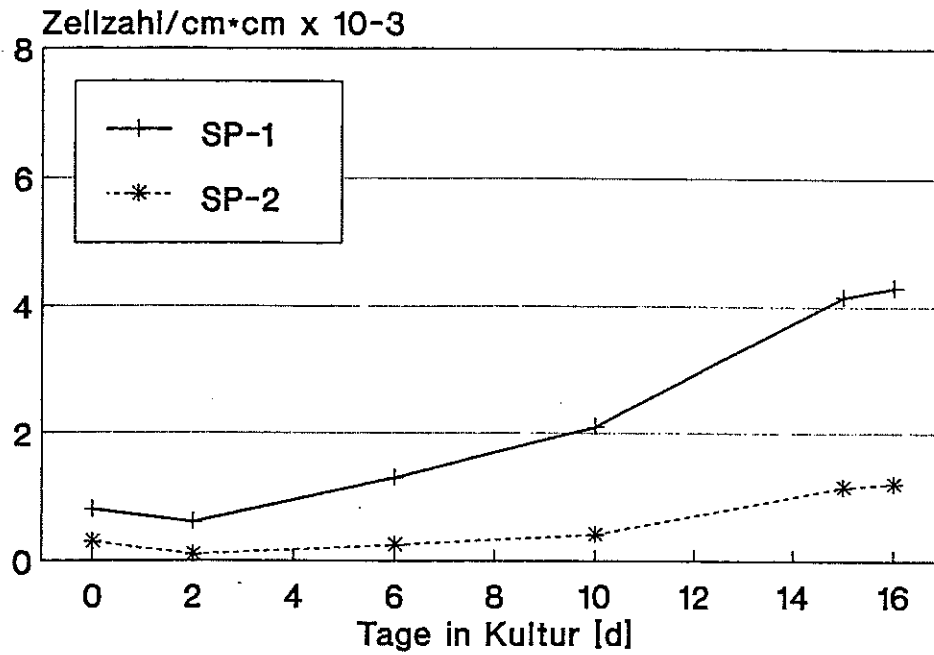


Abb. 20: Wachstumskurve für SMC aus primär-stenosierenden Plaquematerial der A. fem. sup.. Das Wachstum beider Subpopulationen (SP-1 und SP-2) ist vermindert.

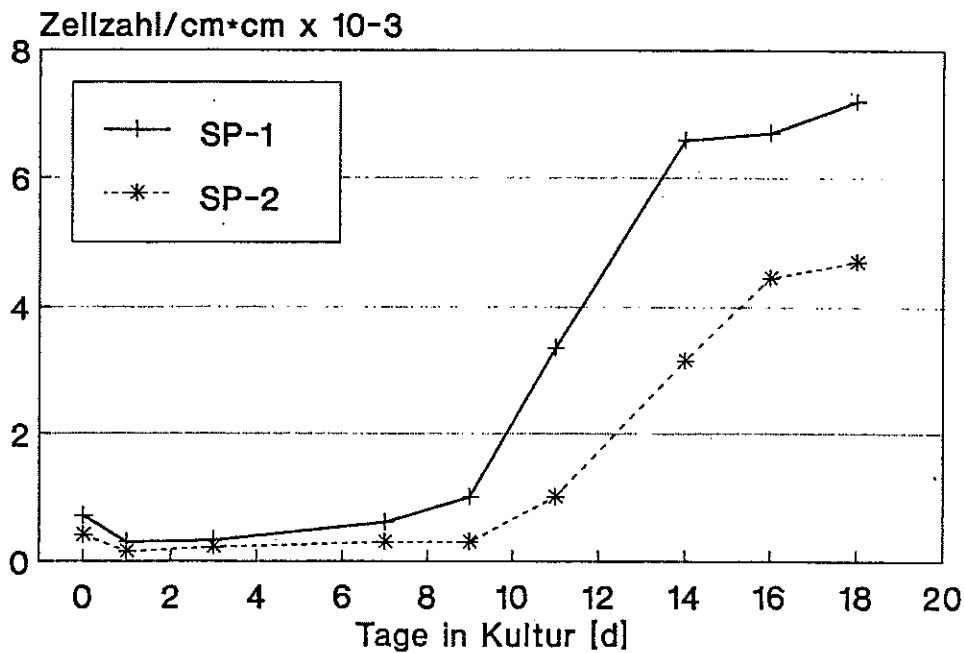


Abb. 21: Wachstumskurve für SMC aus restenosierendem Plaquematerial der A. fem. sup.. Beide Subpopulationen zeigen ein deutlich gesteigertes Wachstum.



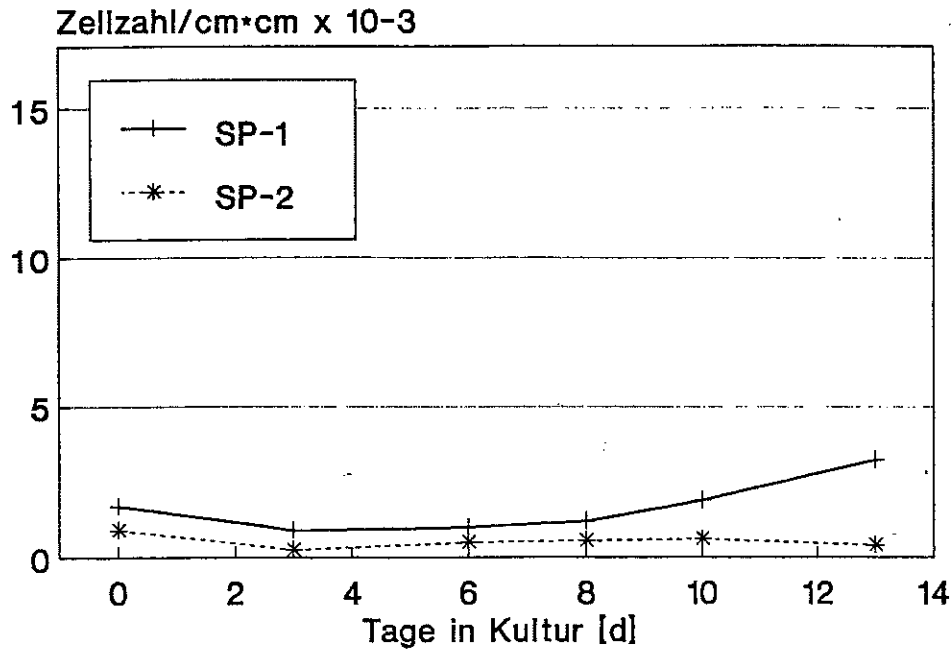


Abb. 22: Wachstumskurve für SMC aus primär-stenosierendem koronarem Plaquematerial. Das Wachstum beider Subpopulationen ist vermindert.

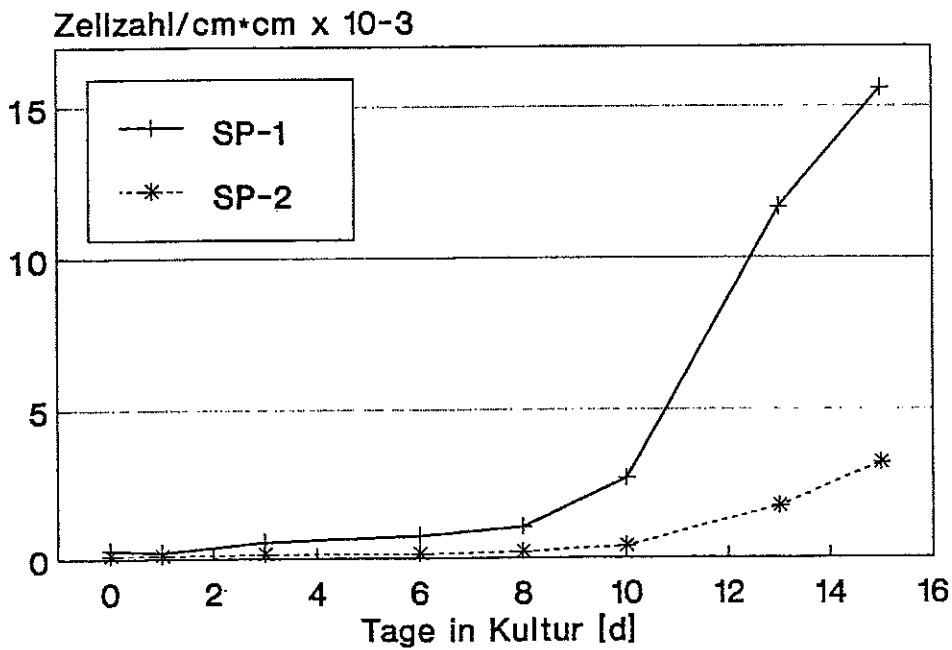


Abb. 23: Wachstumskurve für SMC aus re-stenosierendem koronarem Plaquematerial. Beide Subpopulationen zeigen ein deutlich erhöhtes Wachstum.

### 1.7. Migrationsverhalten der Plaquezellen

SMC wurden aus restenosierendem Plaquematerial der A. fem. sup. isoliert und kultiviert. In der sechsten Passage wurden sie für den Migrationstest in 6-Lochschalen ausgesät und bis zur Konfluenz angezüchtet. Der Migrationstest wurde wie in Abschnitt C 2.3 beschrieben durchgeführt.

#### 1.7.1. Migration pro mm Wundrandlänge

Die Ermittlung der Zellmigration pro mm Wundrandlänge erfolgte durch Auszählen der gefärbten Zellkerne nach einer Migrationszeit von 48 Std (Abb. 24). Im ersten Versuch schwankte die Zellzahl/mm zwischen 95 und 166, durchschnittlich ergaben sich  $125 \pm 26$  Zellen/mm Wundrandlänge. Im zweiten Versuch lag der niedrigste Wert bei 63 Zellen, der höchste bei 126 Zellen, durchschnittlich bedeutete dies eine Migration von  $96 \pm 20$  Zellen/mm Wundrandlänge. Beim dritten Ansatz schwankte die Zellzahl/mm zwischen 79 und 158, durchschnittlich ergab dies  $111 \pm 27$  Zellen/mm Wundrandlänge. Bei allen durchgeführten Versuchen zusammengerechnet schwankte die Zellzahl der pro mm ausgewanderten Zellen zwischen 63 und 158, der Mittelwert ergab  $111 \pm 27$  Zellen/mm Wundrandlänge.

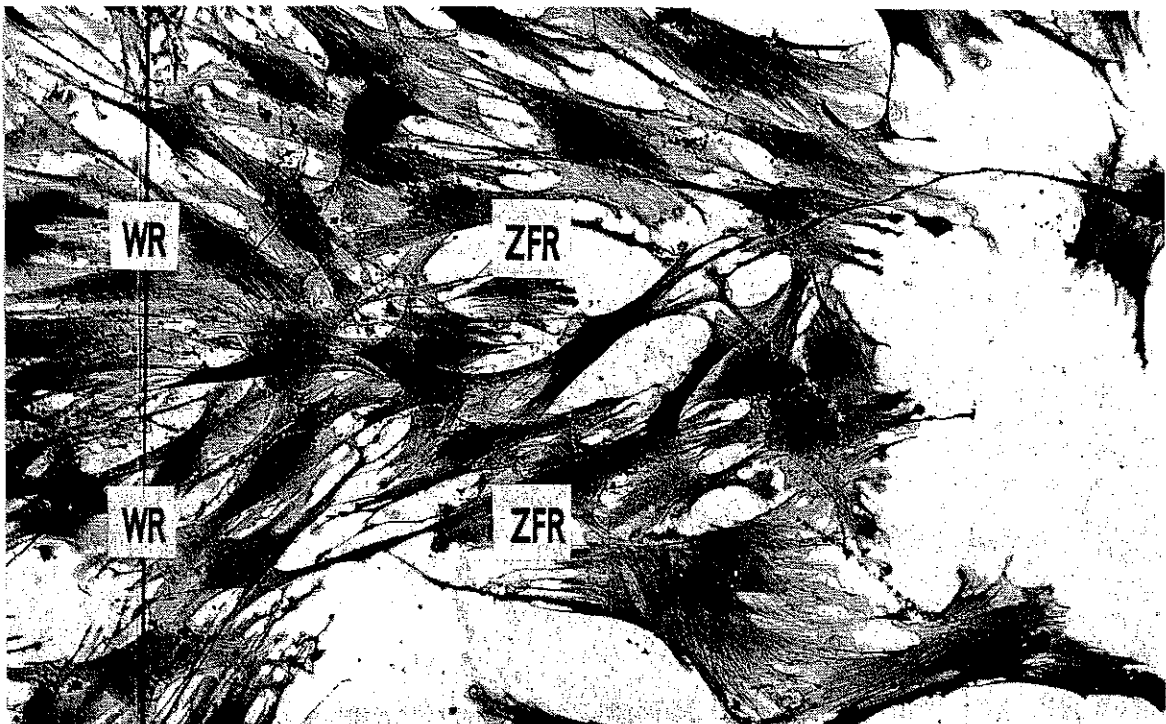


Abb. 24: Migration von glatten Muskelzellen über den künstlich geschaffenen Wundrand (WR) in den zellfreien Raum (ZFR), Migrationszeit 48 Std. Coomassie-Giemsä-Färbung. Vergrößerung: 170-fach.

### 1.7.2. Migrationsgeschwindigkeit

Für die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit wurde die von der vordersten Zellfront zurückgelegte Strecke auf die Zeit seit Beginn der Migration bezogen.

Im ersten Versuch betrug die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellen  $20.7 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{Std}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ). Die Geschwindigkeit der schnellsten Zellfront betrug  $23 \mu\text{m}/\text{Std}$ , die der langsamsten  $19 \mu\text{m}/\text{Std}$ . Der zweite Versuch lag in der Durchschnittsgeschwindigkeit mit  $18.4 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{Std}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) etwas unter dem ersten Versuch, die Geschwindigkeiten der einzelnen Fronten schwankten zwischen  $16$  und  $20 \mu\text{m}/\text{Std}$ . Beim dritten Versuch betrug die Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellen  $16.9 \pm 1.8 \mu\text{m}/\text{Std}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), die schnellste Front bewegte sich mit  $20 \mu\text{m}/\text{Std}$ , die langsamste mit  $15 \mu\text{m}/\text{Std}$ . Im vierten Versuch lag die Durchschnittsgeschwindigkeit bei  $15.3 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{Std}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), die Geschwindigkeiten der einzelnen Fronten variierten zwischen  $14$  und  $17 \mu\text{m}/\text{Std}$ .

Bei allen durchgeführten Versuchen zusammen betrug die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit  $17.9 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{Std}$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ); die schnellste Zellfront migrierte mit  $23 \mu\text{m}/\text{Std}$ , die langsamste mit  $14 \mu\text{m}/\text{Std}$ .

## 2. Einflüsse auf das Wachstumsverhalten

### 2.1. Adhäsionsfaktoren

In einer Modifikation des Adhäsionsassays von Björkerud [19] wurde von Dartsch et al. gezeigt [49], daß Plaquezellen langsamer auf Kollagen Typ I beschichteten Platten adhärten als SMC aus unveränderten Gefäßwand. Im folgenden wurde untersucht, ob das Wachstumsverhalten von Plaquezellen durch Beschichtung der Kulturplatten mit lathyritischem Rattenkollagen Typ I beeinflusst wird.

SMC aus atherosklerotischem Plaquegewebe (Re-SMC) und SMC aus der unveränderten Gefäßwand wurden auf Kollagen Typ I beschichteten Kulturschalen kultiviert. Hierbei zeigte sich, daß Re-SMC auf den kollagenbeschichteten Platten ein reduziertes Wachstum hatten (Abb. 25). Bei SMC aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 26) hatte die Kollagenbeschichtung keinen Einfluß auf die Zellproliferation [49].

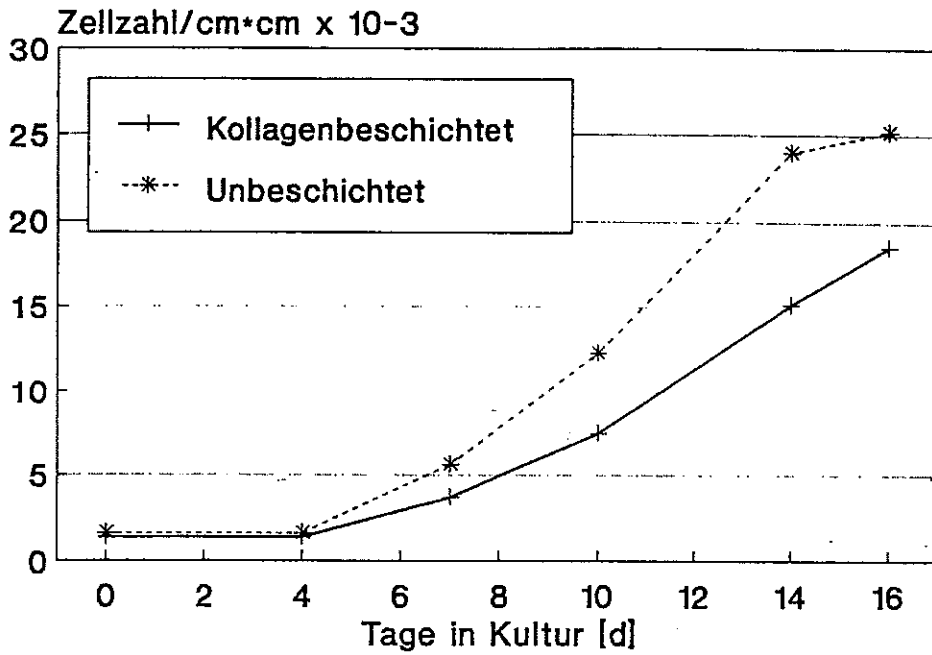


Abb. 25: Kultivierung von glatten Muskelzellen aus restenosierendem Plaque-material auf unbeschichteten Kulturschalen und auf Kulturschalen, die mit lathyritischen Rattenkollagen Typ I beschichtet wurden.

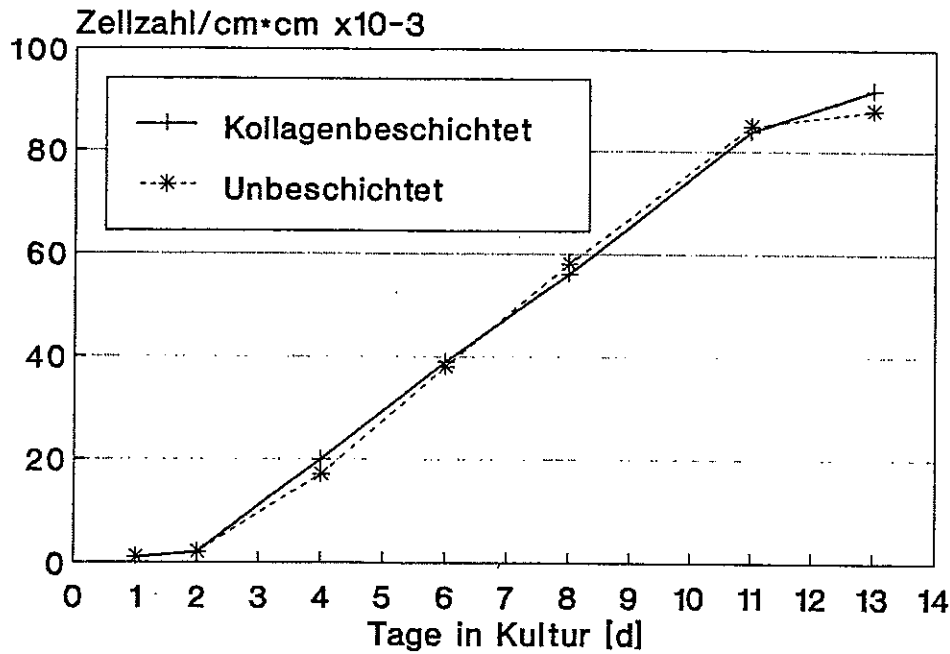


Abb. 26: Kultivierung von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäß-wand auf unbeschichteten Kulturschalen und auf Kulturschalen, die mit lathyri-tischem Rattenkollagen Typ I beschichtet wurden.

## 2.2. Serumkonzentrationen

In der Literatur [164] wurde berichtet, daß Plaquezellen aus primärstenosierenden Läsionen der A. fem. sup. nicht auf verschiedene Serumkonzentrationen von 1 - 10% reagieren. In unseren Experimenten zeigte sich jedoch sowohl bei Primär-SMC, als auch bei Re-SMC eine klare Abhängigkeit der Zellproliferation von der Konzentration des zugegebenen Serums (Abb. 27).

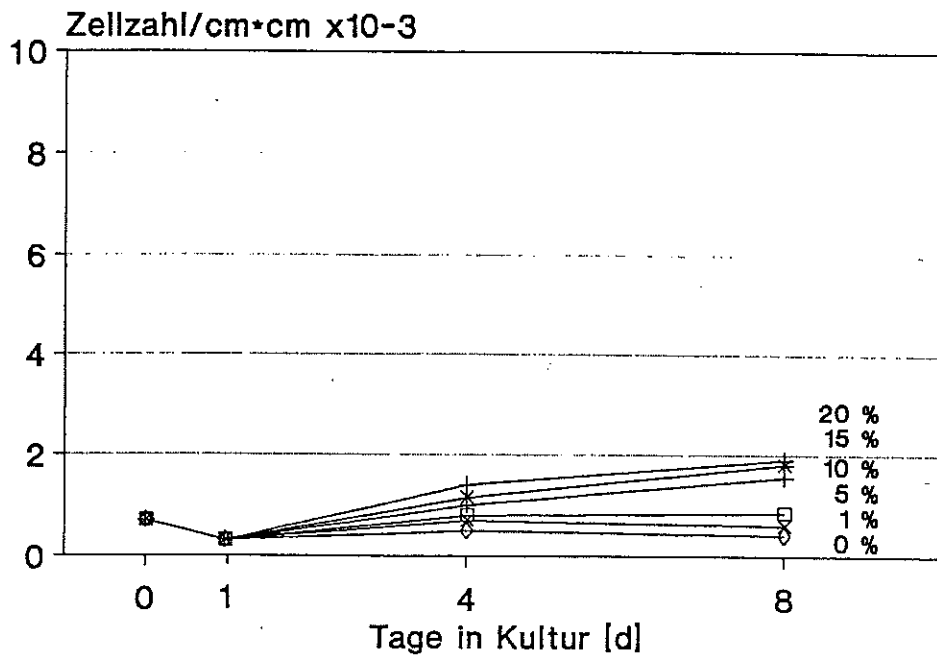
Aus der Darstellung der Populationsverdopplungsraten/Tag in Abhängigkeit von der Serumkonzentration (Abb. 28) kann man ablesen, daß sowohl bei Primär-SMC, wie auch bei Re-SMC eine Sättigungsgrenze der Stimulierbarkeit erreicht wird. Die Steigerung von 15% Serumgehalt auf 20% bewirkt nur noch eine relativ geringe Erhöhung der Zellproliferation. Die Sättigungsgrenze dürfte im dargestellten Versuch für Primär-SMC etwa bei 0.31 PD/Tag liegen, für Re-SMC mehr als doppelt so hoch bei 0.66 PD/Tag.

Im Einzelnen wurden folgende Werte für die Populationsverdopplungsraten/Tag errechnet:

Serumkonzentration	Primär-SMC	Re-SMC
0%	Absterben der Zellen	0.039 PD/Tag
1%	0.075 PD/Tag	0.099 PD/Tag
5%	0.143 PD/Tag	0.443 PD/Tag
10%	0.267 PD/Tag	0.557 PD/Tag
15%	0.307 PD/Tag	0.640 PD/Tag
20%	0.312 PD/Tag	0.658 PD/Tag

Die Wachstumsraten der Re-SMC lagen bei allen Serumkonzentrationen deutlich über den Wachstumsraten für Primär-SMC. Ohne Serumzusatz zeigten nur die Re-SMC ein geringes Wachstum, die Primär-SMC vermehrten sich überhaupt nicht, sondern gingen sogar langsam zu Grunde. Bei einer Serumkonzentration von 1% lagen die Wachstumsraten für Primär-SMC und Re-SMC relativ dicht beieinander, die PD/Tag der Re-SMC betrug nur 1.3 x des Wertes für Primär-SMC. Die größten Unterschiede wurden bei 5% Serum erzielt: Die PD/Tag für Re-SMC war 3.1 x so hoch wie die der Primär-SMC. Bei einer Serumkonzentration

A



B

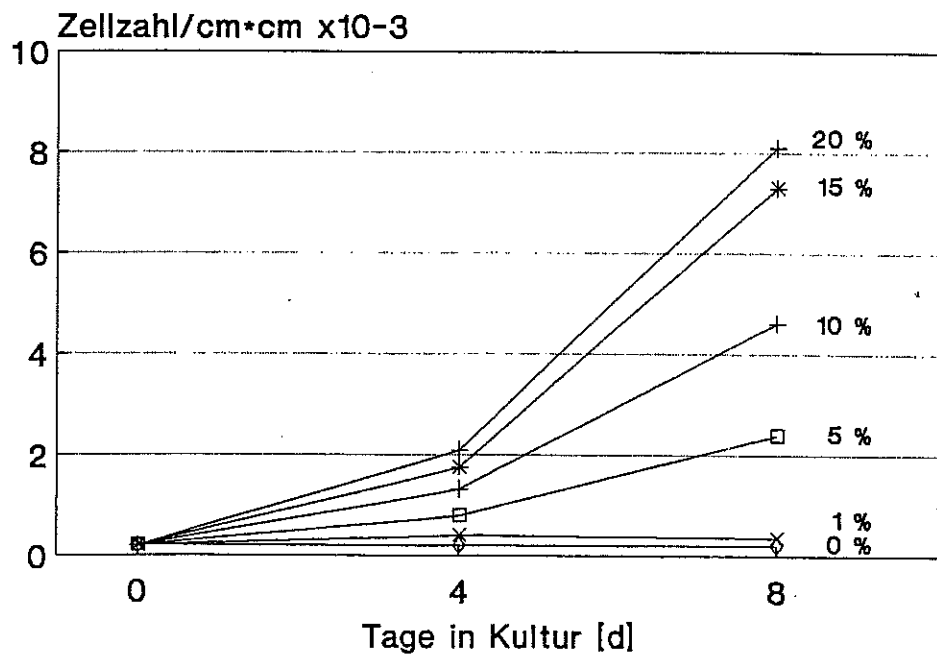


Abb. 27: Darstellung der Auswirkung verschiedener Serumkonzentrationen auf das Wachstum von SMC aus primär-stenosierenden (A) und re-stenosierenden Läsionen (B).

tration von 10%, 15% und 20% lag die Wachstumsrate der Re-SMC konstant 2.1 x höher als die der Primär-SMC.

Ein weiterer interessanter Befund war, daß mit Zunahme der Serumkonzentration die prozentuale Steigerung der Populationsverdopplungsrate/Tag immer geringer wurde. Im Einzelnen zeigten sich folgende Werte:

Relative Steigerung der PD/Tag in Prozent bei Erhöhung der Serumkonzentration ('Wachstumsbeschleunigung'):

Serumkonzentration	Primär-SMC	Re-SMC
von 0% auf 1%	keine Steigerung	+ 154 %
von 1% auf 5%	+ 91 %	+ 347 %
von 5% auf 10%	+ 87 %	+ 26 %
von 10% auf 15%	+ 15 %	+ 15 %
von 15% auf 20%	+ 2 %	+ 2 %

Wie bereits angedeutet, nahm der Effekt der Serumkonzentrationserhöhung bei höheren Serumkonzentrationen bei Primär-SMC und bei Re-SMC ab, bei 15% und 20% sind die Werte sogar identisch. Re-SMC reagierten bereits bei geringen Serumkonzentrationen vehement, die Steigerung von 1% auf 5% bewirkte eine Steigerung der PD/Tag um enorme 347%. Die PD/Tag steigt zwar noch an bei Erhöhung der Serumkonzentration, aber die Steigerungsraten sind relativ gering mit 26%, 15% und 2%.

Bei Primär-SMC sind die Steigerungsraten insgesamt niedriger, das Maximum der Wachstumsratensteigerung wird aber ebenfalls bei der Erhöhung der Serumkonzentration von 1% auf 5% erreicht, hält aber nahezu unverändert beim Erhöhen der Serumkonzentration von 5% auf 10% an.

### 2.3. Konditionierte Medien

In mehreren Publikationen wurde berichtet, daß von Plaquezellen eine mitogene Aktivität ins Kulturmedium sezerniert wird [125,133,141]. Wie in Abschnitt D. 1.6.3. dargestellt, zeigten Re-SMC ein signifikant höheres Wachstum als Primär-SMC. Um zu untersuchen, ob von den schnell wachsenden SMC eine mitogene Aktivität ins Kulturmedium sezerniert wird, entnahmen wir Kulturmedium

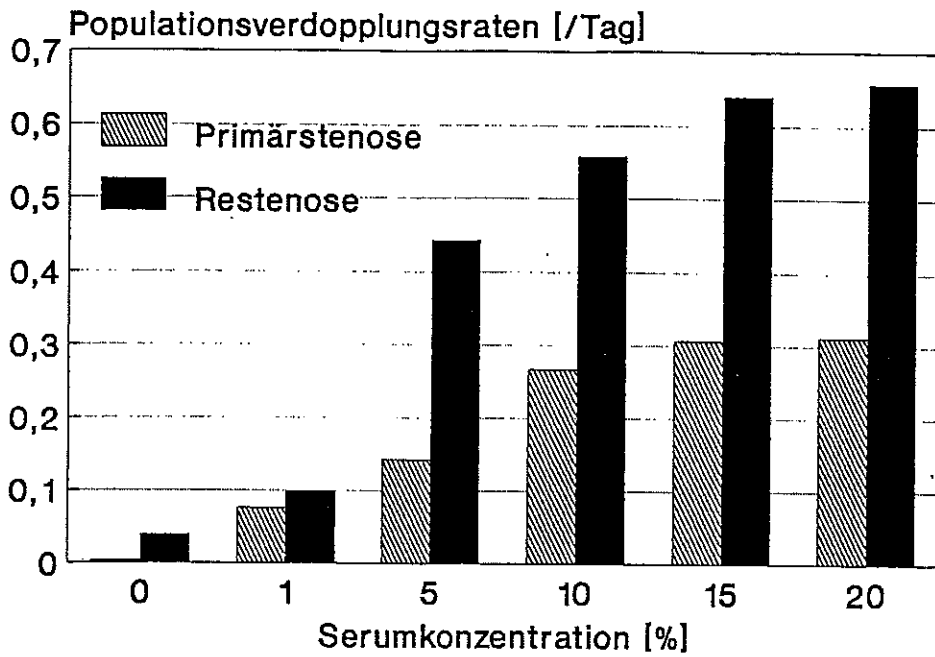


Abb. 28: Vergleich der Populationsverdopplungsraten von SMC aus primär-stenosierendem und re-stenosierendem Plaquematerial bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen. Bei 5% Serumanteil ist der Unterschied am größten.

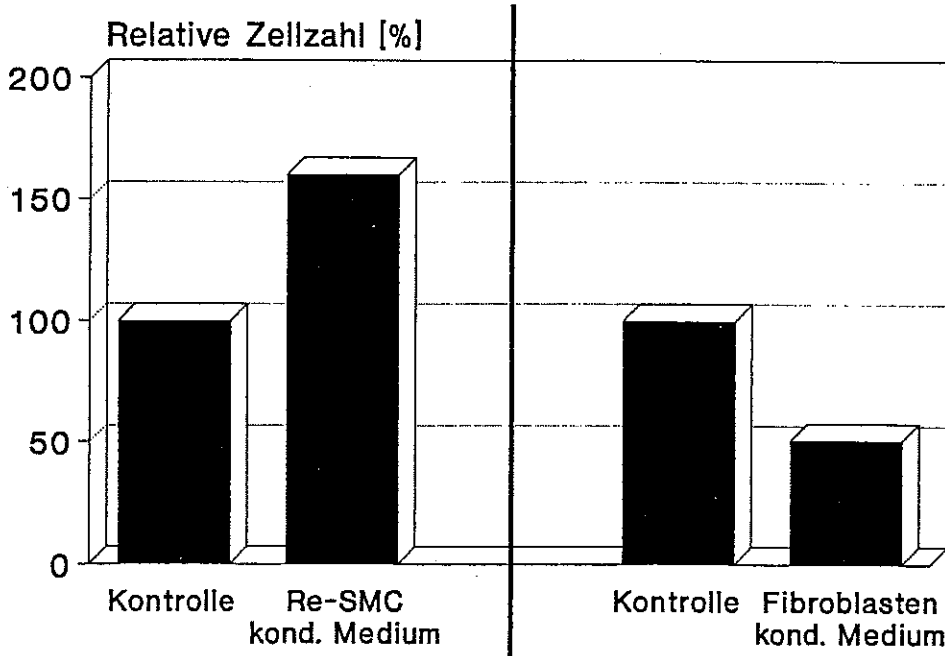


Abb. 29: Der Einfluß konditionierter Medien auf das Zellwachstum. Das Medium von Kulturen mit SMC aus restenosierenden Läsionen stimuliert das Wachstum von SMC aus primärstenosierenden Läsionen. Das Medium von Fibroblastenkulturen inhibiert das Wachstum der SMC.



von Re-SMC in der log-Phase. In den Kontrollschalen wurde ein Medium verwendet, das von Primär-SMC in der log-Phase entnommen wurde, um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Mit diesen konditionierten Medien wurden nun langsam wachsende Primär-SMC kultiviert. Bei jedem Mediumwechsel wurde wiederum nur konditioniertes Medium verwendet. Nach 7 Tagen Kultivierung mit konditionierten Medien erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit dem Zellzählgerät. Wie aus Abb. 29 ersichtlich, wurde das Wachstum der Primär-SMC durch das Re-SMC konditionierte Medium deutlich gesteigert. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß Re-SMC eine mitogene Aktivität ins Kulturmedium sezernieren.

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, scheinen auf zellulärer Ebene die Migration und Proliferation die zentralen Ereignisse bei der Atherogenese zu sein. Interessanterweise erfolgt die Migration der SMC jedoch immer in Richtung Endothel bzw. Gefäßlumen.

Um eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von SMC durch die Fibroblasten der Adventitia zu untersuchen, wurden Fibroblasten aus dermatologischen Operationspräparaten isoliert und kultiviert (siehe Kapitel C.1.3.). Von den proliferierenden Fibroblasten wurde in der log-Phase Kulturmedium entnommen und für die Kultivierung der langsam wachsenden Primär-SMC verwendet. Das Medium in den Kontrollschalen stammte aus der log-Phase von Primär-SMC, um einen Verbrauch der normalerweise vorhandenen Wachstumsfaktoren auszuschließen. Bei jedem Medienwechsel wurden wiederum nur die entsprechend konditionierten Medien verwendet. Nach 7 Tagen Kultivierung mit konditionierten Medien erfolgte die Ermittlung der Zellzahl. Wie aus Abb. 29 hervorgeht, wurde das Wachstum der Primär-SMC um fast 50% durch Fibroblasten-konditioniertes Medium gehemmt. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, daß Fibroblasten eine inhibierende Aktivität in das Kulturmedium sezernieren.

#### 2.4. ECGF und PDGF

Wachstumsfaktoren scheint eine wichtige Rolle bei der Atherogenese zuzukommen. Daher wurde im folgenden der Einfluß von ECGF und PDGF auf kultivierte Plaquezellen aus primär- und restenosierendem Plaquematerial untersucht. Die Konzentration des ECGF betrug 100 µg/ml, des PDGF 5 ng/ml. Unter der Einwir-

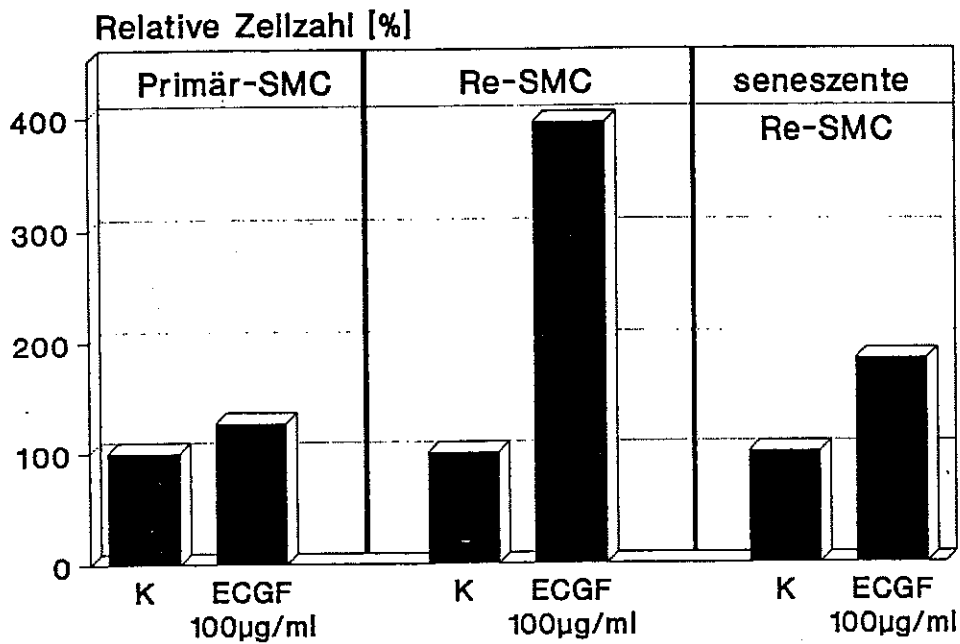


Abb. 30: Der Einfluß von ECGF nach 5-tägiger Kultivierung auf primär-stenosierende SMC, re-stenosierende SMC und seneszente re-stenosierende SMC. Nur Plaquezellen aus restenosierendem Plaquematerial waren in ihrem Wachstum stimulierbar; bei seneszenten SMC verminderte sich die Stimulierbarkeit.

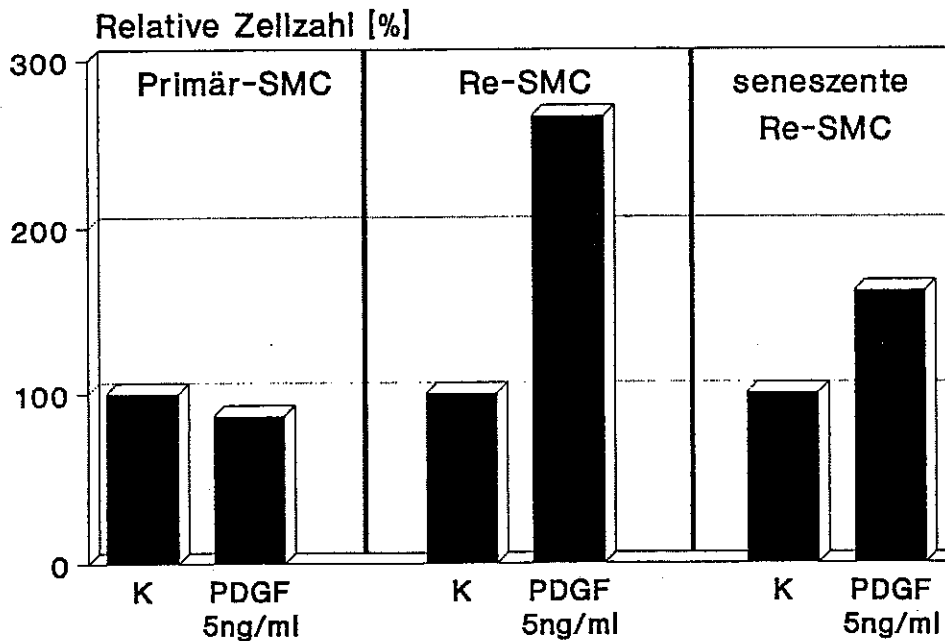


Abb. 31: Die Wirkung von PDGF nach 5-tägiger Kultivierung auf primärstenosierende SMC, restenosierende SMC und seneszente, restenosierende SMC. Während primärstenosierende SMC nicht stimuliert wurden, konnte bei SMC aus restenosierendem Plaquematerial eine deutliche Stimulation erreicht werden. Seneszente SMC ließen sich in geringerem Ausmaß stimulieren.

kung von Wachstumsfaktoren wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen kultiviert, bei jedem Medienwechsel wurden auch die Wachstumsfaktoren erneuert. Nach 6 Tagen wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät analysiert, in Abb. 30 u. 31 sind die relativen Zellzahlen in % angegeben (Kontrolle = 100%).

Primär-SMC ließen sich weder durch ECGF noch durch PDGF stimulieren. Im Gegensatz hierzu konnte das Wachstum der Re-SMC durch PDGF um das 2.7-fache, durch ECGF fast um das 4-fache gesteigert werden. Mit zunehmendem in vitro-Alter der Re-SMC in höheren Passagen nahm jedoch auch die Stimulationsfähigkeit ab. Das Wachstum der seneszenten Re-SMC wurde durch PDGF nur mehr um das 1.9-fache, durch ECGF um das 1.6-fache gesteigert.

### **3. Medikamenten-Testungen**

Durch die wichtige Rolle, die der SMC-Migration und Proliferation bei der Atherogenese zukommt, besteht ein klinisches Interesse an einer medikamentösen Beeinflussbarkeit dieser Prozesse [12,13,14,15,16,40,165,166,212,216]. Das extrem gesteigerte Wachstum der SMC aus restenosierenden Läsionen in vitro könnte das in vivo-Äquivalent zu den hohen Restenoserraten nach Angioplastie in vivo sein.

Eine effektive medikamentöse Inhibition der Zellmigration und Zellproliferation und/oder zumindest die Vermeidung von stimulierenden Substanzen wäre sicherlich anzustreben. Interessante Zusatzinformationen zur Auswahl geeigneter Substanzen können durch die Etablierung von in vitro-Zellkultur-Testsystemen erreicht werden [165,166].

#### **3.1. Thrombozytenaggregationshemmer**

##### **3.1.1. Acetylsalicylsäure (ASS)**

SMC aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen und SMC aus intraoperativ und perkutan entferntem Plaquegewebe wurden in einer Dichte von 2000-3000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Lochschalen ausgesät. Nach dem ersten Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von reiner ASS in Konzentrationen von 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-7</sup> mol/l. Da ASS in 100% Ethanol gelöst werden mußte, wurde in die Kontrollschalen ebenfalls eine entsprechende Menge Ethanol pipettiert. Bei jedem Medium-

wechsel wurden die Substanzen ebenfalls erneuert. Nach 8 Tagen erfolgte die Analyse der Zellzahlen mit dem Zellcounter.

### **3.1.1.1. Wirkung von ASS auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 32)**

Bei einer ASS-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l zeigte sich keine relevante Änderung der Zellzahl. Erst bei einer toxischen Dosierung von  $10^{-2}$  mol/l starben fast alle Zellen ab (98%).

### **3.1.1.2. Wirkung von ASS auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen (Abb. 33,34)**

Der Effekt von ASS auf kultivierte SMC aus intraoperativ entferntem, primärstenosierendem Plaquegewebe der A. fem. sup. ist in Abb 33 dargestellt. Eine geringe Proliferationshemmung durch ASS um 28% konnte bereits ab einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Konzentration auf  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-5}$  mol/l und  $10^{-4}$  mol/l führte zu keiner weiteren Zunahme der Inhibition. Bei SMC aus restenosierendem Plaquegewebe, welches mit dem p-SAC extrahiert wurde (Abb. 34), kam es bei den Konzentrationen bis  $10^{-4}$  mol/l nur zu Schwankungen um den Nullwert. Erst bei der toxischen Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l ASS kam es bei beiden Testreihen zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl, bei  $10^{-2}$  mol/l betrug die Abnahme über 95%.

### **3.1.1.3. Wirkung von ASS auf Plaquezellen aus Primär- und Restenosen (Dosis-Wirkungskurve, Abb. 35)**

Bei glatten Muskelzellen aus restenosierendem Plaquematerial, das mit dem Simpson-Katheter aus der A. fem. sup. extrahiert wurde, wurde jedoch die Proliferationsinhibition im 'low-dose' Bereich nicht festgestellt. Erst ab der eindeutig toxischen Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l kam es zu einer klaren Reduktion der Zellzahl. Bei der gemeinsamen Darstellung beider Versuche in einer Dosis-Wirkungskurve sieht man die Diskrepanz im "low-dose"-Bereich.

### **3.1.1.4. Wirkung von ASS auf die Migration von Plaquezellen**

Die meisten Zelltypen sind in der Lage, sich aktiv auf einer Unterlage fortzubewegen. Im Rahmen der Atherogenese werden die Mediazellen durch exogene Stimuli zur Migration angeregt. Für den Migrationstest wurden SMC aus restenosierendem Plaquematerial der A. fem. sup. (5. Passage) bis zur Konfluenz an-

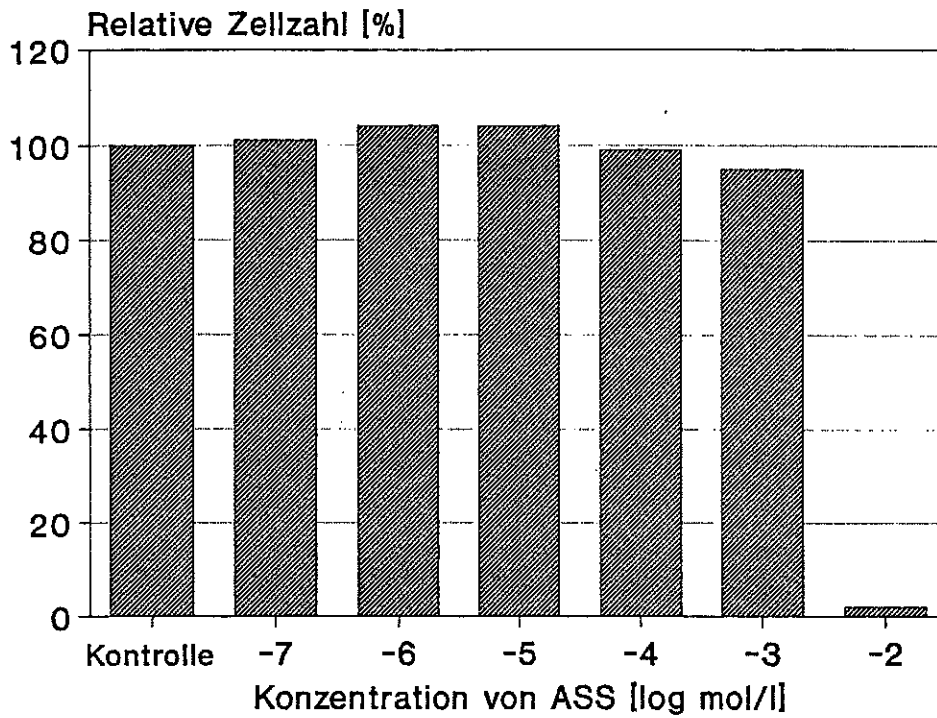


Abb. 32: Der Effekt von Acetylsalizylsäure auf die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand nach 5-tägiger Kultivierung.

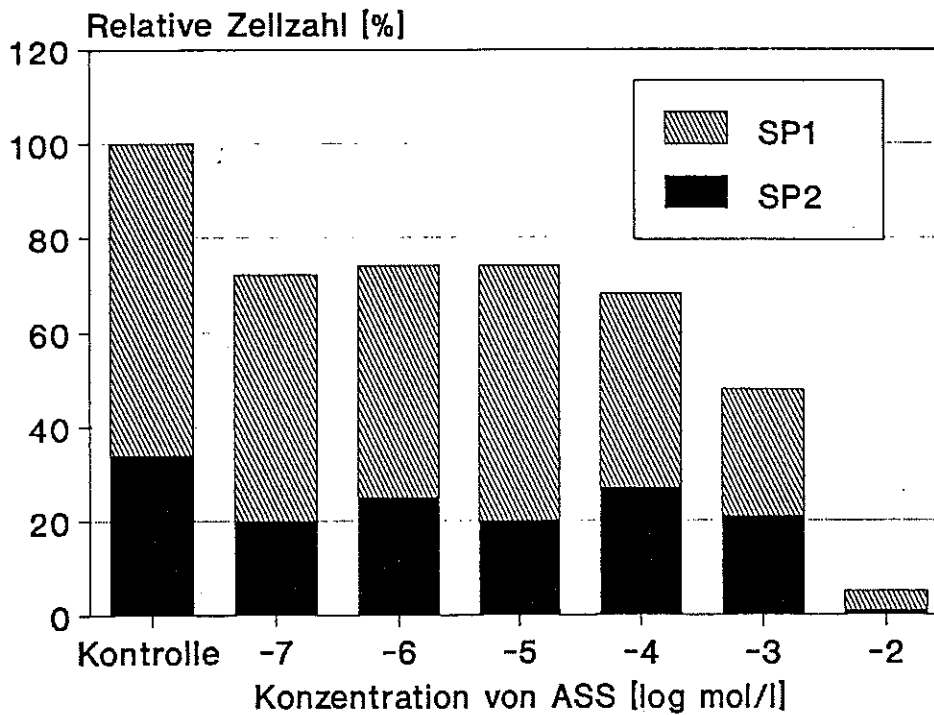


Abb. 33: Der Effekt von Acetylsalizylsäure auf die Proliferation von primär-stenosierenden SMC aus der A. fem. sup. nach 5-tägiger Kultivierung. Eine geringe Hemmung der Zellproliferation liegt bereits bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l vor.

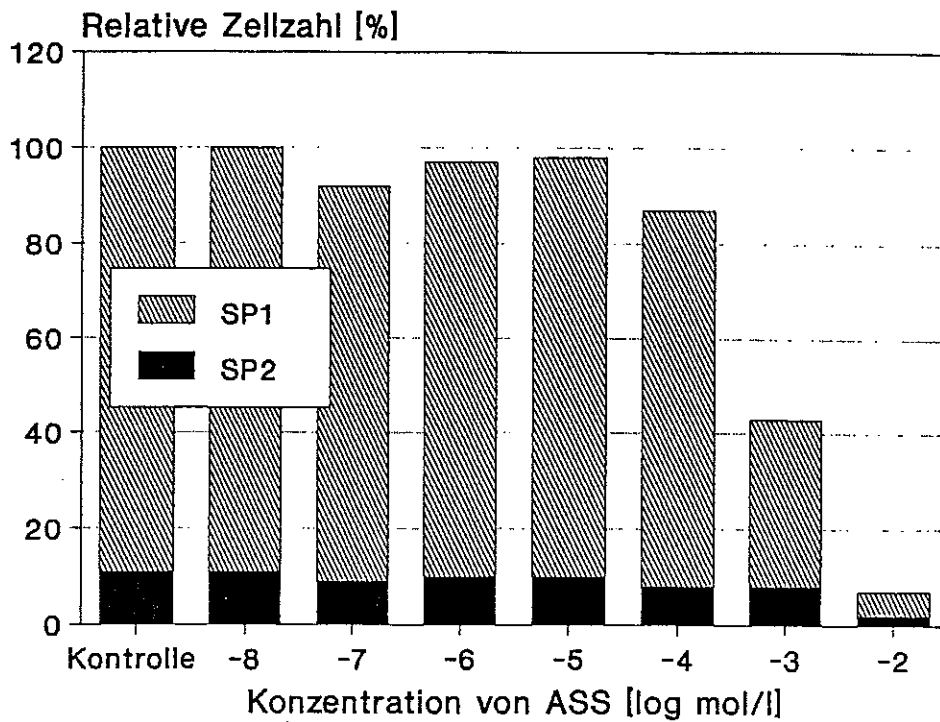


Abb. 34: Der Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Proliferation von SMC aus re-stenosierendem Plaquematerial nach fünftägiger Kultivierung; eine signifikante Reduktion der Zellzahl erfolgte erst im toxischen Bereich.

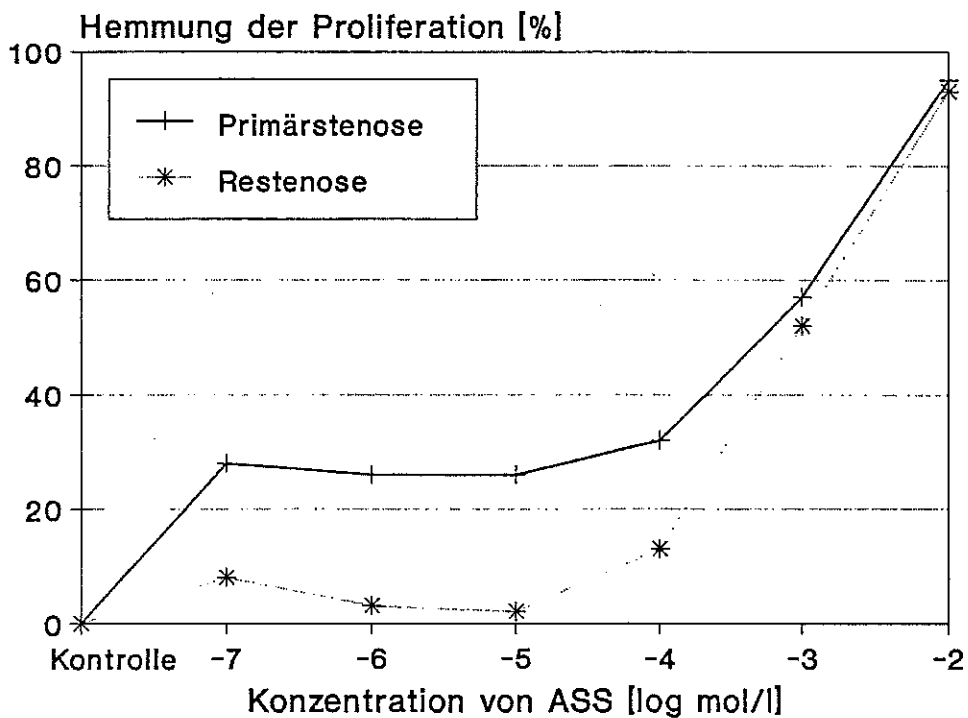


Abb. 35: Darstellung des Effektes von Acetylsalicylsäure auf primär- und re-stenosierende SMC der A. fem. sup. nach 5-tägiger Kultivierung als Dosis-Wirkungskurve. Die ED 50 wird erst im toxischen Bereich erreicht.

gezüchtet. Die Durchführung der Migration erfolgte wie in Abschnitt C. 2.3. beschrieben.

#### **3.1.1.4.1. Zellmigration pro mm Wundrandlänge (Abb. 36)**

Die Anzahl der SMC, die pro mm Wundrandlänge in das entstandene zellenfreie Gebiet migrierten, wurde durch Auszählen der Zellkerne der ausgewanderten Zellen bestimmt. ASS wurde in 100% Ethanol gelöst und sofort nach Verletzung des Zellrasens in Konzentrationen von  $10^{-2}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l den Kulturschalen zugegeben. In die Kontrollschalen ohne Substanz wurde ebenfalls eine entsprechende Menge Ethanol pipettiert.

Das Auszählen der Zellkerne nach 2 Tagen Substanzeinwirkung ist in Abb. 36 dargestellt. ASS in Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l beeinflusste die Anzahl der migrierten Zellen nicht. Bei der toxischen Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l wurde die Zahl der migrierten Zellen um 42% reduziert, bei  $10^{-2}$  mol/l sogar um 84%.

#### **3.1.1.4.2. Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 37)**

Für die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit wurde die seit Zellverletzung zurückgelegte Wegstrecke der ersten Zellfront durch die Migrationszeit dividiert. Hier zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bezüglich der Anzahl der migrierten Zellen. Auf die Migrationsgeschwindigkeit hatte ASS in Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l keinen Einfluß. Bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l reduzierte sich die Migrationsgeschwindigkeit um 33%, bei  $10^{-2}$  mol/l betrug sie noch 15% im Vergleich zur Kontrollschale ohne Substanz.

#### **3.1.1.5. Wirkung von ASS auf die Migration und Proliferation von Plaquezellen (Dosis-Wirkungskurve, Abb. 38)**

Als Repräsentant für die Migration wurde die Zahl der pro mm Wundrandlänge ausgewanderten Zellen verwendet und gemeinsam mit der Proliferation als Dosis-Wirkungskurve dargestellt. 100% Wirkung würde einer Reduktion der Zellzahl auf Null entsprechen, Null % Wirkung bedeutet infolgedessen die gleiche Zellzahl wie die Kontrollschalen. Aus Abb. 38 ist ersichtlich, daß im Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l kein Effekt auf die Migration und Proliferation beobachtet werden kann. Erst durch die sicherlich toxischen

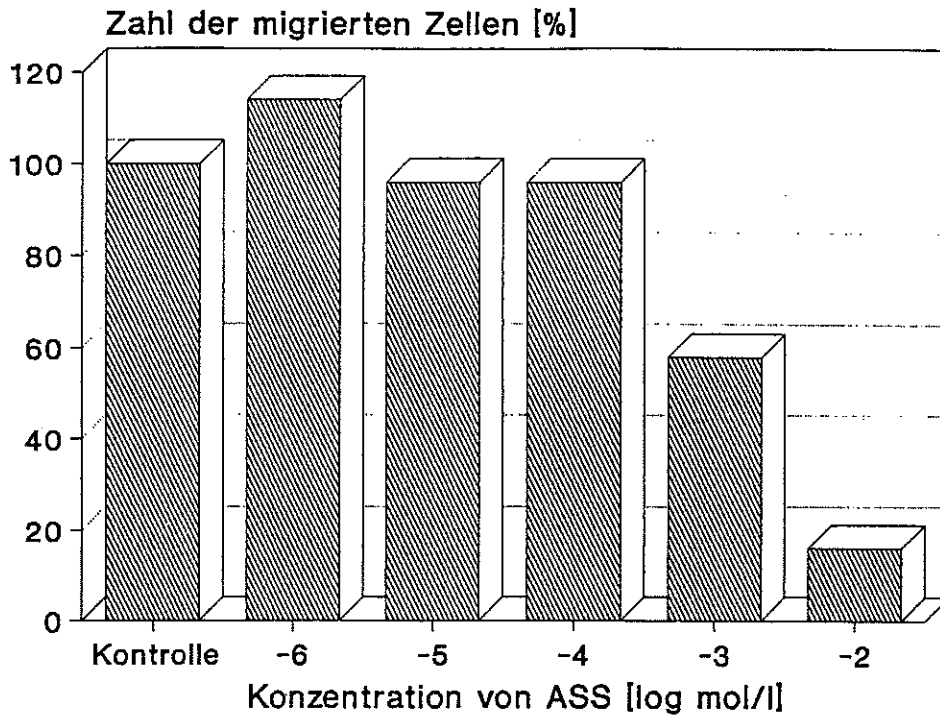


Abb. 36: Zahl der pro mm Wundrandlänge unter der Einwirkung von Acetylsalicylsäure ( $10^{-2}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l) in den zellfreien Raum migrierten Plaquezellen. Migrationsdauer 48 Std.

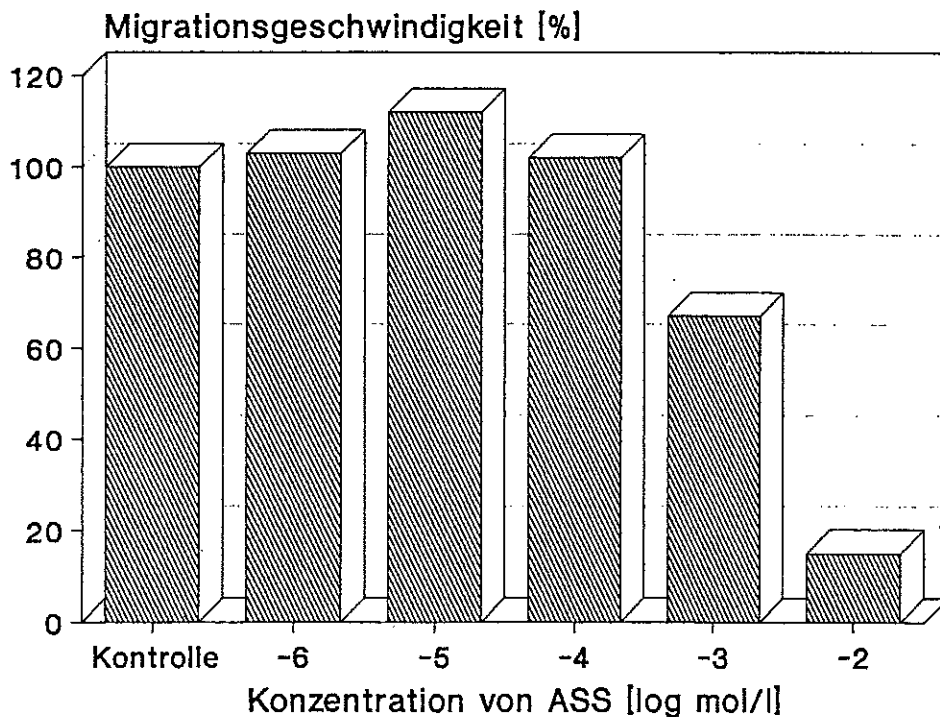


Abb. 37: Darstellung der Migrationsgeschwindigkeit der Plaquezellen in % unter der Einwirkung von Acetylsalicylsäure ( $10^{-2}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l).



Konzentrationen von  $10^{-3}$  mol/l und  $10^{-2}$  mol/l werden beide Parameter deutlich vermindert. Bemerkenswert ist der nahezu parallele Kurvenverlauf.

### 3.1.1.6. Die Wirkung von ASS auf den pH-Wert der Kulturen (Abb. 39)

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die kultivierten SMC beurteilen zu können, wurde in einem gesondertem Versuch mit dem pH-Meter der pH-Wert in der Schale bei allen ASS-Konzentrationen gemessen. Hierfür wurde in einem ersten Versuch ASS in Konzentrationen von  $10^{-10}$  mol/l bis  $10^{-2}$  mol/l in Kulturschalen mit dem Routinekulturmedium pipettiert. Die Schalen wurden anschließend nach Zugabe der verschiedenen ASS-Konzentrationen ohne Abdeckung in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 7%  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert, um das Hydrogencarbonat-Puffersystem in Gang zu setzen.

Nach 180 min. wurde bei jeder Schale innerhalb von 30 sec. der pH-Wert mit dem pH-Meter gemessen. Um das eingestellte Gleichgewicht so wenig wie möglich zu verändern, wurde jeweils nur die Schale aus dem Inkubationsmilieu genommen, bei der die pH-Messung durchgeführt wurde. Anschließend wurde derselbe Versuch unter dem Einfluß von HEPES-Puffer (15 mM) wiederholt. Aus Abb. 39 ist ersichtlich, daß eine relevante pH-Änderung mit und ohne HEPES-Pufferung bis zu einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l nicht besteht.

### 3.1.2. Dipyridamol (DPD)

DPD konnte in 100% Ethanol unter ständigem Rühren gelöst werden. Den Kontrollschalen ohne Substanz wurde ebenfalls eine entsprechende Menge Ethanol zupipettiert. Beim ersten Mediumwechsel wurde DPD den kultivierten Zellen in Konzentrationen von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l zugesetzt. Nach 3 Tagen Substanzwirkung wurde mit dem Zellcounter die Zellzahl analysiert.

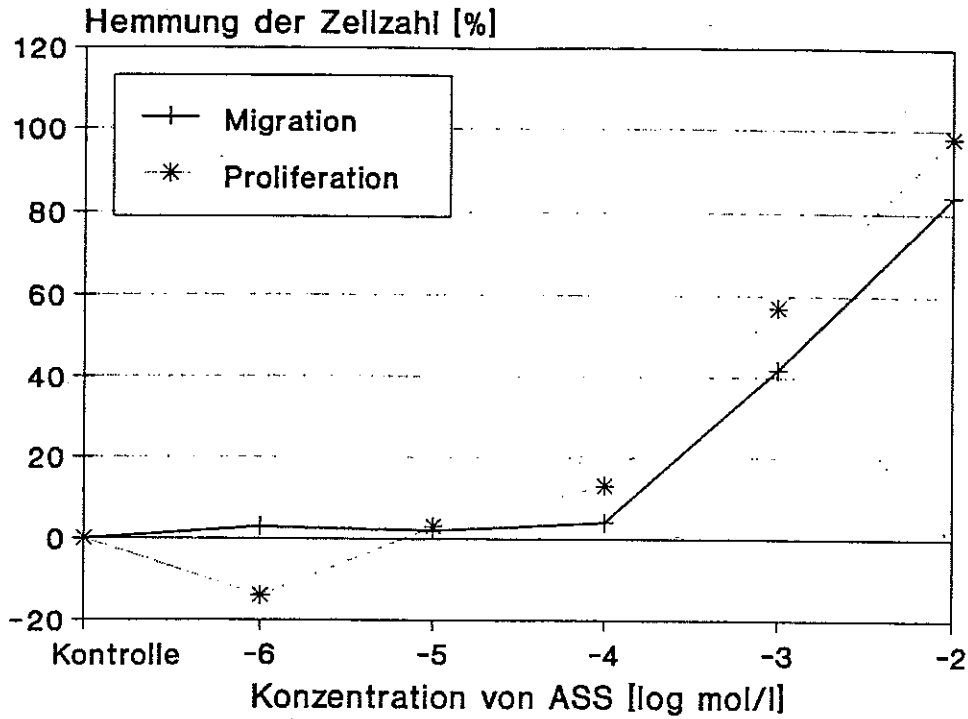


Abb. 38: Beeinflussung der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen durch Acetylsalicylsäure ( $10^{-2}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l). Erst im toxischen Bereich kommt es zu einer nahezu identischen Reduktion der Zellzahl.

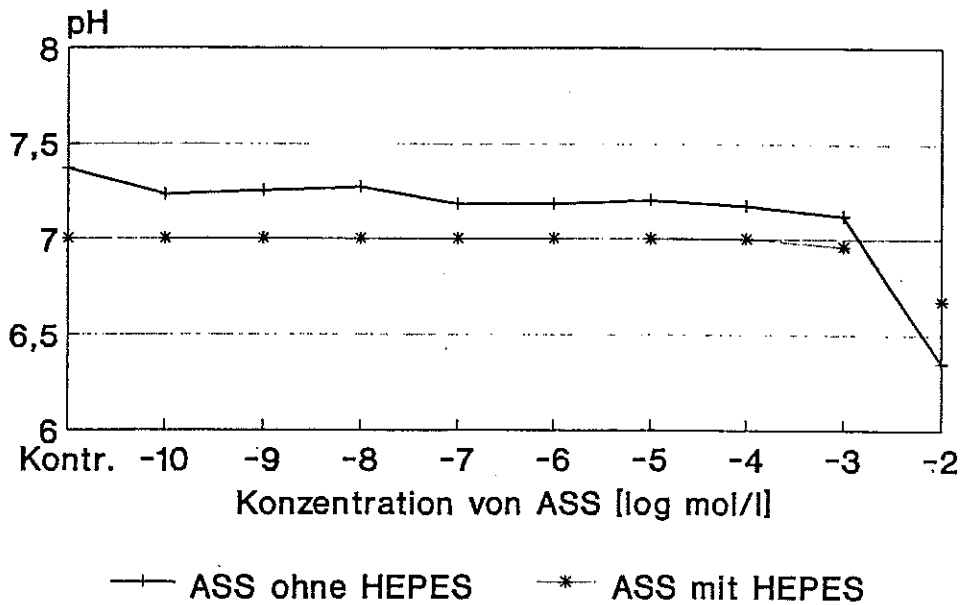


Abb. 39: Messung des pH-Wertes bei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetylsalicylsäure ( $10^{-2}$  mol/l bis  $10^{-10}$  mol/l). Erst bei der höchsten Konzentration verändert sich der pH-Wert.

### **3.1.2.1. Wirkung von DPD auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 40)**

Im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l zeigte sich keine Beeinflussung der Zellproliferation. Bei der Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l wurde die Zellzahl um 30% reduziert. Die weitere Erhöhung der Konzentration führte zu toxischen Effekten und der Ausbildung von kristallähnlichen Strukturen in der Schale und reduzierte die Zellzahl um über 80%.

### **3.1.2.2. Wirkung von DPD auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen (Abb. 41)**

Der Einfluß von DPD auf kultivierte Plaque-SMC aus restenosierendem Plaque-material ist in Abb. 41 dargestellt, die Kontrolle ohne Substanz beträgt 100%. Im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l zeigte sich durchwegs eine leichte Stimulation des Wachstums. Da diese aber weniger als 10% ausmachte, wurde sie als natürliche Schwankung bei Arbeiten mit biologischem Material gewertet.

Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l ergab sich eine klare Reduktion der Gesamtzellzahl, die aber nur von den Zellen der SP-1 verursacht wurde. Die Zellen der SP-2 zeigten bei dieser Konzentration noch keine Reaktion. Die Erhöhung der Konzentration auf  $10^{-4}$  mol/l führte zu einer weiteren drastischen Reduktion der SP-1, die nur noch eine Zellzahl von 39% im Vergleich zur Kontroll-SP-1 aufzuweisen hatte. Die SP-2 wurde bei dieser Konzentration erheblich weniger reduziert, ihre Zellzahl betrug noch 66% im Vergleich zur Kontroll-SP-2.

### **3.1.2.3. Wirkung von DPD auf die Migration von Plaquezellen**

SMC aus restenosierendem Gewebe der A. fem. sup. wurden bis zur Konfluenz angezüchtet und 2 Tage mit Hungermedium versorgt, um Zellteilungen ausschließen zu können. Nach Verletzung des Zellrasens (siehe Abschnitt C.2.3.) erfolgte die Zugabe von DPD in Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l. In die Kontrollschalen ohne Substanz wurde eine entsprechenden Menge des Lösungsmittels Ethanol zugegeben. 48 Stunden später wurden die Zellen fixiert und nach Giemsa gefärbt.

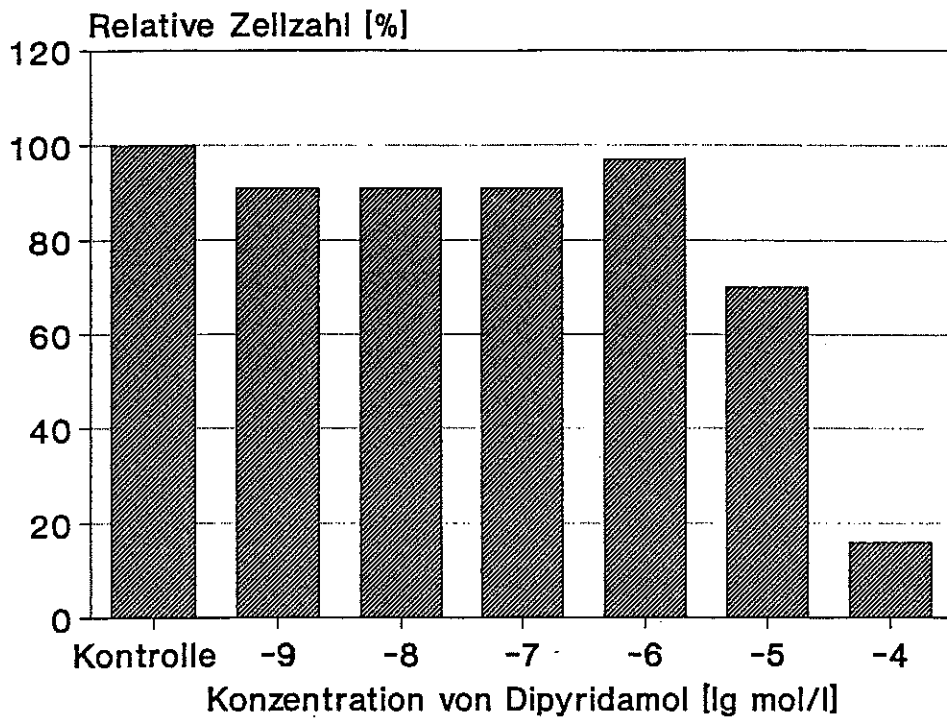


Abb. 40: Der Effekt von Dipyridamol auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Media. Ab einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l wird die Zellproliferation gehemmt; diese Konzentration liegt gerade noch im therapeutischen Bereich.

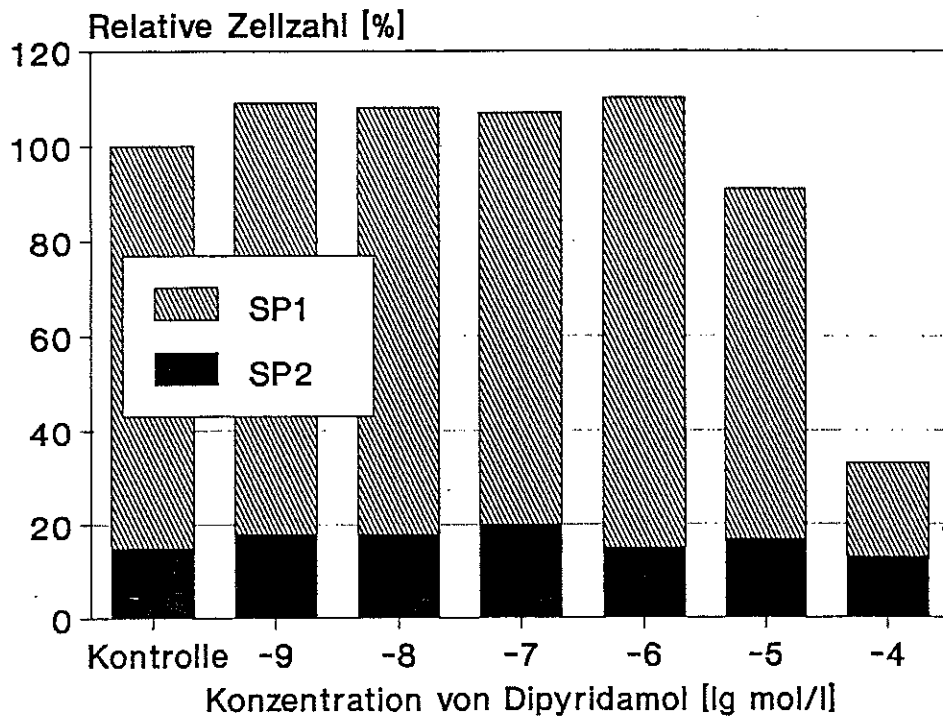


Abb. 41: Die Wirkung von Dipyridamol auf glatte Muskelzellen aus restenosierendem Plaquematerial. Im therapeutischen Bereich zeigt sich eine geringe Inhibition der Zellproliferation.

#### **3.1.2.3.1. Zellmigration pro mm Wundrandlänge (Abb. 42)**

Für die Bestimmung der Zellmigration pro mm Wundrandlänge wurden die Zellkerne der migrierten Zellen gezählt und auf einen mm Wundrandlänge bezogen. Hierbei zeigte sich bei DPD in Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l kein relevanter Einfluß auf die Zahl der migrierten Zellen (Abb. 42), die Stimulation bei  $10^{-8}$  mol/l scheint ein Ausreißer zu sein. Eine leichte Reduktion der pro mm migrierten Zellzahl um 15% ergibt sich bei einer Konzentration DPD von  $10^{-5}$  mol/l. Die Erhöhung der Dosis auf  $10^{-4}$  mol/l führt zu keiner Änderung, erst die sicherlich toxische Dosierung von  $10^{-3}$  mol/l hemmt die Zellmigration um 50%.

#### **3.1.2.3.2. Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 43)**

Für die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit wurde die ab Zellverletzung zurückgelegte Wegstrecke der ersten Zellfront ermittelt und auf die Wanderungszeit bezogen. In Abb. 43 sind die Ergebnisse dargestellt. Bei den Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l dürfte es sich um normale Schwankungen handeln, ein Trend in die eine oder andere Richtung konnte nicht beschrieben werden. Die Erhöhung der Konzentration auf  $10^{-4}$  mol/l führte zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit um 30%, bei der Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l um 52%.

#### **3.1.2.4. Wirkung von DPD auf die Migration und Proliferation von Plaquezellen (Dosis-Wirkungskurve, Abb. 44)**

Bei der gemeinsamen Darstellung der Migration und Proliferation wurde als Parameter für die Migration die pro mm Wundrand ausgewanderten Zellen herangezogen und der Zell-Proliferation gegenübergestellt. Im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l zeigte sich keine verwertbare Änderung der Zellzahl. Erst bei der toxischen Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l wurde die Zellproliferation um etwas über 30% inhibiert, die Migration lediglich um 16%.

#### **3.1.3. Kombination von Acetylsalicylsäure (ASS) und Dipyridamol (DPD)**

ASS und DPD wurden getrennt in 100% Ethanol gelöst und kultivierten Zellen in Konzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-3}$  zugegeben. Um gleiche Vorraussetzungen zu schaffen wurden die Kontrollschalen ebenfalls mit der entsprechenden Menge Ethanol kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer unter Substanzeinwirkung von 3 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt.

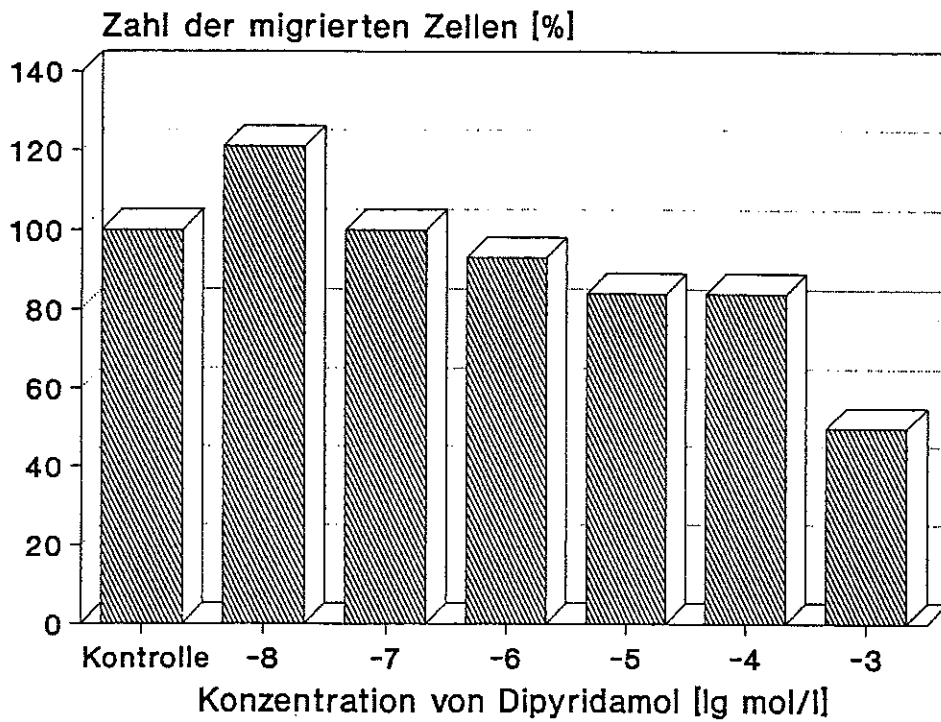


Abb. 42: Migration von Plaquezellen unter dem Einfluß von Dipyridamol ( $10^{-3}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l). Migrationsdauer 48 Std.

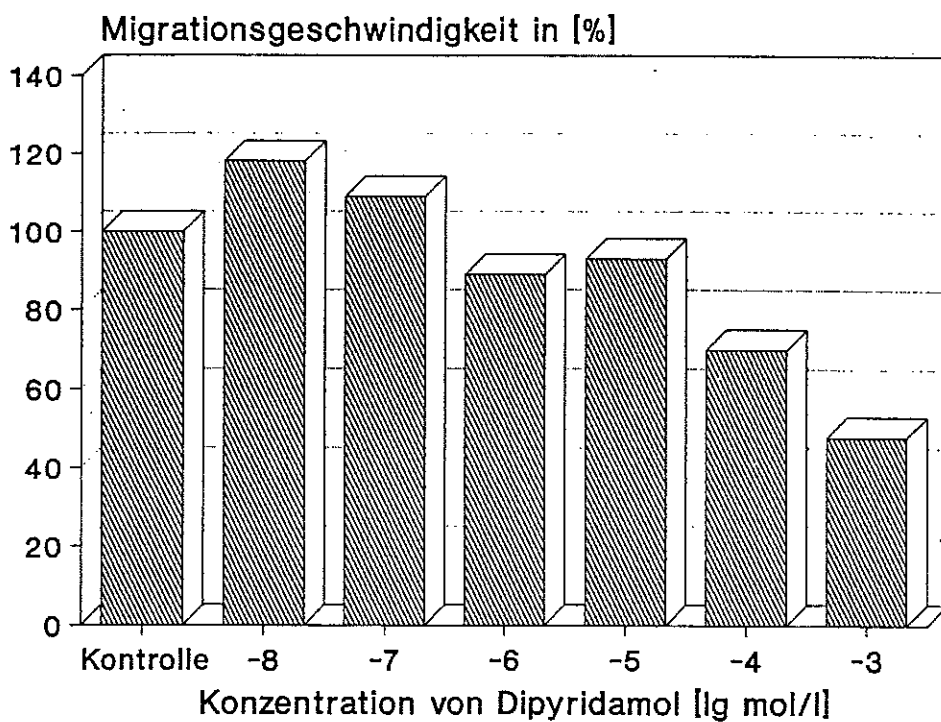


Abb. 43: Darstellung der Migrationsgeschwindigkeit der Plaquezellen in % unter dem Einfluß von Dipyridamol ( $10^{-3}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l).

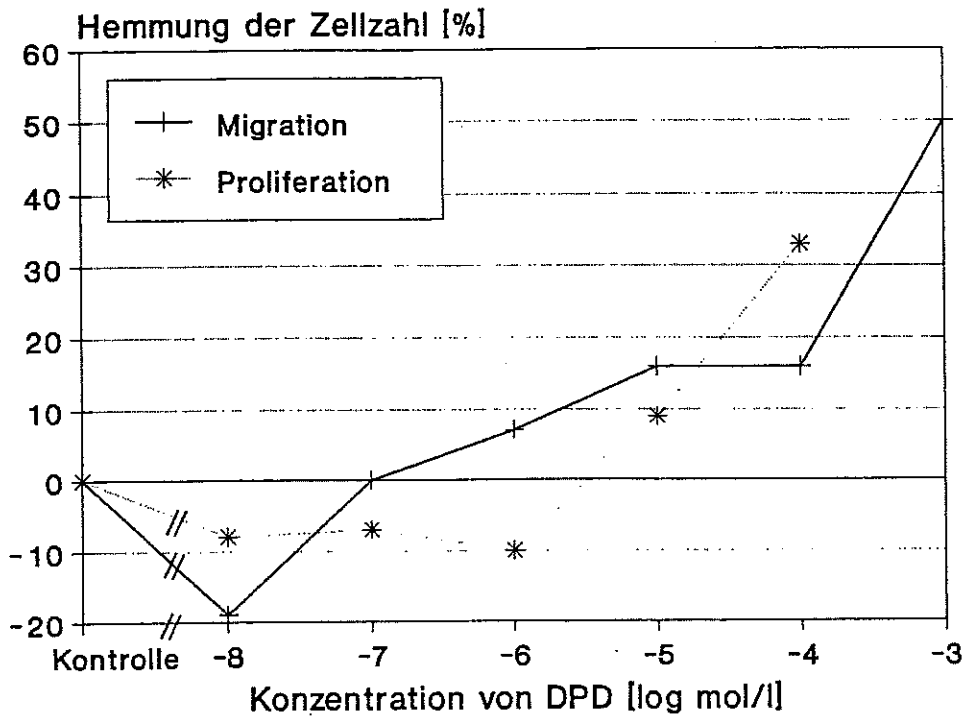


Abb. 44: Migration und Proliferation der Plaqueszellen unter dem Einfluß von Dipyridamol ( $10^{-3}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l). Beide Parameter zeigen einen annähernd parallelen Verlauf.

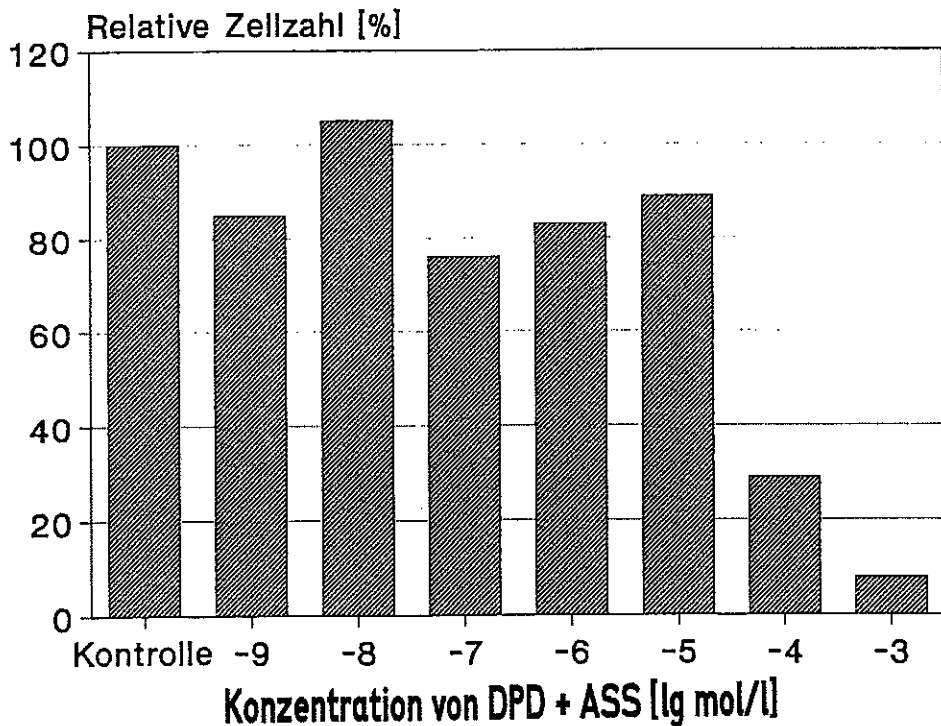


Abb. 45: Der Effekt von Dipyridamol und Acetylsalicylsäure auf die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media.

### 3.1.3.1. Wirkung von ASS und DPD auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 45)

Im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l zeigten sich starke Schwankungen der Zellzahl. Bis zur Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l war aber kein klarer Trend ersichtlich. Erst im toxischen Bereich von  $10^{-4}$  mol/l und  $10^{-3}$  mol/l wurde die Zellzahl erheblich reduziert.

### 3.1.3.2. Wirkung von ASS und DPD auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen (Abb. 46)

In Abb. 46 ist dargestellt, wie SMC aus restenosierendem Plaquegewebe der A. fem. sup. (p-SAC) auf ASS + DPD reagierten (die Kontrolle ohne Substanz wurde als 100% festgesetzt). Im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l lag die Zellzahl zwischen 5% und 15% unter den Werten für die Kontrollschale ohne Substanz. Ein klarer Trend zeichnete sich jedoch nicht ab. Bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l wurde die Gesamtzellzahl um 45% reduziert. Die Reduktion der Zellzahl wurde vor allem durch die SMC der SP-2 verursacht, welche um 87% im Vergleich zur SP-2 der Kontrollschalen vermindert wurde. Die Verminderung der SP-1 betrug nur 14%. Die weitere Erhöhung der Konzentration

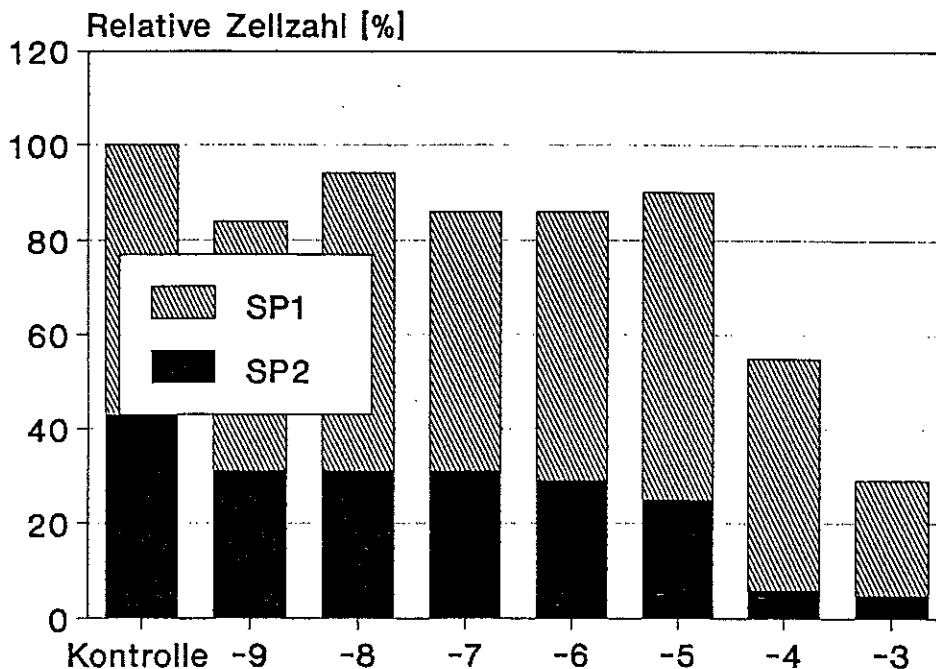


Abb. 46: Der Effekt von Dipyridamol und Acetylsalizylsäure auf die Proliferation von glatten Muskelzellen aus restenosierendem Plaquematerial.



auf  $10^{-3}$  mol/l führte dann aber auch zu einem drastischen Einbruch bei der SP-1, die um weitere 43% reduziert wurde. Bei dieser hohen Konzentration zeigten sich bereits klare zytotoxische Effekte an den SMC.

### **3.2. Fibrinolytika**

#### **3.2.1. Streptokinase (SK)**

SMC aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen und SMC aus koronarem und peripherem Plaquematerial des Menschen wurden in einer Dichte von 2000 bis 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Lochschalen ausgesät. Sowohl glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen, als auch SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial wurden unter dem Einfluß von Streptokinase in Konzentrationen von 1 IE/ml bis 1000 IE/ml kultiviert. Bei jedem Mediumwechsel wurde auch Streptokinase neuerlich zugegeben, nach 7 Tagen Kultivierung unter Substanzeinwirkung wurde die Zellzahl bestimmt.

##### **3.2.1.1. Wirkung von SK auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 47)**

Die Zellzahlen für kultivierte SMC aus der unveränderten Gefäßwand sind in Abb. 47 dargestellt. Die Substanz verhält sich im getesteten Konzentrationsbereich von 1 IE/ml bis 1000 IE/ml völlig neutral, das Wachstum der SMC aus der Media wird nicht verändert.

##### **3.2.1.2. Wirkung von SK auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen (Abb. 48)**

Die Resultate der Versuche mit SMC aus peripheren und koronaren Arterien wurden addiert, um eine kompaktere Darstellung zu erreichen. Aus Abb. 48 ist zu ersehen, daß die Zellzahl im getesteten Konzentrationsbereich zwar bis zu maximal 20% reduziert wurde, da sich aber keine klare Tendenz erkennen ließ, sind diese Befunde wohl nicht im Sinne einer relevanten Proliferationsinhibition zu werten.

#### **3.2.2. Urokinase (UK)**

Für die Untersuchungen mit Urokinase wurden ebenfalls SMC aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen, sowie aus peripherem und koronarem Plaquematerial des Menschen in einer Aussaatdichte von 2000 bis 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> verwendet.

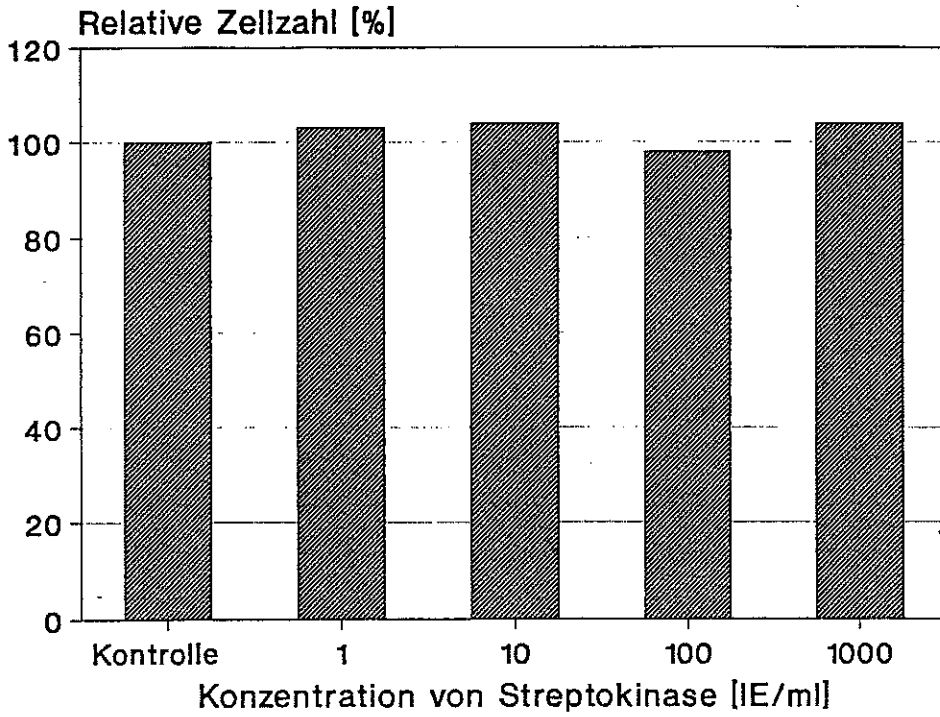


Abb. 47: Der Effekt von Streptokinase (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus der unveränderten Gefäßwand nach 5-tägiger Kultivierung.

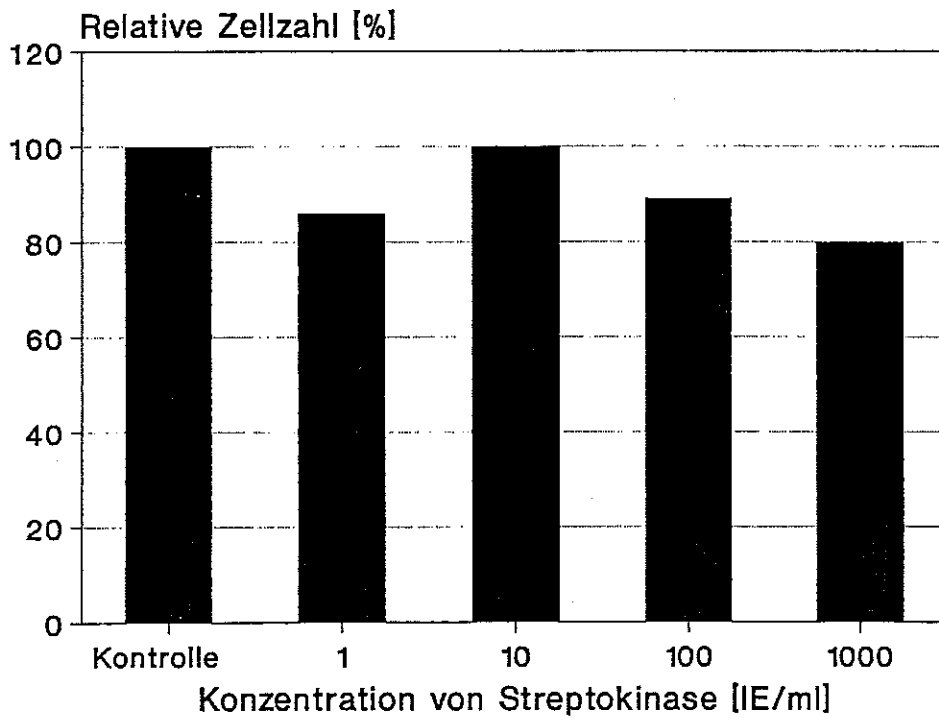


Abb. 48: Der Effekt von Streptokinase (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus restenosierendem Plauegewebe nach 5-tägiger Kultivierung.

Urokinase wurde in Ampuwa-Wasser unter ständigem Rühren gelöst. SMC aus der unveränderten Gefäßwand und Zellen aus atherosklerotischem Plaquematerial wurden mit Urokinase in Konzentrationen von 1 IE/ml bis 1000 IE/ml kultiviert, nach 7 Tagen Kultivierung unter Substanzeinwirkung erfolgte die Analyse der Zellzahl mit dem Zellcounter.

#### **3.2.2.1. Wirkung von UK auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 49)**

Bei den SMC aus der unveränderten Gefäßwand wurden im getesteten Konzentrationsbereich von 1 IU/ml bis 1000 IU/ml kaum Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollschalen ohne Substanz registriert. Die höchste Zellzahl lag 4% über der Kontrollzellzahl, die niedrigste 3% darunter.

#### **3.2.2.2. Wirkung von UK auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen (Abb. 50)**

Die Zellzahl der SMC aus peripheren und koronaren Plaquematerial des Menschen nach 7-tägiger Kultivierung unter dem Einfluß von Urokinase ist in Abb. 50 dargestellt. Bei der Konzentration von 1 IU/ml liegt die Zellzahl 18% über der Kontrolle, die Konzentrationen von 10 IU/ml und 100 IU/ml führen zu keiner Veränderung der Zellzahl. Urokinase in einer Konzentration von 1000 IU/ml reduzierte die Zellzahl um 22%.

#### **3.2.3. Rekombinierter Plasminogen human-Aktivator (t-PA)**

Die Auswirkung von t-PA wurde an kultivierten SMC aus der unveränderten Media und aus atherosklerotischem Plaquematerial der A. femoralis und der LCA untersucht. T-PA wurde in Ampuwa-Wasser gelöst und den SMC in Konzentrationen von 1 U/l bis 1000 U/l zugegeben. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen, bei jedem Mediumwechsel wurden die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen erneuert.

##### **3.2.3.1. Wirkung von t-PA auf glatte Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand (Abb. 51)**

Bei den SMC aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen zeigte sich kein signifikantes Abweichen der Zellzahlen durch 7-tägige Kultivierung mit t-PA im Vergleich zur Kontrolle.

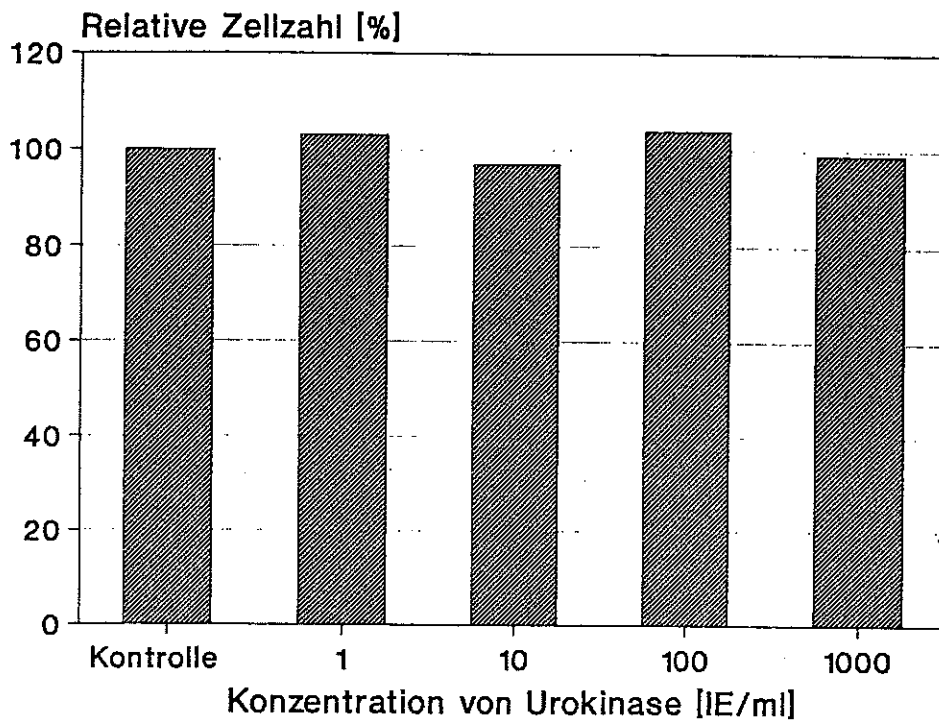


Abb. 49: Der Effekt von Urokinase (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus der unveränderten Gefäßwand.

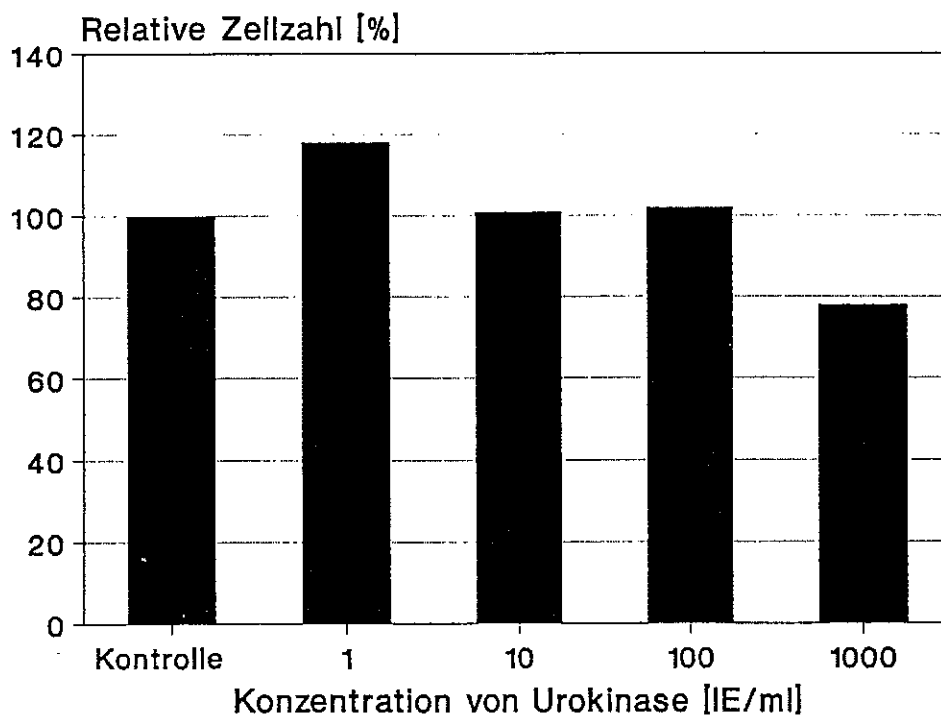


Abb. 50: Der Effekt von Urokinase (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus re-stenosierendem Plaquegewebe.

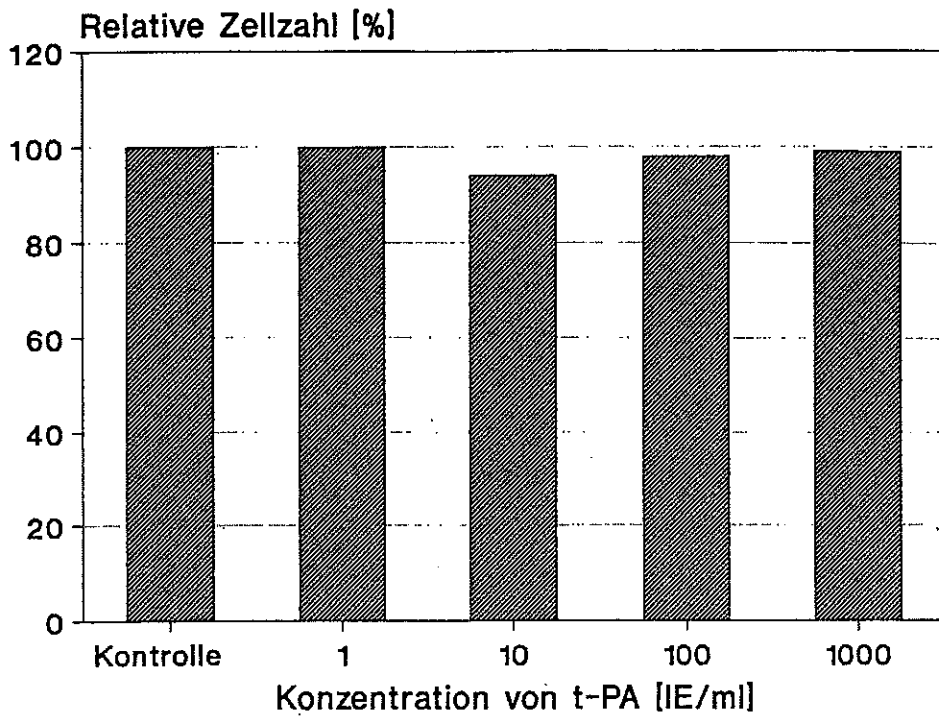


Abb. 51: Der Effekt von rekombiniertem Plasminogen-Aktivator (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus der unveränderten Gefäßwand.

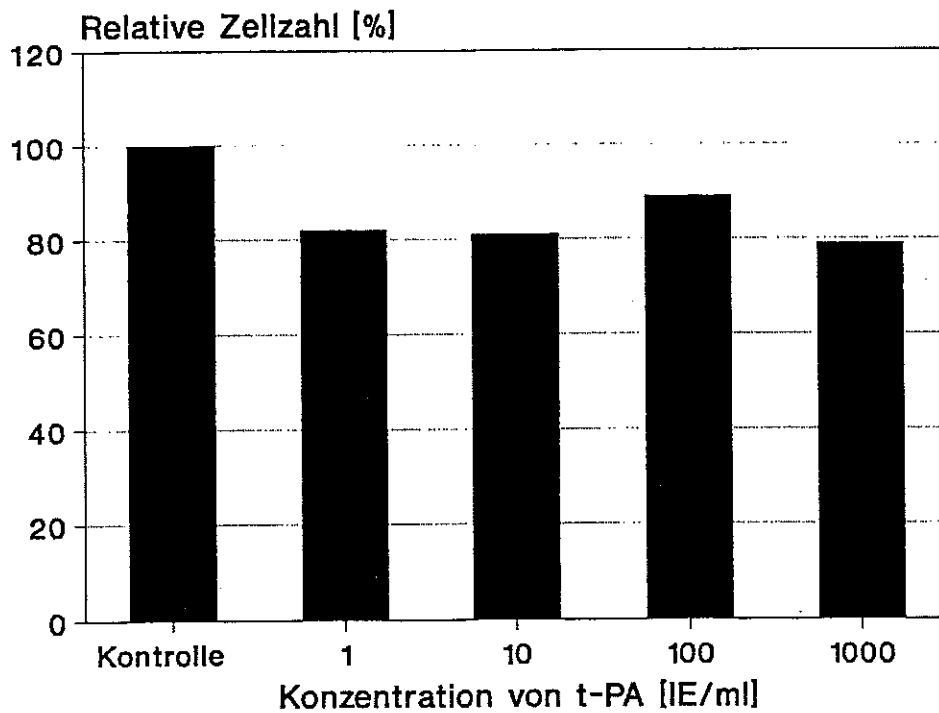


Abb. 52: Der Effekt von rekombiniertem Plasminogen-Aktivator (1 IE/ml bis 1000 IE/ml) auf SMC aus restenosierendem Plaquegewebe.

### **3.2.3.2. Wirkung von t-PA auf Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen (Abb. 52)**

Die Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen des Menschen reagierten bei allen Konzentration von t-PA mit einer etwa 20%-gen Inhibition der Zellzahl. Wie in Abb. 52 dargestellt betrug sie bei den Konzentrationen von 1 IU/ml, 10 IU/ml, 100 IU/ml und 1000 IU/ml 18%, 19%, 11% und 21 %.

## **3.3. Beta-Blocker**

### **3.3.1. Propranolol (PRO)**

PRO konnte in PBS<sup>-</sup> problemlos in kurzer Zeit bei ständigen Rühren gelöst werden. SMC aus primärstenosierendem Plaquematerial der A. femoralis und aus der A. coronaria sinistra (LCA) wurden in Konzentrationen von je 2000 bis 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach dem ersten Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von PRO in Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> mol/l bis 10<sup>-4</sup> mol/l. Bei jedem Medienwechsel wurde die Substanz ebenfalls erneuert, nach 5 Tagen Substanzeinwirkung wurde die Zellzahl bestimmt.

#### **3.3.1.1. Wirkung von PRO auf Plaquezellen aus peripheren Stenosen (Abb. 53)**

Bei Plaque-SMC aus der A. femoralis zeigte sich im Konzentrationsbereich von 10<sup>-10</sup> mol/l bis 10<sup>-6</sup> mol/l eine leichte Zunahme der Zellzahl, ab 10<sup>-5</sup> mol/l kam es zu einer geringen Abnahme der Zellzahl (Abb. 53). Da sich weder eine Tendenz ablesen ließ, noch eine Größenordnung von  $\pm 10\%$  überschritten wurde, sind diese Werte als normale Schwankungsbreite bei Arbeiten mit biologischem Material zu werten. Zytotoxische Effekte wurden nicht beobachtet.

#### **3.3.1.2. Wirkung von PRO auf Plaquezellen aus koronaren Stenosen (Abb. 54)**

Bei Kultivierung von SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial der LCA bestätigten sich diese Ergebnisse. Die Schwankungen waren geringer, ein Trend in Richtung Stimulation oder Inhibition ließ sich nicht ablesen (Abb. 54). Bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> mol/l wurde die Zellzahl um 29% reduziert, zytotoxische Effekte wurden nicht beobachtet.

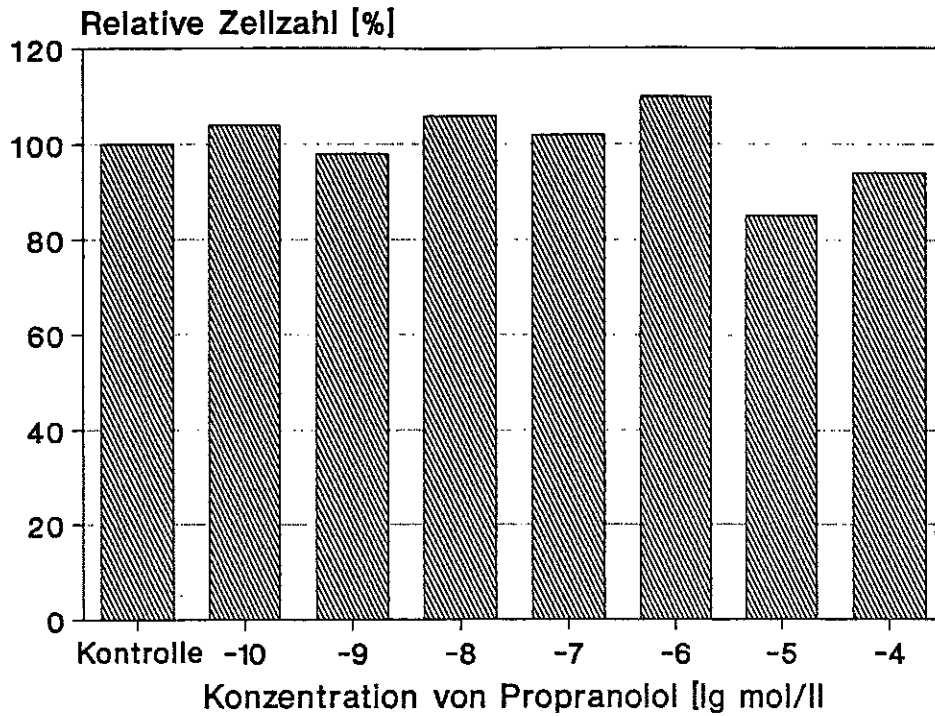


Abb. 53: Die Wirkung von Propranolol ( $10^{-4}$  mol/l bis  $10^{-10}$  mol/l) auf die Proliferation von SMC aus primär-stenosierendem Plaquematerial aus peripheren Arterien.

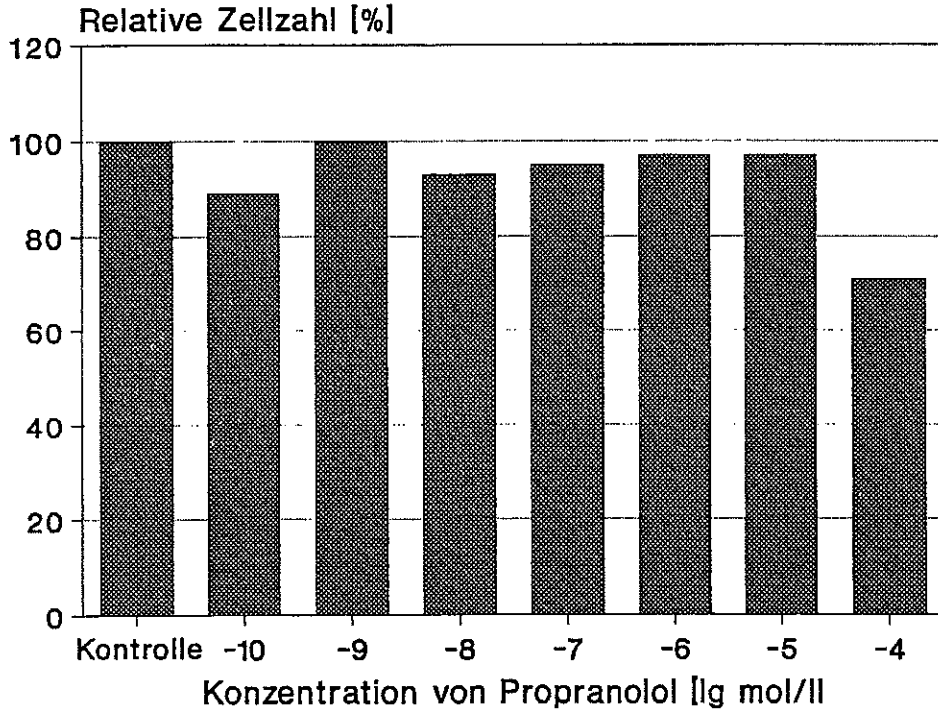


Abb. 54: Die Wirkung von Propranolol ( $10^{-4}$  mol/l bis  $10^{-10}$  mol/l) auf die Proliferation von SMC aus koronaren Arterien.

### **3.4. Calciumantagonisten**

#### **3.4.1. Diltiazem (DIL)**

SMC aus primär- und restenosierenden Läsionen des Menschen wurden in einer Dichte von 2000 bis 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Diltiazem wurde in Ampuwa-Wasser unter ständigem Rühren gelöst und den abgesetzten SMC nach dem ersten Mediumwechsel zugegeben.

Primär-SMC wurden mit in-vitro Konzentration von 5 - 150 mg/l, Re-SMC mit in vitro-Konzentrationen von 0.005 - 150 mg/ml kultiviert. Die therapeutisch verwendete Dosierung von 120 - 180 mg/Tag entspricht in etwa einer in vitro-Konzentration von 20 - 30 mg/l. Bei jedem Mediumwechsel wurde Diltiazem ebenfalls erneuert. Nach drei bzw fünf Tagen wurde die Zellzahl mit dem Zellcounter ermittelt.

##### **3.4.1.1. Wirkung von DIL auf primärstenosierende Plaquezellen aus peripheren und koronaren Stenosen (Abb. 55, Abb. 56)**

Sowohl Primär-SMC aus peripherem Plaquematerial (Abb. 55), als auch SMC aus koronarem Plaquematerial (Abb. 56) zeigten eine klare, dosisabhängige Proliferationshemmung. Bei SMC aus Plaquematerial der A. femoralis war die erste Reduktion der Zellzahl bei einer Konzentration von 15 mg/l zu beobachten. Im therapeutischen Bereich wurde die Zellzahl um 35% gehemmt. Bei der sicherlich toxischen Dosis von 150 mg/l betrug die Zellzahl nur noch 8% der Kontrolle. Die primärstenosierenden Zellen aus koronarem Plaquematerial wurden bei der Konzentration von 15 mg/l nur um 8% gehemmt. Im therapeutischen Bereich war die Hemmung ebenfalls geringer als bei den Plaquezellen der A. fem. sup: die Zellzahl wurde um 16% vermindert. Bei der höchsten getesteten Dosierung (150 mg/l) betrug die Zellzahl noch 33%. Sowohl bei peripheren, wie bei koronaren SMC wurde die SP-1 bei geringeren Konzentrationen am Wachstum gehemmt als die SP-2.

##### **3.4.1.2. Wirkung von DIL auf restenosierende Plaquezellen aus peripheren Stenosen (Abb. 57)**

Ebenso wie SMC aus primärstenosierendem Plaquematerial zeigten SMC aus restenosierendem Plaquematerial eine dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation (Abb. 57). Im Konzentrationsbereich von 0.005 mg/l bis 5,0 mg/l erge-



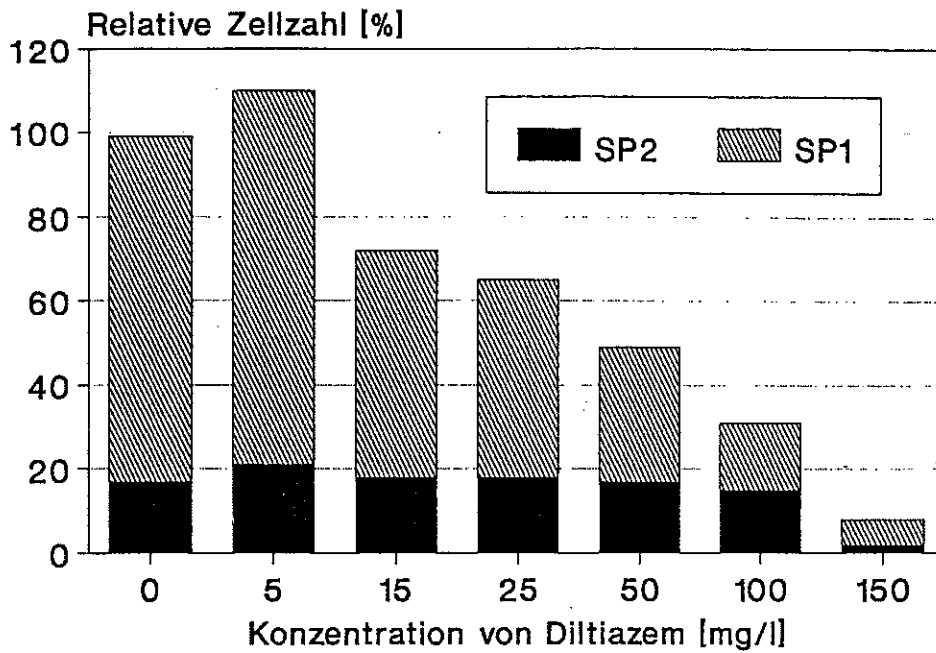


Abb. 55: Der Effekt von Diltiazem ( 5 mg/l bis 150 mg/l) auf die Proliferation von SMC aus primär-stenosierendem Plaquematerial von peripheren Arterien.

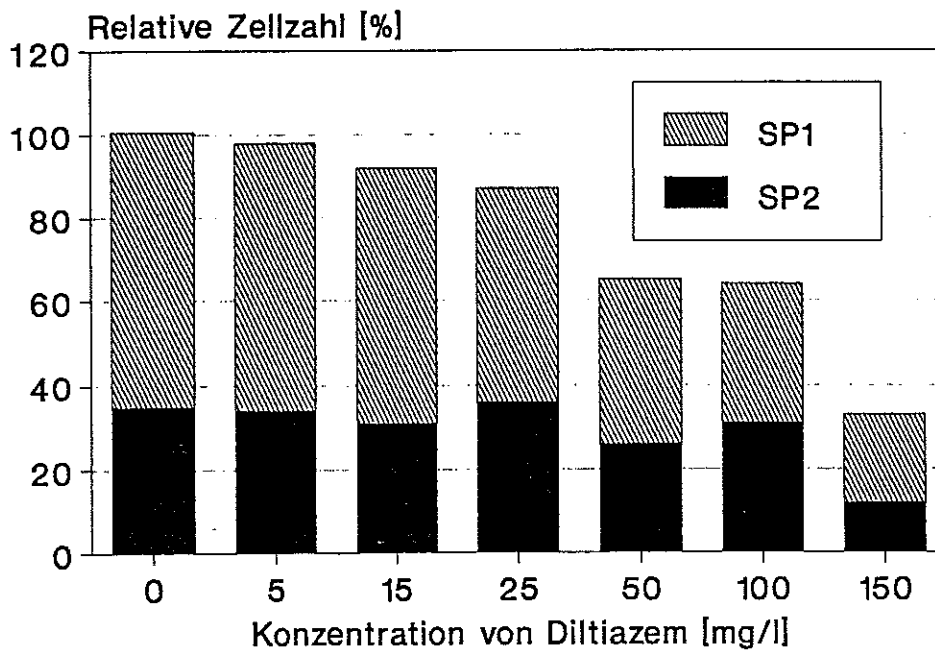


Abb. 56: Der Effekt von Diltiazem ( 5 mg/l bis 150 mg/l) auf die Proliferation von SMC aus primär-stenosierendem Plaquematerial von koronaren Arterien.

ben sich lediglich Schwankungen um den Mittelwert, die, wie bereits erwähnt, bei Arbeiten mit biologischem Material einzukalkulieren sind. Bei der Konzentration von 50 mg/l wurde die Zellzahl um 24% gehemmt. Die Konzentration von 150 mg/l reduzierte die Zellzahl auf 22%. Wie bei Primär-SMC reagierte die SP-1 früher als die SP-2 mit einer Proliferationshemmung.

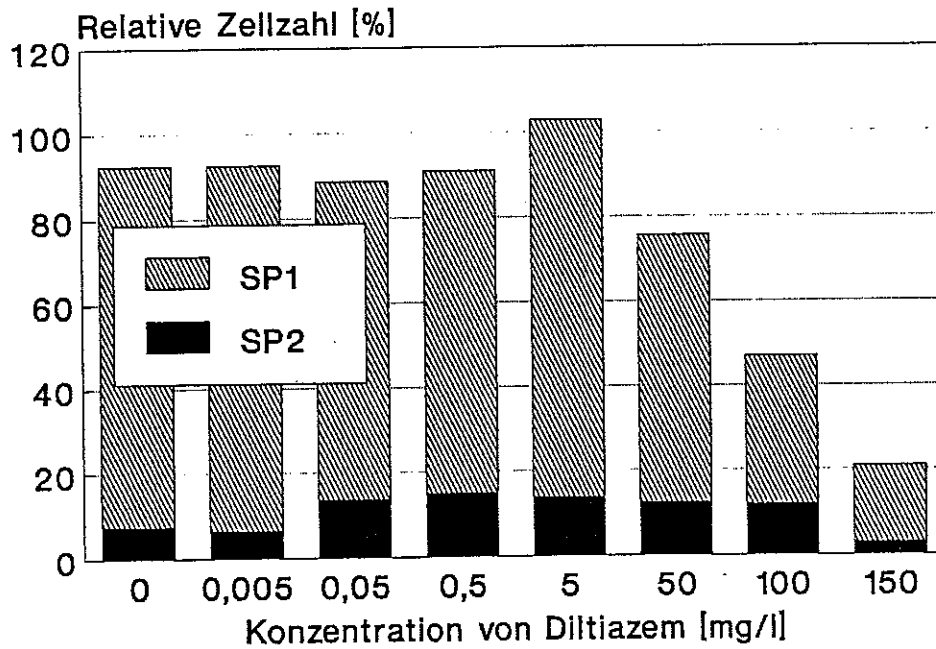


Abb. 57: Der Effekt von Diltiazem (0.0005 mg/l bis 150 mg/l) auf die Proliferation von SMC aus restenosierendem Plaquematerial von peripheren Arterien.

## E. Diskussion

### 1. Kultivierung von Plaquezellen des Menschen

Aus zahlreichen Publikationen geht hervor, daß die glatten Muskelzellen eine zentrale Rolle in der Atherogenese spielen [83,95,96,160,161,175,230]. Auf eine Vielzahl von Reizen reagiert die Gefäßwand mit einem relativ einförmigen Verhaltensmuster: kontraktile glatte Muskelzellen werden aktiviert, migrieren aus der Media in den subendothelialen Raum und entwickeln eine starke mitotische Aktivität; falls sie bereits als neointimale Zellen (Langhans-Zellen) im subendothelialen Raum liegen, können sie auch direkt mit der Proliferation beginnen.

Anhand von zahlreichen Tiermodellen wurde versucht, mit chemischen, physikalischen, elektrischen und immunologischen Reizungen die Vorgänge bei der Atheromentstehung nachzuvollziehen [4,18,59,209,210,232]. Die Zellkultur erlaubt die getrennte Untersuchung von Einzelschritten der Atherogenese. Darüberhinaus bietet sie die Möglichkeit, direkt mit humanem Plaquematerial arbeiten zu können und die Zellen zu untersuchen, welche für die Atheromentstehung verantwortlich sind.

Der Hauptbestandteil der zellulären Komponente des aufgearbeiteten Plaquematerials konnte eindeutig den glatten Muskelzellen zugerechnet werden; in über 80% fand sich eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin. Die weiteren Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigten durchwegs positive Reaktionen mit Antikörpern gegen Vimentin und fast ausnahmslos negative Reaktionen mit Antikörpern gegen Desmin. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Berichten [74]. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, daß bei den Vimentin-positiven Zellen eine erheblich höhere Migrationstendenz besteht als bei den Desmin-positiven Zellen.

Da die dem Blutstrom zugewandte Seite der Gefäßwand in der Regel mit Endothel ausgekleidet ist, wurden die Kulturen auf das Vorliegen von Endothelzellen untersucht. Durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen das Faktor - VIII - assoziierte Antigen können Endothelzellen nachgewiesen werden [106,

107,221]. Überraschenderweise gelang bei Plaqueeextraktion mit dem Simpson-Katheter nie eine Kultivierung und Identifizierung von Endothelzellen. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß das Plaquematerial bei der Bergung mit dem Simpson-Katheter durch das schnell rotierende Kathetersystem erheblich mechanisch belastet wird, wodurch die Endothelzellen u.U. irreversibel geschädigt werden. Bei intraoperativ entnommenem Plaquematerial wurden in einigen wenigen Fällen Endothelzellen beobachtet und mit Antikörpern identifiziert. Scheinbar ist die operative Entnahme mit Pinzetten für das Plaquematerial weniger traumatisch als die perkutane Extraktion.

Neben glatten Muskelzellen bilden Makrophagen einen wichtigen Bestandteil des Atheroms [76,77,97,116,117,161,169]. In den Kulturen lag, wie bereits erwähnt, der Anteil der mittels indirekter Immunfluoreszenz als glatte Muskelzellen identifizierten Plaquezellen bei über 80%. Über die zelluläre Zusammensetzung der verbleibenden 20% wurden keine weiteren Informationen gewonnen. Ross et al. [164] berichteten, daß in primär-stenosierendem Plaquematerial der A. fem. sup. geringe Mengen von Makrophagen nachgewiesen werden konnten. Es ist daher wahrscheinlich, daß auch in den Kulturen Makrophagen gezüchtet wurden. Da jedoch bereits über 80% der kultivierten Plaquezellen als glatte Muskelzellen identifiziert wurden, müßte der Prozentsatz der gezüchteten Makrophagen in den verbleibenden 20% beinhaltet sein.

Bei der Analyse der Zelldurchmesser mit dem Zellzählgerät fielen bei den Plaquezellen zwei unterschiedliche Durchmesserhäufungen auf, die eventuell zwei Subpopulationen zugeordnet werden können. Die Zellen mit dem geringeren Durchmesser wurden SP-1 genannt, die Zellen mit dem größeren Durchmesser SP-2. Von Orekhov [143,145,146] wurden vier unterschiedliche Erscheinungsformen von glatten Muskelzellen aus der Media und der atherosklerotischen Plaque beschrieben, im einzelnen unterschieden sie polygonale, elongierte, sternförmige und asymmetrische Zellen.

Im Gegensatz hierzu beschrieb Björkerud [20,21] zwei Subpopulationen von Gefäßwandzellen: kleine, wenig adhärenente I-Zellen und große, stark adhärenente A-Zellen. Während die großen A-Zellen vorwiegend als Monolayer wuchsen, zeigten die kleinen I-Zellen die Tendenz zum 'hill and valley' - Muster. Von Björkerud

wurde vermutet, daß die I-Zellen möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Atherogenese spielten.

Während die vier Kategorien von Orekhov nur schwer auf die unterschiedlichen Zellgrößenverteilungsmuster übertragen werden können, stimmen die Berichte von Björkerud gut mit den gemachten Beobachtungen überein. Die kleinen Zellen der SP-1 zeigen auffallende Parallelen zu den I-Zellen, während die Zellen der SP-2 den A-Zellen entsprechen könnten. Dartsch et. al. konnten zeigen [49], daß auch das Adhäsionsvermögen der SP-1 und der SP-2 mit dem der I-Zellen und der A-Zellen übereinstimmte.

Da die Vermutung nahe lag, daß es sich bei den großen Zellen der SP-2 um die senescente Form der SP-1 handeln könnte, wurden die Wachstumsraten der SP-1 und SP-2 getrennt analysiert. Obwohl sich in einzelnen Ansätzen durchaus unterschiedliche Wachstumsraten feststellen ließen, erbrachte die Berechnung aller verfügbaren Kurven keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten. Ob die unterschiedlichen Größendurchmesser der Zellen in Zusammenhang mit ihrem Differenzierungsstadium [34] stehen, läßt sich zur Zeit nicht klären.

Der erste Schritt bei der experimentellen Atherogenese ist die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in den subendothelialen Raum. In vitro-Experimente, die diesen Schritt imitieren, sind somit sicherlich interessant. Untersuchungen über das Migrationsverhalten von glatten Muskelzellen aus tierischen Arterien wurden bereits publiziert [89,90]. In den Experimenten mit glatten Muskelzellen aus restenosierendem Plaquematerial des Menschen betrug die Migrationsgeschwindigkeit  $17.9 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{Std.}$  Der Einfluß von Acetylsalicylsäure und Dipyridamol auf das Migrationsverhalten wird im Abschnitt E 3 diskutiert.

Bei allem aufgearbeiteten Gewebeproben zeigte sich immer wieder eine frühe Seneszenz des Plaquematerials aus primär-stenosierenden Stenosen. Die Kultivierung dieser Zellen konnte lediglich bis zur zweiten Passage durchgeführt werden. Diese Befunde stehen im Einklang mit Berichten von Ross [164], der bereits auf die frühe Seneszenz von Plaquezellen aus primär-stenosierendem Plaquematerial hingewiesen hat.

Über das Proliferationsverhalten von Plaquezellen aus primärstenosierenden Läsionen liegen bereits mehrere Untersuchungen vor [21,62,134,144,145,164]. Im Vergleich zu glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media wurde von den Autoren ein vermindertes [164], ein unverändertes [21,62,134] und sogar ein erhöhtes Wachstum [144] beschrieben. In unseren Experimenten zeigten die Plaquezellen aus primärstenosierendem Plaquematerial ein klar erniedrigtes Wachstum im Vergleich zu SMC aus der unveränderten Media.

Im Gegensatz hierzu war das Wachstum der Plaquezellen aus restenosierendem Plaquematerial stets deutlich erhöht [44,49,50,51,53,213]. Dieses stimulierte Wachstum der Plaquezellen aus restenosierendem Plaquematerial war sowohl bei perkutaner Extraktion mit dem Simpson-Katheter [44,49,50,213], als auch bei Extraktion des Plaquematerials durch Thrombendarrektomie [51,53,213] nachweisbar. Die Aufarbeitung von peripherem [44,49,50,213,217] und koronarem [51,53] Plaquematerial zeigte, daß die Entnahmelokalisation keinen Einfluß auf die Wachstumsraten hatte. Es wäre denkbar, daß die extrem gesteigerten Wachstumsraten der SMC aus restenosierendem Plaquematerial als Reaktion der Gefäßwand auf den starken mechanischen Reiz bei der Angioplastie zu verstehen sind.

Durch den Einsatz von verschiedenen Kathetertechniken gelingt es in einem hohen Prozentsatz, das einengende oder verschließende Plaquematerial zu beseitigen und den Blutfluß im betroffenen Gebiet signifikant zu erhöhen. Die Quantifizierung des Erfolges ist durch angiographische und gegebenenfalls angioskopische Kontrolle [5,101,105] möglich. Bei der Sicherung des erreichten Erfolges treten jedoch zwei Hauptprobleme in den Vordergrund:

Innerhalb der ersten Tage nach Angioplastie kann es durch die Endothelverletzung zu einer Thrombosierung im bearbeiteten Gebiet kommen. Um diese Komplikation zu verhindern, wird im Anschluß an die Angioplastie eine "full-dose"-Heparinbehandlung durchgeführt. Als weitere Sicherheitsmaßnahme beläßt man das Schleusensystem, durch das die Kathetersysteme eingeführt wurden, 24 Std in situ, um nötigenfalls unkompliziert einen zweiten Angioplastie-Versuch unternehmen zu können. Auf diese Weise bestehen gangbare Ansätze zur Lösung dieser Akut-Probleme nach Angioplastie.

Die zweite Häufung der Restenosierungereignisse tritt etwa 3 Monate nach Angioplastie auf. In diesem Zeitraum kommt es in ungefähr 30% der Fälle zum Auftreten von Restenosen im behandelten Segment.

Die von uns kultivierten Plaquezellen aus restenosierendem Plaquematerial sind in etwa diesem Zeitraum zuzurechnen. Aus diesem Grunde wäre es durchaus möglich, daß die hochgradig aktivierten Wachstumsraten der SMC aus restenosierendem Plaquematerial als *in vitro*-Äquivalent zu der Häufung von Restenosierungereignissen 3 Monate nach Angioplastie *in vivo* anzusehen sind.

Um weitere Informationen über das *in vitro* Verhalten der Plaquezellen zu erhalten, wurde im nächsten Kapitel der Einfluß verschiedener externer Stimuli auf die Kulturen untersucht, bevor im letzten Abschnitt auf den Einfluß von Medikamenten eingegangen wird.

## 2. Einflüsse auf das Wachstumsverhalten

Bei allen kultivierten Plaquezellen fiel ein relativ hoher Anteil an extrazellulärem Matrixmaterial mit kollagenen und elastischen Fasern auf. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Plaquezellen teilweise metabolisch aktiviert sind und große Mengen an Glykosaminoglykanen produzieren. Von Zellen aus intimalen Verdickungen des Menschen werden hauptsächlich Kollagen Typ III und nur geringe Mengen Kollagen Typ I gebildet [129]. Dieser Befund steht in Einklang mit den vorliegenden Experimenten, in denen die Beschichtung der Kulturschalen mit lathyrischem Rattenkollagen Typ I lediglich das Wachstum der SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial (Abb.) reduzierte, während das Wachstum der SMC aus der unveränderten Gefäßwand nicht beeinflusst wurde.

Ein wesentlicher Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Zellen wird durch die Konzentration des verwendeten Serums ausgeübt. So reagierten SMC aus primärstenosierenden Läsionen auf steigende Serumkonzentrationen mit einer klaren, dosisabhängigen Proliferationssteigerung [49,214,220]. Diese Befunde stehen im klaren Widerspruch zu Untersuchungen von Ross et al. [163,164], die berichteten, daß SMC aus primärstenosierenden Läsionen der A. fem. sup. keine Reaktion auf steigende Serumkonzentration von 1 % bis 10% zeigen und deshalb als seneszent anzusehen seien.

Die Populationsverdopplungsraten für glatte Muskelzellen aus restenosierenden Läsionen lagen bei den Serumkonzentration von 5% bis 20% mehr als doppelt so hoch wie die Vergleichsraten für SMC aus primärstenosierenden Läsionen, bei der Kultivierung mit 5% Serum betrug der Unterschied sogar mehr als das dreifache. Dieses zeigt klar die hohe Aktivierbarkeit der SMC aus restenosierenden Läsionen, die bereits auf geringe Wachstumsreize mit einer extrem hohen Populationsverdopplungsrate reagieren.

Re-SMC reagierten auf die Erhöhung der Serumkonzentration von 1% auf 5% mit einer Wachstumssteigerung um fast 350%, bei der weiteren Steigerung der Serumkonzentrationen um jeweils 5% fielen die Proliferationssteigerungen dann mit 25%, 15% und 2% deutlich geringer aus. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß bereits von geringen Wachstumsfaktoren Re-SMC maximal zur Proliferation angeregt werden. Ob bei höheren Konzentrationen keine weitere Wachstumssteigerung erfolgt, weil alle Rezeptoren der Zelle gesättigt sind oder weil die Verdopplungszyklen einfach nicht weiter verkürzt werden können läßt sich nicht entscheiden.

Da die Steigerung der Serumkonzentration von 15% auf 20% lediglich eine Zunahme der Populationsverdopplungsraten um 2% bewirkte, kann davon ausgegangen werden, daß die routinemäßig verwendete Serumkonzentration von 15% durchwegs optimale Versuchsbedingungen gewährleisten.

In der Literatur wurde von einer mitotischen Aktivität berichtet, die von Zellen aus atheromatösen Läsionen ins Kulturmedium sezerniert wird [125,133,222]. Diese Befunde konnten durch unsere Untersuchungen eindeutig bestätigt werden. Das Wachstum der langsam proliferierenden SMC aus primärstenosierenden Läsionen wurde durch die Verwendung von konditioniertem Medium von SMC aus restenosierenden Läsionen um 60% gesteigert werden [49,214,220].

In der Frühphase der Atherogenese erfolgt die Migration der glatten Muskelzellen stets von der Media in Richtung Gefäßlumen, eine Migration in Richtung Adventitia wurde bisher nicht beschrieben. Eine Erklärung dieses Effektes ist durch chemotaktische Wirkungen der atherogenen Reize möglich. Im Elektrostimulationsmodell von Betz wird die Reizung des Gefäßes jedoch durch eine Elektrode



verursacht, die an der Gefäßaußenseite angebracht ist; die Migration der Zellen erfolgt jedoch wiederum in Richtung Gefäßlumen. Bei unseren Versuchen wurde das Wachstum von Plaquezellen durch von Fibroblasten konditioniertes Medium um nahezu die Hälfte reduziert. Dieses Ergebnis könnte durch die Sekretion einer inhibitorischen Aktivität in das Kulturmedium erklärt werden, die wiederum für das Migrationsverhalten der SMC in vivo von Bedeutung sein könnte [49].

Um den Einfluß von Wachstumsfaktoren weiter präzisieren zu können, wurden Primär-SMC und Re-SMC unter dem Einfluß von ECGF und PDGF kultiviert [49]. Während Primär-SMC sich nicht stimulieren ließen, reagierten Re-SMC mit einer deutlichen Wachstumssteigerung. Dieser Befund ist als weiterer Hinweis für die hochgradige Aktivierbarkeit der Re-SMC zu werten. Interessanterweise fiel bei Re-SMC in höheren Passagen die Stimulierbarkeit geringer aus, was auf eine beginnende Seneszenz dieser Zellen schließen läßt.

Die Stimulation der Primär-SMC gelang somit zusammenfassend durch ein Mitogengemisch, welches durch die Re-SMC in das Kulturmedium sezerniert wurde, nicht jedoch durch die alleinige Zugabe von PDGF und ECGF. Dieses deutet darauf hin, daß die Zusammensetzung des von den Re-SMC sezernierten Mitogengemisches von PDGF und ECGF verschieden sein muß.

Die weitere Aufschlüsselung dieses Mitogengemisches und die Entwicklung von Antikörpern gegen die Hauptbestandteile könnten wichtige Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen liefern. Die Koppelung solcher Antikörper mit aggressiven Komponenten könnte eventuell selektiv dieses Mitogengemisch inaktivieren und damit einen Teil der SMC-Proliferation hemmen.

### 3. Medikamenten-Testungen

Neben einer ausreichenden Vorsorge durch Eliminierung der Risikofaktoren, ist eine medikamentöse Beeinflußbarkeit des atherosklerotischen Prozesses von klinischer Bedeutung. Die Untersuchung der Medikamenten-Wirkungen auf die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media [165,166] und aus atherosklerotischen Plaques [52,211,212,215,216,218,220] liefert interessante Basisinformationen bezüglich dieser Zielsetzung.

Interventionelle Techniken werden in immer größerem Umfang zur symptomatischen Behandlung von Folgeerscheinungen der Atherosklerose eingesetzt. Trotz der Verschiedenheit der technischen Ansätze [39,60,78,99,103,104,110,111,113,114, 167,178,179,180,181, 184,185], liegen die Restenosierungsraten im behandelten Segment bei etwa 30% [61,65,87,123,130,158,196]. Die Art des atherogenen Reizes, der durch die Intervention verursacht wird, spielt für die Gefäßwand offenbar keine Rolle, die Restenosierungsraten zeigen keine Abhängigkeit von der angewendeten Technik.

Wie bereits ausgeführt wurde, wiesen die glatten Muskelzellen aus restenosierendem Plaquematerial ein extrem gesteigertes Wachstum im Vergleich zu glatten Muskelzellen aus primärstenosierendem Plaquematerial auf. Dieser Befund scheint das in vitro-Äquivalent zu dem oftmals innerhalb von Wochen bis Monaten nach Angioplastie auftretenden Restenosen sein. Von Austin et al. [1] wurde bereits 1985 die Proliferation von glatten Muskelzellen als eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten von Restenosen nach koronarer Angioplastie angesehen. Wenn diese Erklärung richtig ist, bestünde ein klinisches Interesse an einer technischen oder medikamentösen Hemmung der Zellproliferation [12,13,15,16, 17,112,211,220].

Zu bedenken ist bei allen Untersuchungen, daß es sich um ein in vitro-System handelt. Die Zellen stammen zwar direkt aus stenosierendem Gewebe, inwieweit ihre Reaktionen und ihr Wachstum in Kultur mit ihrem Verhalten in vivo vergleichbar ist, kann nicht abschließend beurteilt werden.

Alle Substanzen wurden einem standardisierten Proliferations-Test unterworfen. Diese Methode ist sicherlich im Routine-Test-Verfahren am besten anzuwenden, da sie relativ einfach durchzuführen ist und bei Verwendung eines Zellzählgerätes objektiv ausgewertet werden kann. Da vor der Zellproliferation aber die Zellmigration erfolgen muß, ist auch die Einbeziehung der Migration in den Testansatz wünschenswert. Vom methodischen Ansatz beinhaltet diese Technik jedoch mehrere Unsicherheitsfaktoren, insbesondere sind hierbei die Schnittführung bei der Zellverletzung und die Auswertung des Versuchs anzusprechen. Die Migration sollte daher nur ergänzend zu einem Proliferationstest betrachtet werden, die gemeinsame Darstellung von Migration und Proliferation in einer Dosis-Wirkungskurve erlaubt eine schnelle Orientierung.

### 3.1. Thrombozytenaggregationshemmer

Die schwersten Komplikationen nach PTCA bestehen aus Myokardinfarkten, notfallmäßigen Bypassoperationen oder sogar dem Tod des Patienten [55]. Da in diesen Fällen die Plättchenaggregation und die akute Thrombose wesentliche Faktoren ausmachen [229], wird Acetylsalicylsäure als eines der Standardmedikamente bei Patienten während und nach PTCA eingesetzt [67]. Von Dipyridamol konnte eine Hemmung der Plättchenaggregation nach Gefäßverletzung im Tiermodell gezeigt werden, die auf einem anderen Wirkprinzip beruht als bei Acetylsalicylsäure [192]. Aus diesem Grunde wurde Dypiridamol als Vorbehandlung [2,3,56,58,119,124,137,207] und Nachbehandlung [174] bei Angioplastien und Bypass-Operationen [36] eingesetzt. Da diese Substanzen somit zu einem Zeitpunkt mit der frisch dilatierten Gefäßwand in Kontakt kommen, an dem der Prozeß der Zellaktivierung eventuell bereits eingesetzt hat, wurde der Einfluß auf das Wachstumsverhalten von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen und aus primär- und restenosierendem Plaquematerial untersucht.

Die Auswirkung von Acetylsalicylsäure wurde an glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand, aus primärstenosierendem Plaquematerial und aus restenosierendem Plaquematerial untersucht. Bei den SMC aus der unveränderten Gefäßwand konnte bei Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l keine Beeinflussung der Proliferation der SMC erzielt werden, obwohl die Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l bereits im toxischem Bereich liegt. Erst bei der höchsten Konzentration von  $10^{-2}$  mol/l gingen nahezu alle Zellen zu Grunde.

Überraschenderweise fand sich bei SMC aus primär-stenosierenden Läsionen eine Inhibition des Wachstums bereits bei Konzentrationen, die im therapeutischen Bereich lagen. Die geringen Konzentrationen von Acetylsalicylsäure hatten hierbei den gleichen Effekt wie höhere Dosierungen. Diese Befunde für sich genommen sprächen für eine 'Low - dose'-Wirkung von Acetylsalicylsäure auf das Proliferationsverhalten von glatten Muskelzellen [211,216]. Bei der Untersuchung von glatten Muskelzellen aus restenosierenden Läsionen konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden, ähnlich wie bei SMC aus der unveränderten Gefäßwand des Menschen zeigte sich ein Effekt erst bei toxischen Konzentrationen. Der Unterschied zwischen primär- und restenosierenden SMC wird in

der Dosis-Wirkungskurve deutlich. Da der Effekt der Acetylsalicylsäure bei den primär-stenosierenden SMC jedoch nur sehr gering und nicht dosisabhängig war, dürfte die Dosis-Wirkungskurve der Re-SMC relevant sein.

Bei der Analyse der Zellmigration wurden diese Ergebnisse im Prinzip bestätigt. Sowohl die Anzahl der migrierten Zellen, als auch die Migrationsgeschwindigkeit wurden erst im toxischen Bereich beeinflusst. Eine Beeinflussung von Migration und Proliferation durch eine Veränderung des pH-Wertes in den Schalen nach Applikation von Acetylsalicylsäure konnte für den Konzentrationsbereich bis  $10^{-3}$  mol/l ausgeschlossen werden.

Der Effekt von Dipyridamol wurde an glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand und aus primärstenosierendem Plaquematerial untersucht. Bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l konnten weder SMC aus der unveränderten Gefäßwand noch SMC aus der atherosklerotischen Gefäßwand in ihrem Wachstum signifikant beeinflusst werden. Die Erhöhung der Konzentration auf  $10^{-5}$  mol/l, welche in etwa einer in vivo Dosierung von 220 mg/Tag entsprechen dürfte, führte bei SMC aus der unveränderten Gefäßwand zu einer Inhibition der Zellproliferation um 30%. Bei den SMC aus der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand wurde die Zellzahl nur um 9% gehemmt, was wiederum innerhalb der biologischen Schwankungsbreite liegen dürfte. Bezüglich der Zellproliferation ergeben sich in vitro somit keine inhibitorischen Aktivitäten von Dipyridamol.

Ergänzend zu den Befunden bezüglich der Zellproliferation läßt sich die Zahl der migrierten Zellen und die Migrationsgeschwindigkeit bestimmen. Vor allem die Auszählung der migrierten Zellen kann nicht mit der gleichen Objektivität erfolgen, wie die Auszählung der Zellen mit dem Zellcounter für den Proliferations-test. Die Zahl der migrierten Zellen wurde im therapeutischen Bereich von ungefähr  $10^{-5}$  mol/l um 16% reduziert (Abb. 42), die Migrationsgeschwindigkeit wurde in diesem Bereich nur um 7% reduziert (Abb. 43). Eine Bewertung der Zellmigration erscheint aus den bereits genannten Gründen nur in gemeinsamer Betrachtung mit dem Effekt auf die Zellproliferation sinnvoll. Wie aus Abbildung 44 zu ersehen ist, ergeben sich somit weder für die Migration noch für die Proliferation eine Inhibition im therapeutischen Bereich.

Da im klinischen Einsatz häufig die Kombination von Acetylsalicylsäure und Dipyridamol verwendet wird, wurde auch ein Testansatz mit beiden Medikamenten durchgeführt. Ein synergistischer Effekt, wie er im Tiermodell für die antithrombotische Wirkung beschrieben wurde [92], konnte in vitro weder für die Zellproliferation der SMC aus der unveränderten Gefäßwand, noch für SMC aus atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden.

Die in vitro Ergebnisse geben somit keinen Anhaltspunkt für einen hemmenden Effekt von Acetylsalicylsäure und Dipyridamol als Einzelsubstanz oder als Kombinationsprodukt auf die Zellmigration und Zellproliferation von Plaquezellen.

### 3.2. Fibrinolytika

Seitdem nachgewiesen werden konnte, daß durch Thromben verschlossene Koronargefäße durch Streptokinase widereröffnet werden können [154], werden Fibrinolytika häufig im klinischen Alltag bei akutem Myokardinfarkt zur Thrombolyse eingesetzt [198,201,202,203,204].

Da die Proliferation von glatten Muskelzellen einen wichtigen Schritt in der Atherogenese darstellt und das atherosklerotische Plaquematerial während der Lysebehandlung mit den fibrinolytischen Substanzen in Berührung kommt, wurde der Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Plaquezellen in vitro untersucht.

Durch die thrombolytische Therapie gelingt es jedoch nicht immer, einen ausreichenden Blutfluß zu gewährleisten [75]. In diesen Fällen bleibt im Gebiet des Verschlusses eine Reststenose zurück [57], die auf die zugrunde liegende atherosklerotische Gefäßverengung zurückzuführen ist. Diese Reststenosen können erfolgreich durch Angioplastie mechanisch dilatiert werden [54,82,93,132]. Da bereits während dieser interventionellen Therapie thrombotische Gefäßverengungen und Verschlüsse auftreten, wird die Lysetherapie bisweilen auch während des Eingriffs fortgeführt [91,197,203].

Die Fibrinolytika kommen somit in der Akutphase des Myokardinfarktes mit atherosklerotisch veränderten Gefäßen und eventuell frisch dilatierten Arealen in Kontakt. Da in dieser instabilen Situation eine Stimulation der Zellprolifera-

tion nicht ungefährlich wäre, wurde der Einfluß der Fibrinolytika auf die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Gefäßwand und aus Plaquematerial von koronaren Arterien [218,219] untersucht.

Die längsten klinischen Erfahrungen liegen mit Streptokinase vor. Seit dem erstmaligen Einsatz 1959 erfolgt der klinische Einsatz bei akutem Myokardinfarkt. Es konnte klar gezeigt werden, daß durch die intravenöse Applikation von Streptokinase der das Gefäß verschließende Thrombus gelöst und die Mortalität gesenkt werden konnte [127]. Als Dosierung werden zumeist 1 500 000 IE innerhalb von einer Stunde verabreicht [172]; diese Dosierung wurde auch in verschiedenen anderen Studien angewendet [127]. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß mit 750 000 IE ähnliche Resultate erreicht werden konnten wie mit 1 500 000 IE, während die Dosierung von 3 000 000 IE die besten Ergebnisse vorweisen konnte [182].

Mit den getesteten Konzentrationen von 1 IE/ml bis 1000 IE/ml wurde der therapeutische Bereich sicherlich mit abgedeckt, der in etwa zwischen 125 IE/ml und 500 IE/ml liegen dürfte. Bei den SMC aus der unveränderten Gefäßwand zeigte sich selbst bei der Konzentration von 1000 IE/ml keine Beeinflussung der Zellproliferation. SMC aus atherosklerotischem Plaquematerial koronarer Arterien wurden zwar bei der therapeutisch erreichbaren Konzentration von 100 IE/ml um 11% gehemmt. Da eine Proliferationshemmung im gleichen Ausmaß bereits auch bei 1IE/ml festzustellen war, ist dieses Ergebnis wohl als nicht signifikant zu werten.

Urokinase besitzt eine geringere Antigenität als Streptokinase, wodurch weniger allergische Reaktionen ausgelöst werden. Der Einsatz von Urokinase erfolgt als Monotherapie oder in Kombination mit rekombiniertem Plasminogen Aktivator [138,204]. Die höchsten therapeutisch verabreichten Dosierungen liegen bei 3 000 000 IE [223].

Bei SMC aus der nicht atherosklerotischen Media veränderte sich das Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich, die Schwankungen lagen nicht über  $\pm 5\%$  vom Mittelwert. Ähnlich wie bei Streptokinase dürfte die therapeutische Dosierung ungefähr bei 500 IE/ml liegen. Bei SMC aus atherosklero-

tischem Plaquematerial wurde erst bei Konzentrationen deutlich über dem therapeutischen Bereich eine Inhibition der Zellproliferation erreicht.

Der rekombinierte Plasminogen human-Aktivator unterscheidet sich neben dem Wirkmechanismus durch das neuartige Herstellungsverfahren von den anderen Fibrinolytika. Durch seinen Einsatz gelang es in vielen Fällen, eine Rekanalisierung von verschlossenen Koronararterien zu erreichen, die Infarktgröße zu limitieren und die Überlebensrate zu erhöhen [17,177,198,228]. Durch die zusätzliche Durchführung einer PTCA im Anschluß an die Lysebehandlung konnten auch hier die Ergebnisse weiter verbessert werden [25,29,88,156].

Das Wachstum der SMC aus der normalen Media wurde selbst bei den höchsten Konzentrationen nicht beeinflusst. Bei den SMC aus der unveränderten Gefäßwand wurde das Wachstum zwar um durchschnittlich 20% gehemmt, da diese Hemmung jedoch nicht dosisabhängig ist und bereits bei der geringsten getesteten Konzentration vorliegt, handelt es sich in diesem Fall eher um einen Meßfehler in den Kontrollschalen.

Zusammenfassend zeigte sich somit bei allen getesteten Fibrinolytika in Konzentrationsbereichen, die therapeutisch erreichbar sind, keine Stimulation der glatten Muskelzellen. Ausgehend von den in vitro-Daten spricht somit nichts dafür, daß durch den Einsatz von Fibrinolytika die Zellproliferation und damit die Entstehung von Restenosen gefördert wird.

### 3.3. $\beta$ -Rezeptoren Blocker

Im klinischen Alltag werden  $\beta$ -Blocker bei der koronaren Herzkrankheit, arterieller Hypertonie und Herzrhythmusstörungen verwendet. Durch den kurzfristigen und langfristigen Einsatz von  $\beta$ -Blockern nach akutem Myokardinfarkt [73,234] kommen diese Substanzen mit atherosklerotischem Plaquematerial in Kontakt.

Bei Untersuchungen am Kaninchen wurde ein antiatherogener Effekt von Propranolol diskutiert [37,226]. Zellkulturuntersuchungen an glatten Muskelzellen der Ratte führten zu keinem Effekt auf das Wachstum [22]. Andererseits berichtet Orekhov [147] von einer Stimulation des Wachstums glatter Muskelzel-

len aus der normalen und atherosklerotischen Gefäßwand des Menschen. Da sich bei Untersuchungen von Roth [165] diese Befunde nicht bestätigten, wurde diese Substanz ebenfalls ins Programm aufgenommen.

In den Untersuchungen mit Propranolol an SMC aus der unveränderten Gefäßwand zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Roth [165] keine Stimulation der Zellproliferation. Dasselbe Ergebnis erbrachte die Austestung dieser Substanz an Plaquezellen aus koronaren Plaquematerial.

### **3.4. Calciumantagonisten**

Der Einsatz von Diltiazem während und nach koronarer Angioplastie erfolgt in erster Linie wegen seines günstigen Effektes auf die stabile Angina pectoris [152] und bei vasospastischer Angina [98].

Im Tiermodell wurde für einige Calciumantagonisten ein hemmender Effekt auf die Entstehung der Atherosklerose nachgewiesen [140,199,208]. Speziell für Diltiazem liegen unterschiedliche Daten vor. Einerseits wurde berichtet, daß bei Cholesterol-gefütterten Kaninchen die Atherosklerose durch Diltiazem gehemmt werden konnte [194], andererseits wurde bei Yorkshire-Schweinen nach endothelialer Denudation mit einem Ballonkatheter die Atheroskleroseentstehung bei Cholesterol-Fütterung nicht gehemmt [168].

Zellkulturuntersuchungen mit Gefäßwandzellen von Tieren zeigten eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums [14,16], die bei der Konzentration von 30 mg/l 37% betrug. Bei Untersuchungen an glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media des Menschen wurden im therapeutischen Bereich durch Flunarizin Wachstumshemmungen um 20% erzielt [165].

Die Austestung von Diltiazem an Plaque-SMC aus peripheren [212,215] und koronaren Arterien des Menschen bestätigte diese Ergebnisse. Bei den Plaquezellen aus peripheren Arterien betrug die Inhibition im therapeutischen Bereich 35%, bei den Zellen aus koronarem Plaquematerial 16%. Unterschiede zwischen SMC aus primärstenosierenden und restenosierenden Läsionen wurden nicht beobachtet.



Der klinische Einsatz von Diltiazem zur Reduktion der Restenose-Raten nach PTCA war bislang allerdings nicht erfolgreich. Corcos [38] berichtete in einer prospektiven randomisierten Studie an 92 Patienten von keiner signifikanten Reduktion der Restenose-Rate. Diese Ergebnisse wurden von Guiteras [91] bestätigt. Die Ursache für die Diskrepanz zwischen den Zellkultur-Daten und der klinischen Realität könnte darin zu suchen sein, daß die Inhibition der SMC im therapeutischen Bereich noch zu gering war, um eine signifikante Änderung der Restenose-Rate herbeizuführen.

#### **4. Eine mögliche Rolle der Zellkultur in der Atheroskleroseforschung**

Wie bereits ausführlich dargestellt lassen sich durch die Zellkulturtechnik Aufschlüsse über das Migrations- und Proliferationsverhalten von Plaquezellen gewinnen. Das klinische Interesse an Zellkulturexperimenten liegt jedoch in Basisuntersuchungen bezüglich einer möglichen Hemmung dieser Prozesse. Hier bietet sich die Zellkultur als standardisierbares und überschaubares Testsystem an [51,166].

In einer ersten Phase scheint es erforderlich zu sein, den Stellenwert der Methode festzulegen, um Rückschlüsse bezüglich der Aussagefähigkeit der Methode zu erhalten. Dies wird in erster Linie durch einen Vergleich der in vitro und in vivo Wirkung verschiedener antiproliferativer Substanzen geschehen. Ein Kernproblem bei der Auswertung der in vitro-Daten ist sicherlich die Angabe des therapeutischen Bereichs. Ein Lösungsansatz könnte in der Bestimmung von in vitro-Konzentrationsbestimmungen in der Kulturschale bestehen, die dann mit den bereits für viele Medikamente vorliegenden in vivo-Spiegeln verglichen werden können.

Der schwerpunktmäßige Einsatz der Zellkultur könnte anschließend als eine Art Prescreening-Modell erfolgen [165,166], um aus der Vielzahl der angebotenen Substanzen antimigratorische und antiproliferative Substanzen herauszufiltern. Nach einer Testung im Tiermodell könnten die vielversprechendsten Substanzen dann in klinischen Studien geprüft werden.

Eine technisch höchst anspruchsvolle, aber sicher für Routineuntersuchungen zumindest momentan noch nicht anwendbare Methode stellen Versuche mit En-

endothelzellen und glatten Muskelzellen im Transfilter-Ko-Kultur-Modell dar [63,64]. Es gibt bereits eine Arbeitsgruppe, die versucht diese schwierigen Untersuchungen auch mit humanen Plaquezellen und Endothelzellen durchzuführen.

Der Gradmesser für die Anwendbarkeit einer Methode im Rahmen von Reihenuntersuchungen liegt jedoch in ihrer einfachen Anwendbarkeit und in objektiv erhebbaren Untersuchungsergebnissen. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien scheint der einfache Proliferationstest am besten für umfangreiche Testreihen geeignet zu sein. Die Substanzen, die im Proliferationstest erfolgversprechend Ergebnisse erzielt haben, könnten dann in einem ergänzenden Migrationsansatz untersucht werden. Der mögliche zukünftige Einsatz der (komplizierten) Transfilter-Co-Kultur würde dann als letzter Schritt erfolgen, um die Wechselwirkungen zwischen glatten Muskelzellen und Endothelzellen unter Medikamenteneinfluß in einem System untersuchen zu können.

Durch die Zellkulturtechnik können standardisierte Experimente mit jenen Zellen durchgeführt werden, die bei der Atherogenese und wohl auch beim Restenosierungsprozeß nach Angioplastie eine entscheidende Rolle spielen. Hierdurch ergeben sich wichtige Informationen für einen Einblick in die komplexen Vorgänge der Atherogenese. In welchem Ausmaß die Zellkulturtechnik als Prescreening-Verfahren Zusatzinformationen über sinnvolle Therapieansätze für eine Eindämmung der Atherosklerose und vor allem der Restenosierungsergebnisse nach Angioplastie liefern kann, wird sich in der Zukunft zeigen.

## F. Zusammenfassung

### 1. Kultivierung von Plaquezellen des Menschen

Die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Media in den subendothelialen Raum wird als ein Schlüsselereignis bei der Entstehung der Atherosklerose angesehen. Um weitere Informationen über das Wachstumsverhalten dieser Zellen zu erhalten, wurden aus atherosklerotischem Plaquematerial Zellen isoliert und ihre Wachstumscharakteristika in Zellkulturen untersucht. Die Entnahme des Plaquematerials erfolgte perkutan durch einen Atherektomie-Katheter aus der A. femoralis superficialis, der A. poplitea und der A. renalis und im Rahmen von operativen Eingriffen aus der A. coronaria, der A. carotis, der A. femoralis und der Aorta abdominalis. Die Mehrzahl dieser Zellen konnte durch positive Reaktion mit Antikörpern gegen glattnuskuläres  $\alpha$ -Aktin als glatte Muskelzellen identifiziert werden. Bei der Kultivierung bildeten die Zellen 'Nodules' und entwickelten nach Konfluenz ein 'hill and valley' - Wachstumsmuster; beide Wachstumsmuster sind typisch für glatte Muskelzellen. Lediglich in seltenen Fällen konnten bei den Plaquezellen, die aus operativ extrahiertem Plaquematerial stammten, Endothelzellen isoliert und kurzzeitig gezüchtet werden. Sie bildeten das typische 'cobblestone' - Muster und waren nach der ersten Passage nicht mehr nachweisbar. Wahrscheinlich wurde das Plaquematerial bei der operativen Entnahme schonender entnommen, so daß die Endothelzellen nicht zerstört wurden. Die Analyse der Wachstumsraten wurde mit einem Zellzählgerät durchgeführt. Hierbei zeigten die Zellen aus re-stenosierendem Plaquematerial ein extrem gesteigertes Wachstum im Vergleich zu Plaquezellen aus primär-stenosierendem Plaquematerial. Diese unterschiedlichen Wachstumsraten wurden unabhängig von der Entnahmetechnik und der Lokalisation registriert. Das gesteigerte Wachstum der glatten Muskelzellen aus re-stenosierendem Plaquematerial könnte das in vitro-Äquivalent zu dem oftmals rapide verlaufenden Re-stenosierungsprozeß nach Angioplastie in vivo sein.

### 2. Einflüsse auf das Wachstumsverhalten

Im Gegensatz zu glatten Muskelzellen aus der normalen Media zeigten glatte Muskelzellen aus atherosklerotischem Plaquematerial auf kollagenbeschichteten Kulturplatten (lathyrisches Rattenkollagen Typ I) ein reduziertes Wachstum. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß von Zellen aus intimalen Verdik-

kungen des Menschen hauptsächlich Kollagen Typ III und nur geringe Mengen Kollagen Typ I gebildet werden. In der Literatur wurde beschrieben, daß Plaquezellen aus primär-stenosierendem Plaquematerial nicht auf unterschiedliche Serumkonzentrationen reagieren. In unseren Versuchen zeigte sich eine zunehmende proliferative Aktivität der Zellen durch steigende Serumkonzentrationen. Plaquezellen aus Restenosen proliferierten bei geringeren Konzentrationen und in stärkerem Ausmaß als Plaquezellen aus primär-stenosierenden Läsionen. Durch das Kulturmedium von re-stenosierenden glatten Muskelzellen konnte das Wachstum von primär-stenosierenden glatten Muskelzellen um 60% gesteigert werden. Der Wachstumsfaktor PDGF steigert die Proliferation von glatten Muskelzellen aus Restenosen um das 2.7-fache, ECGF sogar um das 4-fache. Glatte Muskelzellen aus primär-stenosierendem Plaquematerial ändern dagegen ihr Wachstum unter der Wirkung von PDGF und ECGF nicht.

### **3. Medikamenten-Testungen**

Acetylsalicylsäure und Dipyridamol werden zur Verhinderung von Thrombosen als Vor- und Nachbehandlung bei Angioplastien angewendet. Die in vitro-Untersuchungen ergaben weder bei der Einzelgabe, noch bei der Kombination der Substanzen einen Hinweis für eine Inhibition der Migration und Proliferation von Plaquezellen. Fibrinolytika werden in der klinischen Routine bei akutem Myokardinfarkt zur Lysetherapie verwendet. Da eine Stimulation der Zellproliferation in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand in der instabilen Phase des Infarktgeschehens besonders unerwünscht wäre, untersuchten wir den in vitro-Einfluß auf das Proliferationsverhalten von glatten Muskelzellen aus der normalen Gefäßwand und aus koronarem Plaquematerial. In vitro zeigte sich im getesteten Konzentrationsbereich weder eine Stimulation, noch eine Inhibition der Proliferation. In der Literatur wurde berichtet, daß  $\beta$ -Blocker das Wachstum von Plaquezellen stimulieren. In unseren Untersuchungen wurden im therapeutischen Bereich die glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media und aus koronarem Plaquematerial nicht in ihrem Wachstum verändert. Von dem Calciumantagonisten Flunarizin wurde im therapeutischen Bereich eine Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen aus der unveränderten Media des Menschen beschrieben. Die Austestung des Kalziumantagonisten Diltiazem an Plaquezellen aus peripheren und koronaren Arterien des Menschen erbrachte ähnliche Ergebnisse. Trotzdem war der klinische Einsatz von Diltiazem zur Reduktion der

Restenose-Raten nach Angioplastie bislang nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür könnte darin zu suchen sein, daß die angewendete Dosierung noch zu gering war, um die Restenose-Raten signifikant zu verändern.

#### **4. Eine mögliche Rolle der Zellkultur in der Atheroskleroserecherche**

Die Zellkultur-Technik bietet sich als standardisierbares und überschaubares System zur Untersuchung von migratorischen und proliferativen Prozessen bei der Atherogenese an. Da eine Inhibition der Zellmigration und Zellproliferation von klinischem Interesse ist, könnte der schwerpunktmäßige Einsatz der Zellkultur als 'Prescreening-Modell' erfolgen, um aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Substanzen diejenigen mit antimigratorischen und antiproliferativen Eigenschaften herauszufiltern. Ausgewählte Substanzen könnten dann in Transfilter-Ko-Kulturen und im Tierversuch weiteruntersucht werden, um abschließend Empfehlungen für klinische Studien aussprechen zu können. In welchem Ausmaß die Zellkulturtechnik in der Zukunft als 'Prescreening-Modell' eingesetzt werden kann, wird vom Grad der Übereinstimmung der in vitro-Daten mit klinischen Erfahrungen abhängen.

## G. Literaturverzeichnis

1. Austin G.E., Ratliff N.B., Hollman J., Tabei S. and Phillips D.F. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *JACC* 6: 369-375 (1985)
2. Barnathan E., Laskey W.K., Kleaveland J.P., Kussmaul W.G. and Hirshfeld J.W. Aspirin and dipyridamole pretreatment in the prevention of acute thrombus formation during coronary angioplasty. *J Amer Coll Cardiol* 7: 64 A (1986)
3. Barnathan E., Schwartz S., Taylor L., Laskey W., Kleaveland P., Kussmaul W. and Hirshfeld J. Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 76: 125-134 (1987)
4. Baumgartner H.R. and Studer A. Folgen des Gefäßkaderismus am normalen und hypercholesterinämischen Kaninchen. *Pathol Microbiol* 29: 393 (1966)
5. Bauriedel G., Backa D., Stäblein A. und Höfling B. Angioskopie bei Patienten vor und nach perkutaner Atherektomie. *VASA* 16 (Suppl. 20): 334 - 336 (1987)
6. Bauriedel G., Dartsch P.C., Roth D., Voisard R., Betz E. und Höfling B. Selektive Biopsierung von Plaquematerial zur Zellkultivierung. *VASA Suppl.* 23: 23-26 (1988)
7. Bauriedel G., Dartsch P.C., Voisard R., Roth D., Simpson J.B., Höfling B. and Betz E. Selective percutaneous "biopsy" of atheromatous plaque tissue for cell culture. *Basic Res Cardiol* 84: 326-331 (1989)
8. Benditt E.P., Barrett T. and McDougall J.K. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6386-6389 (1983)

9. Benditt E.P. and Benditt J.M. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc Natl Acad Sci USA 70: 1753-1756 (1973)
10. Benninghoff A. Blutgefäße und Herz. III. Arterien. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, VI/1. Springer Verlag, Berlin, 49-124 (1930)
11. Benninghoff A. und Goerttler K. Die Wandstruktur der Blutgefäße. In: Lehrbuch der Anatomie des Menschen. Ferner H. und J. Staubesand (Hrg.) 2. Band: Eingeweide und Kreislauf. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 10. Auflage, 419-424 (1975)
12. Betz E. Atherosklerose: Medikamentöse Sekundärprophylaxe in Aussicht? Fortschr Med 104, Suppl. 1: 13 (1986)
13. Betz E. und Hämmerle H. Arteriosklerose-Prophylaxe mit Kalzium-Blockern? Schwerpunktmedizin 8: 18 (1985)
14. Betz E. und Hämmerle H. Experimentelle Atherogenese und deren Inhibition. VASA (Suppl. 20): 45-51 (1987)
15. Betz E., Hämmerle H. and Strohschneider T. Inhibitory actions of calcium entry blockers on experimental atheromas. In: Calcium Entry Blockers and Tissue Protection. Godfraind et al. (eds.) Raven Press, New York, 117-127 (1985)
16. Betz E., Hämmerle H. and Strohschneider T. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and endothelial permeability with flunarizine in vitro and in experimental atheromas. Res Exp Med 185: 325-340 (1985)
17. Betz E., Hämmerle H. and Viele D. Ca<sup>2+</sup>-entry blockers and atherosclerosis. Intern Angio 3, Suppl. 2: 33-42 (1984)
18. Betz E. and Schlote W. Responses of vessel walls to chronically applied electrical stimuli. Basic Res Cardiol 74: 10-20 (1979)

19. Björkerud S. Cultivated human arterial smooth muscle displays heterogeneous pattern of growth and phenotypic variation. *Lab Invest* 53: 303-310 (1985)
20. Björkerud S., Gustavsson K. and Hasselgren M. In vitro cultivation of rabbit aortic media and the development of the cultures in relation to cellular heterogeneity. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 92: 293-301 (1984)
21. Björkerud S. and Ekroth R. The growth of human atherosclerotic and non-atherosclerotic aortic intima and media in vitro. *Artery* 8: 329-335 (1980)
22. Blaes N. and Boissel J.P. Growth-stimulating effect of catecholamines on rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cell Physiol* 116: 167-172 (1983)
23. Bürk R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 369-372 (1973)
24. Burnstock G. Development of smooth muscle cells and its innervation. In: *Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge*. Bülbbring E., Branding A.F., Jones A.W. and Tomita T. (eds.). Edward Arnold, 431-458 (1981)
25. Califf R.M., Topol E.J., George B.S., Kereiakes D.J., Aronson L.G., Lee K.L., Martin L., Candela R., Abbottsmith C., O'Neill W.W., Pryor D.B., Stack R.S., and the TAMI study group. One-year outcome after therapy with tissue plasminogen activator: Reports from the thrombolysis and angioplasty in myocardial infarction trial. *Am Heart J* 119: 777 (1990)
26. Campbell G.R. and Campbell J.H. The cellular pathobiology of atherosclerosis. *Pathology* 13: 423-440 (1981)



27. Campbell G.R. and Campbell J.H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis - implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 42: 139-162 (1985)
28. Campbell G.R., Chamley-Campbell J.H. and Burnstock G. Differentiation and phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells. In: *Structure and Function of the Circulation*, Vol. 3. Schwartz C.F., Werthessen N.T. and Wolf S. (eds.). Plenum Publishing Corporation, 357-399 (1981)
29. Chaitman B.R., Thompson B.W., Kern M.J., Vandormael M.G., Cohen M.B., Ruocco J.K., Solomon R.E. and Braunwald E. for the TIMI Investigators. Tissue plasminogen activator followed by percutaneous transluminal coronary angioplasty: One-year TIMI phase II pilot results. *Am Heart J* 119: 213-220 (1990)
30. Chamley J.H. and Campbell G.R. Mitosis of contractile smooth muscle cells in tissue culture. *Exp Cell Res* 84: 105-110 (1974)
31. Chamley J.H., Campbell G.R. and Burnstock G. Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres. *J. Embryol. Exp. Morph.* 32: 297-323 (1974)
32. Chamley J.H., Campbell G.R., McConnel J.D. and Gröschel-Stewart U. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tiss Res* 177: 503-522 (1977)
33. Chamley-Campbell J.H., Campbell G.R. and Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* 59: 1-61 (1979)
34. Chamley-Campbell J.H. and Campbell G.R. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 40: 347-357 (1981)

35. Chamley-Campbell J.H., Campbell G.R. and Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle cells to serum mitogens. *J. Cell Biol* 89: 379-383 (1981)
36. Chesebro J.H., Fuster V., Elveback L.R., Clements I.P., Smith H.C., Holmes D.R., Bardsley W.T., Pluth J.R., Wallace R.B., Puga F.J., Orszulak T.A., Piehler J.M., Danielson G.K., Schaff H.V. and Frye R.L. Effect of dipyridamole and aspirin on late vein-graft patency after coronary bypass operations. *N Engl J Med* 310: 209-14 (1984)
37. Chobanian A.V., Brecher P. and Chan C. Effects of propranolol on atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit. *Circ Res* 56: 755-762 (1985)
38. Corcos T., David P.R., Guiteras Val P.G., Renkin J., Dangoisse V., Rapold H.G. und Bourassa M.G. Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 109: 926-931 (1985)
39. Cumberland D.C., Oakley G.D.G., Smith G.H. et al. Percutaneous laser-assisted coronary angioplasty (Letter). *Lancet* 2: 214 (1986)
40. Dartsch P.C. Untersuchung glatter Muskelzellen normaler und atherosklerotischer Gefäßwände des Menschen. Dissertation aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1990)
41. Dartsch P.C. Einbettungsmedien für die Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie. Eine vergleichende Untersuchung an Strukturen des Zytoskeletts kultivierter Epithelzellen aus der Linsenkapsel des Rinderauges. *Labormed* 13: 450 - 456 (1990)
42. Dartsch P.C., Bauriedel G., Höfling B. and Betz E. Cell culture of human atheromatous plaque material. In: *Interventional Cardiology and Angiology*. Höfling B., v. Pöllnitz A. (eds.) Steinkopff Verlag Darmstadt, Springer-Verlag New York, 115-125 (1989)

43. Dartsch P.C., Bauriedel G., Roth D., Voisard R. und Betz E. Zellkulturen von Plaquematerial des Menschen - eine neue Methode zur Bewertung von vaskulären Stenosen? In: Hoffmeister (Hrg). *Attempo*, Tübingen: 70-88 (1988)
44. Dartsch P.C., Bauriedel G., Voisard R., Höfling B. and Betz E. Cell cultures of atherectomized primary and recurrent target lesions. *Circulation* 80, No 4: 1219 abstr. (1989)
45. Dartsch P.C. and Betz E. Response of endothelial cells to mechanical stimulation, *Basic Res Cardiol* 84: 268-281 (1989)
46. Dartsch P.C. and Hämmerle H. Orientation response of arterial smooth muscle cells to mechanical stimulation. *Eur J Cell Biol* 41: 339-346 (1986)
47. Dartsch P.C., Hämmerle H. and Betz E. Orientation of cultured smooth muscle cells growing on cyclically stretched substrates. *Acta anat* 125: 108-113 (1986)
48. Dartsch P.C., Roth D. und Betz E. Gefäßwandzellen des Menschen in Kultur. *VASA Suppl.* 23: 18-22 (1988)
49. Dartsch P.C., Voisard R., Bauriedel G., Lauterjung L., Höfling B. und Betz E. Growth characteristics and cytoskeletal organisation of cultured smooth muscle cells from human primary and restenosing lesions. *Arteriosclerosis* 10: 62-75 (1990)
50. Dartsch P.C., Voisard R., Bauriedel G., Höfling B. and Betz E. Growth characteristics of smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions in culture. *European Heart Journal* 10, Suppl. iii-v: 87 abstr. (1989)

51. Dartsch P.C., Voisard R. and Betz E. In vitro growth characteristics of human atherosclerotic plaque cells: Comparison of cells from primary stenosing and restenosing lesions of peripheral and coronary arteries. *Res Exp Med* 190: 77-87 (1990)
52. Dartsch P.C., Voisard R. and Ischinger T. Effect of dipyridamole, beta carotene and doxycycline on proliferation and viability of arterial and plaque-derived smooth muscle cells without and with photoradiation: Results from human cell culture studies. *Coronary Artery Disease* 1: 251-255 (1990)
53. Davignon J., Dufour R. and Cantin M. Atherosclerosis and hypertension. In: *Hypertension - Physiopathology and Treatment*. Genest J. et al. (eds.). McGraw - Hill Book Company, New York, 2. Auflage, 810-852, (1983)
54. Deeb F.E., Ciampricotti R., Gamal M.E., FRCP (Edin), Michels R., Bonnier H. and van Gelder B. Value of immediate angioplasty after intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 119: 786-791 (1990)
55. Detre K., Holubkov R., Kelsey S. et al. and the Co-Investigators of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Registry: percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. *N Engl J Med* 318: 265-270 (1988)
56. DiSciascio G., Cowley M.J., Vetrovec G.W., Kelly K.M., Lewis S.A. Triple vessel coronary angioplasty: acute outcome and long term results. *JACC* 12: 42-48 (1988)
57. Dodge H.T., Sheehan F.H., Mathey D.L., et al. Usefulness of coronary artery bypass graft surgery or percutaneous transluminal angioplasty after thrombolytic therapy. *Circulation* 72, Suppl. V: 39 (1985)

58. Dorros G., Lewin R.F., Mathiac L.M. Percutaneous transluminal coronary angioplasty in multivessel coronary disease patients: short- and long-term follow-up in single and multiple dilatations. *Clin Cardiol* 11: 601-612 (1988)
59. Eitel W., Schmid G., Schlote W. and Betz E. Early atherosclerotic changes of the carotid artery wall induced by electrostimulation. A study by scanning and transmission electron microscopy. *Path Res Pract* 170: 211-229 (1980)
60. Erbel R., O'Neill W., Nixdorff U. et al. Hochfrequenz-Rotationsatherec-tomie bei koronarer Herzkrankheit. *Dtsch med Wschr* 114: 487-495 (1989).
61. Ernst S.M.P.G., van der Feltz T.A., Bal E.T. et al. Long term angiographic follow up, cardiac events, and survival in patients undergoing percutaneo-us transluminal coronary angioplasty. *Br Heart J* 57: 220-5 (1987).
62. Eskin S.G., Sybers H.D., Lester J.W., Navarro L.T., Gotto A.M. Jr. and De-Bakey M.E. Human smooth muscle cells cultured from atherosclerotic pla-ques and uninvolved vessel wall. *In Vitro* 17: 713-718 (1981).
63. Fallier P., Hämmerle H. und Betz E. Transfilterkulturen als Modelle für Un-tersuchungen von Frühveränderungen bei der Atherogenese. In: Frühver-änderungen bei der Atherogenese. Betz E. (Hrg). W. Zuckschwerdt Ver-lag, München, Bern, Wien, San Francisco, 112-116 (1987)
64. Fallier-Becker P., Wolburg-Buchholz K., Baur R. und Betz E. Einflüsse von Adventitia und Endothel in Explantat-Kulturen. In: Die Anwendung aktuel-ler Methoden in der Arteriosklerose-Forschung. Betz E. (Hrg). Kohlham-mer Verlag, Stuttgart, 332-339 (1989)
65. Fanelli C. and Aronoff R. Restenosis following coronary angioplasty. *Am Heart J* 119, 2/1: 357-368 (1990)

66. Faulstich H., Trischmann H. and Mayer D. Preparation of tetramethylrhodaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis. *Exp Cell res* 144: 73-82 (1983)
67. Faxon D., Weber V., Haudenschild C., Gottsmann S., McGovern W., Ryan T. Effect of antiplatelet therapy on restenosis after experimental angioplasty. *Amer J Cardiol* 53: 72C-76C (1984)
68. Fingerle J. Organkultur der thorakalen Kaninchenaorta. Dissertation aus der Fakultät für Biologie, Universität Tübingen (1986)
69. Fischer H. Die Struktur der Arterienwand mit besonderer Berücksichtigung der Einwirkung des hydrostatischen Drucks. *Angiologica* 2: 285-313 Teil I (1965)
70. Fischer-Dzoga K., Jones R.M., Vesselinovitch D and Wissler R.W. Ultrastructural and immunohistochemical studies of primary cultures of aortic medial cells. *Exp Mol Pathol* 18: 162-176 (1973)
71. Folkman J., Haudenschild C. and Zetter B. Capillary endothelial cells: growth control and differentiation. In: *Growth of Cells in Hormonally Defined Media*. Sato et al. (eds.). Cold Spring Harbor, 1982, 509-523 (1982)
72. Franke W.W., Schmid E., Osborn M. and Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5034-5038 (1978)
73. Frishman W.H., Furberg C.D. and Friedewald W.T. Beta-adrenergic blockade for survivors of acute myokardial infarction. *N Engl J Med* 310: 830-836 (1984)
74. Gabbiani G., Rungger-Brändle E., de Chastonay C. and Franke W.W. Vimentin-containing smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and specific  $\alpha$ -type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 298-302 (1981)

75. Ganz W., Buchbinder N., Marcus H., et al. Intracoronary thrombolysis in evolving myocardial infarction. *Am Heart J* 101: 4 (1981)
76. Geer J.C. Fine structure of human aortic intimal thickening and fatty streaks. *Lab Invest* 14: 1764-1783 (1965)
77. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Translation of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103: 181-190 (1981)
78. Ginsburg R., Jenkins N., Wright A., et al. Transluminal rotational atherectomy: clinical experience in 20 patients. *Circulation* 78: II-415 (1988)
79. Gimbrone M.A. Jr. Vascular endothelium and atherosclerosis. In: *Vascular Injury and Atherosclerosis*. Moore S. (ed.). Marcel Dekker, 25-51 (1981)
80. Gimbrone M.A. Jr., Cotran R.S. and Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60: 673-684 (1974)
81. Gimbrone M.A. Jr. and Cotran R.S. Human vascular smooth muscle in culture: growth and ultrastructure. *Lab Invest* 33: 16-27 (1975)
82. Gold H.K., Cowley M.J., Palacios L.F. et al. Combined intracoronary streptokinase infusion and coronary angioplasty during acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 53: 122c (1984)
83. Gordon D. and Schwartz S.M. Replication of smooth muscle cells in hypertension and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 59: 44A-48A (1987)
84. Gotlieb A.I. Endothelial and smooth muscle cell migration in the repair of the injured vessel wall. *Surv Synth Pathol Res* 1: 5-22 (1983)

85. Gown A.M., Vogel A.M., Gordon D. and Lu P.L. A smooth muscle-specific monoclonal antibody recognizes smooth muscle actin isozymes. *J Cell Biol* 100: 807-813 (1985)
86. Gröschel-Stewart U., Chamley J.H., Campbell G.R. and Burnstock G. Changes in myosin distribution in dedifferentiating and redifferentiating smooth muscle cells in tissue culture. *Cell Tiss Res* 165: 13-22 (1975)
87. Gruentzig A., King S., Schlumpf M. und Siegenthaler W. Long-term follow-up percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 316: 1127- 1132 (1987)
88. Gruentzig A.R., Sennin A., Siegenthaler W.E. et al. A randomized trial of intravenous tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction with subsequent randomization to elective coronary angioplasty. *N Engl J Med* 317: 1613-18 (1987)
89. Grünwald J. and Haudenschild C.C. Intimal injury in vivo activates vascular smooth muscle cell migration and explant outgrowth in vitro. *Arteriosclerosis* 4: 183-189 (1984)
90. Grünwald J., Haudenschild C.C. The influence of antiplatelet drugs on balloon injury stimulated migration in cultured smooth muscle cells. *Artery* 12: 324-336 (1985)
91. Guiteras Val P., David P.R., Lesperance J., Dangoisse V., Crepeau J., Dyrda I. and Bourassa M.G. Clinical and angiographic follow-up of successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 66, Suppl. II: II-330 (1982)
92. Hanson S.R., Harker L.A., Bjornsson T.D. Effects of platelet-modifying drugs on arterial thromboembolism in baboons: aspirin potentiates the anti-thrombotic actions of dipyridamole and sulfinpyrazone by mechanism(s) independent of platelet cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 75: 1591-9 (1985)



93. Hartzler G.O., Rutherford B.D., McConahay D.R. et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty with and without thrombolytic therapy for treatment of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 106: 965 (1983)
94. Hauss W.H. Koronarsklerose und Herzinfarkt. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, (1976)
95. Hauss W.H. The role of the arterial wall cells in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 17: 75-110 (1979)
96. Hauss W.H., Junge-Hülsing G. und Gerlach V. Die unspezifische Mesenchymreaktion. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
97. Haust M.D. and More R.H. Significance of the smooth muscle cell in atherogenesis. In: *Evolution of the atherosclerotic plaque*. R.J. Jones (ed.). University of Chicago Press, Chicago (1963)
98. Henry P.D. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipin, verapamil and diltiazem. *Am J Cardiol* 46: 1047-1058 (1980)
99. Höfling B., Backa D., v. Arnim T., Jauch K.W., und Simpson J.B. Methode, angiographische und klinische Ergebnisse bei perkutaner Atherektomie. *VASA* 16, Suppl. 20: 337-342 (1987)
100. Höfling B., v. Pöllnitz A., Backa D., v. Arnim T., Lauterjung L., Jauch K.W. and Simpson J.B. Percutaneous removal of atheromatous plaques in peripheral arteries. *Lancet* i: 384-386 (1988)
101. Höher M., Hombach V., Höpp H.W., Eggeling T., Kochs T., Arnold M., Hannekum und Hügel W. Diagnostische Bedeutung der Angioskopie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. *Z Kardiol* 77: 152-159 (1988)
102. Hombach V., Borberg H., Gadzkowski A., Oette K. und Stoffel W. Regression der Koronarsklerose bei familiärer Hypercholesterinämie IIa durch spezifische LDL-Apherese. *Dtsch med Wschr* 11: 1709-1715 (1986)

103. Hombach V., Hoehner M., Hoepf H.W., Kochs M. and Eggeling T. High frequency current angioplasty in coronary heart disease: preliminary results. *J Coll Cardiol* 11: 110B abstr. (1988)
104. Hombach V., Hoehner M., Hoepf H.W. Kochs M., Eggeling T. and Hilger H.H. Hochfrequenzangioplastie bei koronarer Herzkrankheit. Erste klinische Ergebnisse. *Dtsch med Wschr* 113: 801-805 (1988)
105. Hombach V., Kochs M., Eggeling T., Hoehner M. and Hilger H.H. Quantitative techniques for the control of regression of coronary atherosclerosis. *Plasma Ther Transfus Technol* 9: 49-57 (1988)
106. Jaffe E.A., Hoyer L.W. and Nachman R.L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52: 2757-2764 (1973)
107. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. and Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756 (1973)
108. Johnson A.R. Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells from arteries and veins. *J Clin Invest* 52: 2745-2756 (1973)
109. Kalnins V.I. and Connolly J.A. Application of immunofluorescence in studies of cytoskeletal antigens. In: *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol. 2. Fedoroff S. and Hertz L. (eds.). Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco, 393-460 (1981)
110. Kaltenbach M., Kober G., Scherer D. and Vallbracht C. Recurrence rate after successful coronary angioplasty. *Eur Heart J* 6: 276-281 (1985)
111. Kaltenbach M. and Vallbracht C. Low speed rotational angioplasty - applicability to chronic coronary artery obstructions. *Circulation* 78: II-83 (1988)

112. Karsch K.R. Reduktion von Restenosiierungen nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTCA). In: Medikamentöse Sekundärprophylaxe von Gefäßstenosiierungen. Betz E. (Hrg). MMV Medizin Verlag, München: 63-78 (1988)
113. Karsch K.R., Haase K.K., Voelker W., Baumbach A., Mauser M. and Seipel L. Percutaneous coronary excimer laser angioplasty in patients with stable and unstable angina pectoris - Acute results and incidence of restenosis during 6-month follow-up. *Circulation* 81: 1849-1859 (1990)
114. Kensey K., Nash J., Abrahams C., Lake K. and Zarins C.K. Recanalisation of obstructed arteries using a flexible rotating tip catheter. *Circulation* 74 Suppl. II: II-1821, abstr (1986)
115. Kleinig H. and Sitte P. Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflage, (1986)
116. Kling D., Holzschuh T. and Betz E. Temporal sequence of morphological alterations in artery walls during experimental atherogenesis - occurrence of leukocytes. *Res Exper Med* 187: 237-250 (1987)
117. Klurfeld D.M. Identification of foam cells in human atherosclerotic lesions as macrophages using monoclonal antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109: 445-449 (1985)
118. Knoche H. Leitfaden der histologischen Technik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, (1979)
119. Lambert M., Bonan R., Cote G., Cote G., Crepeau J., De Guise P., Lesperance J., David P.R., Waters D. Multiple coronary angioplasty: a model to discriminate systemic and procedural factors related restenosis. *JACC* 12: 42-48 (1988)
120. Lang J. Mikroskopische Anatomie der Arterien. *Angiologica* 2: 225-284, Teil I (1965)

121. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256 (1980)
122. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogenous, developmentally regulated class of proteins. *Ann Rev Biochem* 51: 219-250 (1982)
123. Leimgruber P., Roubin G., Hollman J., Cotsonis G., Meier B., Douglas J., King S. and Grüntzig A. Restenosis after successful coronary angioplasty in patients with single-vessel disease. *Circulation* 73: 710-717 (1986)
124. Lembo J.N., Black A.J.R, Roubin G.S., Wilentz J.R., Mufson L.H., Douglas J. S., King III S.B. Effect of pretreatment with aspirin versus aspirin plus dipyridamole on frequency and typ of acute complications of percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 65: 422-426 (1990)
125. Libby P., Warner S.J.C., Salamon R.N. and Birinyi L.K. Production of a platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* 318: 1493-1498 (1988)
126. Maciag T., Cerundolo J., Ilsley S., Kelly P.R. and Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5674-5678 (1979)
127. Marder V.J., Sherry S. Thrombolytic therapy: current status (second of two parts). *N Engl J Med* 318: 1585-1595 (1988)
128. Martin G.S., Sprague C.A. and Epstein C.J. Replicative life-span of cultivated human cells. Effect of donor's age, tissue and genotype. *Lab. Invest.* 23: 86-92 (1970) Martin G.S. and Sprague C.A. Clonal senescence and atherosclerosis. *Lancet* ii: 1370-1371 (1972)
129. McCullagh K.G., Duance V.C. and Bishop K.A. The distribution of collagen types I,III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 130: 45-55 (1980)

130. McBride W., Lange R.A. and Hillis L.D. Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention. *N Engl J Med* 318: 1734-7 (1988)
131. McDonald R.I., Shepro D., Rosenthal M. and Booyse F.M. Properties of cultured endothelial cells. *Ser Hämat IV/4*: 469-478 (1973)
132. Meyer J., Merx W., Schmitz H., et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty immediately after intracoronary streptolysis of transmural myocardial infarction. *Circulation* 66: 905 (1982)
133. Morisaki N., Kanzaki T., Koshikawa T., Saito Y. and Yoshida S. Secretion of a new growth factor, smooth muscle cell derived growth factor, distinct from platelet derived growth factor by cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *FEBS Lett* 230: 186-190 (1988)
134. Moss N.S. and Benditt E.P. Human atherosclerotic plaque cells and leiomyoma cells. Comparison of in vitro growth characteristics. *Am J Pathol* 78: 175-190 (1975)
135. Mosse P.R.L., Campbell G.R., Wang Z.L. and Campbell J.H. Smooth muscle phenotype expression in human carotid arteries. Part 1: comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest* 53: 556-562 (1985)
136. Munro J.M. and Cotran R.S. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherosclerosis and inflammation. *Lab Invest* 58: 249-261 (1988)
137. Myler R.K., Topol E.J., Shaw R.E., Stertz S.H., Clark D.A., Fishman J., Murphy M.C. Multiple vessel coronary angioplasty: classification, results, and pattern of restenosis 494 consecutive patients. *Cathet Cardiovasc Diagn* 13: 1-15 (1987)

138. Neuhaus K.L., Tebbe U., Gottwik M., Weber M.A.J., Feuerer W., Niederer W., Haerer W., Prartorius F., Grosser K.D., Huhmann W., Hoeppe H.W., Alber G., Sheikhzadeh A., and Schneider B. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) and urokinase in acute myocardial infarction: results of the German Activator Urokinase Study (Gauss). *JACC* 12: 581-587 (1988)
139. Nilsson J. Growth factors and the role of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 62: 186-199 (1986)
140. Nilsson J., Sjölund M., Palmberg L. et al.: The calcium antagonist nifedipine inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis* 58: 109-122 (1985)
141. Nilsson J., Sjölund M., Palmberg L., Thyberg J. and Heldin C.H. Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4418-4422 (1985)
142. Nilsson J. and Thyberg J. Fine structure of arterial smooth muscle cells cultured in the presence of whole blood serum or plasma derived serum. *Cell Tiss Res* 223: 87-99 (1982)
143. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Tertov V.V. and Krushinsky A.V. Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall. *Acta anat* 119: 99-105 (1984)
144. Orekhov A.N., Kosykh V.A., Repin V.S. and Smirnov V.N. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta. II. Autoradiographic observation on deoxyribonucleic acid synthesis in primary cell culture. *Lab Invest* 48: 749-754 (1983)
145. Orekhov A.N., Krushinsky A.V., Andreeva E.R., Repin V.S. and Smirnov V.N. Adult human aortic cells in primary culture: heterogeneity in shape. *Heart Vessels* 2: 193-201 (1986)

146. Orekhov A.N., Karpova I.I., Tertov V.V., Rudchenko S.A., Andreeva E.R., Krushinsky A.V. and Smirnov V.N. Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. *Am J Pathol* 115: 17-24 (1984)
147. Orekhov A.N., Ruda M.Y., Baldenkov G,N. et. al. Atherogenic effects of beta blockers on cells cultured from normal and atherosclerotic aorta. *Am J Cardiol* 61: 1116-1117 (1988)
148. Osborn M. and Weber K. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Meth Cell Biol* 24: 97-132 (1982)
149. Owens G.K., Loeb A., Gordon D. and Thompson M.M. Expression of smooth muscle-specific  $\alpha$ -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* 102: 343-352 (1986)
150. Patterson M.K. Measurement of growth and viability of cells in culture. *Meth Enzymol* 58: 141-152 (1979)
151. Paul J. Zell- und Gewebekulturen. de Gruyter Verlag, Berlin, New York, (1980)
152. Pool P.E. and Seagren S.C. Long-term efficacy of diltiazem in chronic stable angina associated with atherosclerosis: effect on treadmill exercise. *Am J Cardiol* 49: 573-577 (1982)
153. Reale E. und Ruska H. Die Feinstruktur der Gefäßwände. *Angiologica* 2: 314-366, Teil I (1965)
154. Rentrop P., Blanke H., Karsch K.R., Wiegand V., Köstering K., Oster H., Leitz K. Acute myocardial infarction: Intracoronary application of nitroglycerin and streptokinase in combination with transluminal recanalization. *Clin Cardiol* 2: 354-363 (1979)

155. Rhodin J.G. Architecture of the vessel wall. In: Handbook of Physiology, Bohr D.F., Somlyo A.P. and Sparks H.V. (eds.). Section 2: The Cardiovascular System, Vol. II: Vascular Smooth Muscle. American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 1-31 (1980)
156. Rogers W.J., Baim D.S., Gore J.M., Brown G., Roberts R., Williams D.O., Chesebro J.H., Babb J.D., Sheehan F.H., Wackers F.J.Th., Zaret B.L., Robertson T.L., Passamani E.R., Ross R., Knatterud G.N. and Braunwald E., for the TIMI II-A Investigators. Comparison of immediate invasive, delayed invasive, and conservative strategies after tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 81: 1457-1476 (1990)
157. Romels B. Mikroskopische Technik. Oldenburg Verlag, München, (1968)
158. Rosing D.R., Cannon R.O. III, Watson R.M. et al. Three year anatomic, functional and clinical follow-up after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *JACC* 9: 1-7 (1987)
159. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 50: 172-186 (1971)
160. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 314: 488-500 (1986)
161. Ross R. and Glomset J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180: 1332-1339 (1973)
162. Ross R. and Glomset J.A. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 295: 369-377; 420-425 (1976)
163. Ross R., Glomset J.A. and Harker L. The response to injury and atherogenesis: the role of endothelium and smooth muscle. *Atherosclerosis Rev.* 3: 69-75 (1978)



164. Ross R., Wight T.N., Strandness E. and Thiele B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol* 114: 79-93 (1984)
165. Roth D. Untersuchungen zur Etablierung von Kulturen aus Gefäßwandzellen des Menschen für pharmakologische Prescreening-Verfahren. Dissertation aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen (1990)
166. Roth D., Dartsch P.C. und Betz E. Austestungen proliferationsbeeinflussender Substanzen an kultivierten Gefäßwandzellen des Menschen. *VASA Suppl.* 23: 27-30 (1988)
167. Sanborn T.A., Faxon D.P., Kellett M.A. et al. Percutaneous coronary laser thermal angioplasty. *JACC* 8: 1437-40 (1986)
168. Sassen L.M.A., Lamers J.M.J., Hartog J.M., Dekkers D.H.W. and Verdouw P.D. Failure of diltiazem to suppress cholesterol-induced atherogenesis of endothelium-denudated arteries in pigs. *Atherosclerosis* 81: 217-224 (1990)
169. Schaffner T., Taylor K., Bartucci E.J., Fischer-Dzoga K., Beeson J.H., Glasgow S. and Wissler R.W. Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* 100: 57-80 (1980)
170. Schettler G., Nüssel E. und Buchholz L. Epidemiological research in Western Europe. In: *Atherosclerosis Reviews*, Vol. 3. Paoletti R. and Gotto A. M. Jr. (eds.). New York, 201-211 (1978)
171. Schmitt G., Knoche H., Junge-Hüsing G., Koch R. und Hauss W.H. Über die Reduplikation von Aortenwandzellen bei arterieller Hypertension. *Z. Kreislaufforsch.* 59: 481-487 (1970)

172. Schröder R., Biamino G., von Leitner E.R., Linderer T., Brüggemann T., Heitz J., Vöhringer H.F. and Wegscheider K. Intravenous short-term infusion of streptokinase in acute myocardial infarction. *Circulation* 67: 536-548 (1983)
173. Schubert G.E. und Bethke B.A. Lehrbuch der Pathologie. De Gruyter Verlag, Berlin, New York, (1981)
174. Schwartz L., Bourassa M.G., Lesperance J., Aldridge H.E., Kazim F., Salvatore V.A., Henderson M., Bonan R., David P.R. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 318: 1714-1719 (1988)
175. Schwartz S.M., Campbell G.R. and Campbell J.H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 58: 427-444 (1986)
176. Schwartz S.M., Reidy M.R. and Clowes A. Kinetics of atherosclerosis - a stem cell model. *Ann NY Acad Sci* 454: 292-304 (1985)
177. Sheehan F.H., Braunwald E., Canner P., Dodge H.T., Gore J., Van Natta P., Passamani E.R., Williams D.O., Zaret B., and Co-Investigators. The effect of intravenous thrombolytic therapy on left ventricular function: a report on tissue-type plasminogen activator and streptokinase from the Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI phase I) Trial. *Circulation* 75: 817-29 (1987)
178. Sigwart U, Puel J., Mirkovitch V. et al. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 316: 701-6 (1987)
179. Sigwart U., Urban P., Golf S. et al. Emergency stenting for acute occlusion after coronary balloon angioplasty. *Circulation* 78: 1121-7 (1988)
180. Simpson J.B., Robertson G.C. and Selmon M.R. Percutaneous coronary atherectomy. *JACC* 11: 110A, abstr. (1988)

181. Simpson J.B., Selmon J.R., Robertson G.C. Cipriano P.R. Hayden W.G. Johnson D.E. and Fogarty T.J. Transluminal atherectomy for occlusive peripheral vascular disease. *Am. J. Cardiol.* 61: 96G-101G (1988)
182. Six J.A., Louwerenburg H.W., Braams R., Mechelse K., Mosterd W.L., Bredero A.C., Dunselman P.H. and van Hemel N.M. A double-blind randomized multicenter dose-ranging trial of intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 65: 119-123 (1990)
183. Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzonana G., Gillessen D. and Gabbiani G. A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103: 2787-2796 (1986)
184. Spears J.R. Percutaneous transluminal coronary angioplasty restenosis: potential prevention with laser balloon angioplasty. *Am J Cardiol* 60: 61B-64B (1988)
185. Spears J.R., Reyes V., Sinclair I.N. et al. Percutaneous coronary laser balloon angioplasty: preliminary results of a multicenter trial. *JACC* 13: 61A (1989)
186. Stary H.C. Changes in intimal smooth muscle phenotype in human and non-human primate atherosclerosis and after atherosclerosis regression. *Folia Angiol* 28: 72 - 75 (1980)
187. Staubesand J. Anatomie der Blutgefäße. I. Funktionelle Morphologie der Arterien, Venen und arterio-venösen Anastomosen. In: *Angiologie*, Ratschow M. (Hrg.). Thieme Verlag, Stuttgart, 23-82 (1959)
188. Staubesand J. Intra- und extrazelluläre Lysosomen bei myocytären Reaktionen der Arterienwand. *Med. Welt.* 28: 1470-1474 (1977)
189. Staubesand J. Matrix-Vesikel und Mediadysplasie. *Med Welt* 28: 1943-1946 (1977)

190. Staubesand J., Adelman G. und Stell F. Matrix lysosomes and medial dysplasia: an ultrastructural and morphometric investigation into "load failure" of haemodynamic or metabolic origin. *Folia Angiol.* 28: 9-17 (1980)
191. Staubesand J. und Riede V.N. Ultrastrukturelles Reaktionsmuster der Gefäßwand mit besonderer Berücksichtigung der Mediamyocyten. In: *Gefäßwand, Rezidiv-Prophylaxe, Raynaud-Syndrom.* Ehringer H., Betz E., Bollinger A. und Deutsch E. (Hrg). Verlag Gerhard Witzstrock, Baden-Baden, Köln, New-York, 1-12 (1979)
192. Steele P.M., Chesebro J.H., Stanson A.W., Holmes D.R. Badimon L., Fuster V. Balloon angioplasty: effect of platelet-inhibitor drugs on platelet-thrombus deposition in a pig model. *JACC* 3: 506 (1984)
193. Steinert P.M., Jones J.C.R. and Goldman R.D. Intermediate filaments. *J Cell Biol* 99: 22s-27s (1984)
194. Sugano M., Nakashima Y., Matsushima T., Takahara K., Takasugi M., Kuroiwa A., Koide O. Suppression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by diltiazem injection. *Arteriosclerosis* 6, 237-242 (1986)
195. Sumner B.E.H. *Basic Histochemistry.* John Wiley&Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore (1988)
196. Talley J.D., Hurst J.W., King S.B. III, et al. Clinical outcome 5 years after attempted percutaneous transluminal coronary angioplasty in 427 patients. *Circulation* 77: 820-9 (1988)
197. The TIMI Research Group. Immediate vs delayed catheterization and angioplasty following thrombolytic therapy for AMI. TIMI IIA. *JAMA* 260: 2849-58 (1988)
198. The TIMI Study Group. The thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial: phase I findings. *N Engl J Med* 312: 932-6 (1985)

199. Thyberg J. and Palmberg L. The calcium antagonist nisoldipine and the calmodulin antagonist W-7 synergistically inhibit initiation of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *Biol Cell* 60: 125-132 (1987)
200. Thyberg J., Palmberg L., Nilsson J., Ksiazek T. and Sjölund M. Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells. *Differentiation* 25: 156-167 (1983)
201. TIMI Operations Comitee, Braunwald E., Knatterud G.L., Passamani E. and Robertson T.L.: Announcement of protocol change in thrombolysis in myocardial infarction trial (letter). *JACC* 9: 467 (1987)
202. TIMI Operations Comitee, Braunwald E., Knatterud G.L., Passamani E.R., Robertson T.L. Solomon R. Update from the thrombolysis in myocardial infarction trial (letter). *JACC* 10: 970 (1987)
203. Topol E.J., Califf R.M., George B.S., Kereiakes D.J., Abbottsmith C.W., Candella R.J., Lee K.L., Pitts B., Stack R.S., O'Neill WW, and the Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial infarction study group. A randomized trial of immediate vs. delayed elective angioplasty after IV TPA in AMI. *N Engl J Med* 317: 581-8 (1987)
204. Topol E.J., Califf R.M., George B.S., Kereiakes D.J., Rothbaum D., Candela R.J., Abbottsmith C.W., Pinkerton C.A., Stump D.C., Collen D., Lee K.L., Pitt B., Kline E.M., Boswick J.M., O'Neill W.W., Stack R.S., TAMI Study Group. Coronary arterial thrombolysis with combined infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator and urokinase in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 77: 1100-1107 (1988)
205. Vandekerckhove J. and Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126: 783-802 (1978)

206. Vandekerckhove J. and Weber K. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation* 14: 123-133 (1979)
207. Vandormael M.G., Deligonul U., Kern M.J., Harper M., Presant S., Gibson P., Galan K., Chaitman B.R. Multilesion coronary angioplasty: clinical and angiographic follow-up. *JACC* 10: 246-252 (1987)
208. Vanhoutte P.M. Calcium-entry blockers and vascular smooth muscle. *Circ* 65, Suppl. I: I11 - I19 (1982)
209. Vesselinovitch D. Animal models in atherosclerosis, their contribution and pitfalls. *Artery* 5: 193-206 (1979)
210. Vesselinovitch D. and Fischer-Dzoga K. Techniques in pathology in atherosclerosis research. *Adv Lipid Res* 18: 1-63 (1981)
211. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Dienemann H., Höfling B. and Betz E. Smooth muscle cells from human atherosclerotic plaque material in vitro and the effect of acetyl salicylic acid on cell proliferation. *Eur Heart J* 10, Suppl. iii-v: 2180 abstr. (1989)
212. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Höfling B. und Betz E. Der Effekt von Diltiazem auf Plaquezellen aus primär- und restenosierenden Läsionen. *VASA Suppl.* 27: 241-243 (1989)
213. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Höfling B. and Betz E. Growth rates and cell size distribution of plaque cells from human primary and restenosing lesions after extraction with a Simpson atherectomy catheter. *Cytotechnology* S69: 13.15 abstr. (1989)
214. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Höfling B. and Betz E. The effect of serum concentrations and conditioned media on proliferation of cultured smooth muscle cells from human atherosclerotic plaque tissue. *Cytotechnology* S69: 13.16 abstr. (1989)

215. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Höfling B. und Betz E. Der Effekt von Diltiazem auf kultivierte glatte Muskelzellen aus Plaquesgewebe des Menschen. *Zeitschrift für Kardiologie* 78, Suppl. 4: 142 P. (1989)
216. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Lauterjung L., Höfling B. und Betz E. Vergleich der Wachstumsraten von glatten Muskelzellen aus primär- und restenosierendem Plaquematerial des Menschen und der Effekt von Acetylsalicylsäure in vitro. In: Assmann G., Betz E., Heinle H. und Schulte H. (Hrg): *Neue Aspekte aus Zellbiologie und Molekulargenetik, Epidemiologie und Klinik*. Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden: 310-318 (1990)
217. Voisard R., Dartsch P.C., Bauriedel G., Lauterjung L., Höfling B. and Betz E. Increased growth rates of percutaneously and surgically extracted plaque cells from human restenosing tissues in vitro. In: Hombach V. et al. (eds): *Interventionell techniques in cardiovascular medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 133-138 (1991).
218. Voisard R., Dartsch P.C. and Betz E. The effect of fibrinolytic agents in vitro on plaque cells derived from human peripheral and coronary arteries. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 415, Suppl. 1: 427 abstr. (1990)
219. Voisard R., Dartsch P.C. und Betz E. Plaqueszellen aus peripheren und koronaren Arterien des Menschen in vitro unter dem Einfluß von Streptokinase, Urokinase und rekombiniertem Plasminogen human-Aktivator. In: Assmann G, Betz E, Heinle H, Schulte H (Hrgs): *Koronare Herzkrankheit: molekulargenetische Aspekte und zelluläre Mechanismen, Risikoprofile vor und nach invasiven Therapieverfahren*. Vieweg, Braunschweig (1991)
220. Voisard R., Dartsch P.C., Roth D. und Betz E. Plaqueszellen des Menschen in Kultur: Steigerung und Hemmung des Wachstums durch exogene Stimuli. *Phlebologie Proktologie* 19: 159-163 (1990)
221. Wagner D.D., Olmsted J.B. and Marder V.J. Immunolocalization of an Wilbrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 95: 355-360 (1982)

222. Walker L.N., Bowen-Pope D.F. and Reidy M.A. Secretion of a platelet-derived growth factor-like activity by arterial smooth muscle cells is induced as a response to injury. *J Cell Biol* 99: 416a (1984)
223. Wall T.C., Philipps H.R., Stack R.S., Mantell S, Aronson L., Boswick J., Simon K., DiMeo M., chaplin Don Whitcomb D., Pasi D., Zawodniak M., Hajisheik M., Hedge S., Barker W., Tenney R., and Califf R. Results of high dose intravenous urokinase for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 65: 124-131 (1990)
224. Wechezak A.R. and Mansfield P.B. Isolation and growth characteristics of cell lines from bovine venous endothelium. *In Vitro* 9: 39-45 (1973)
225. Wehland J., Osborn M. and Weber K. Phalloidin-induced polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with locomotion and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5613-5617 (1977)
226. Whittington-Coleman P.J., Carrier O. and Douglas B.H. The effects of propranolol on cholesterol-induced atheromatous lesions. *Atherosclerosis* 18: 337-345 (1973)
227. Wieland T., Miura T. and Seeliger A. Analogs of phalloidin. *Int J Peptide Protein Res* 21: 3-10 (1983)
228. Wilcox R.G., Olsson C.G., Skene A.M., Vonder Lippe G., Jensen G and Hampton G. Trial of tissue plasminogen activator for mortality reduction in acute myocardial infarction. Anglo-Scandinavian Study of Early Thrombolysis (ASSET). *Lancet* 2: 525-30 (1988)
229. Wilentz J.R., Sanborn T.A., Haudenschild C.C., Valeri C.R., Ryan T.J., Faxon D.P. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 75: 636-642 (1987)
230. Wissler R.W. The arterial medial cell, the smooth muscle cell or multifunctional mesenchym? *J. Atheroscler. Res.* 8: 201-213 (1968)



231. Wissler R.W. Principles of the pathogenesis of atherosclerosis. In: Heart Disease. Braunwald E. (ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1221-1245 (1980)
232. Wissler R.W. and Vesselinovitch D. Evaluation of animal models for the study of the pathogenesis of atherosclerosis. In: Int Symp. State of prevention and therapy in human arteriosclerosis and animal models. Hauss W.H. and Wissler R.W. (eds.) (1978)
233. Wulf E., Deboben A., Bautz F.A., Faulstich H. and Wieland T. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4498-4502 (1979)
234. Yusuf S., Wittes J. and Friedman L. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. JAMA 260: 2088-2093 (1988)

## H. Abkürzungen

ASS	=	Acetylsalicylsäure
DAPI	=	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DIL	=	Diltiazem
DPD	=	Dipyridamol
EC	=	Endothelial Cell (Endothelzelle)
ECGF	=	Endothelial Cell Growth Factor (Endothelzellwachstumsfaktor)
FCS	=	Fetales Kälberserum
FITC	=	Fluoresceinisothiocyanat
HAM F-12	=	Nährlösung nach Ham
HEPES	=	N-(2-Hydroxyethyl)piperazyl-N'-ethansulfonsäure
Media-SMC	=	SMC, die aus der Media isoliert wurden
OP-SMC	=	SMC, die durch Thrombendarterektomie während eines operativen Eingriffs entnommen wurden
PBS-	=	Phosphat-gepufferte Saline ohne Calcium und Magnesium
PD/die	=	Population Doubling (Populationsverdopplung) pro Tag
PDGF	=	Platelet-Derived Growth Factor (Plättchen-Wachstumsfaktor)
PEN/STREP	=	Penicillin/Streptomycin
Plaque-SMC	=	SMC, die aus atherosklerotischen Läsionen isoliert wurden
P-SAC	=	Perkutaner Simpson Atherektomie-Katheter. Instrument zur Extraktion von Plaquegewebe
P-SAC-SMC	=	SMC, die aus Plaquematerial isoliert wurden, welches mit dem p-SAC extrahiert wurde
Primär-SMC	=	SMC, die aus primärstenosierendem Plaquegewebe isoliert wurden
PRO	=	Propranolol
Re-SMC	=	SMC, die aus restenosierendem Plaquegewebe isoliert wurden
SK	=	Streptokinase
SMC	=	Smooth Muscle Cell (glatte Muskelzelle)
T-PA	=	Rekombinierter Plasminogen human-Aktivator
TRITC	=	Tetrarhodaminyliothiocyanat
UK	=	Urokinase
WM	=	Waymouth's MB 752/1-Medium

## DANKSAGUNG

Die Experimente der vorliegenden Dissertation wurden am Physiologischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Betz durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Betz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. R. Karsch für die Übernahme des Referates der Dissertation.

Herrn Dr. P.C. Dartsch für die hervorragende fachliche Betreuung der Dissertation und die gekonnte Anfertigung der Photographien.

Herrn Dr. D. Roth für die kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung bei auftretenden Problemen.

Herrn Prof. Dr. B. Höfling und Herrn Dr. G. Bauriedel, Medizinische Klinik der Universität München für die Anregung zur Durchführung der Dissertation und die Zusendung von Plaquematerial aus peripheren Gefäßen von Patienten. Herrn Prof. Dr. Unger und Herrn Dr. J. Hutter, Abteilung für Herzchirurgie der Landeskrankenanstalten Salzburg und Herrn Prof. Dr. Hannekum und Herrn Dr. T. Strohschneider, Abteilung für Herzchirurgie der Universitätsklinik Ulm, für die Bereitstellung von koronarem Plaquematerial. Herrn Prof. Dr. Hoffmeister und Herrn Doz. Dr. Fenchel, Abteilung für Herz, Thorax und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen für das Zurverfügungstellen von Beinvenen. Herrn Prof. Dr. G. Rassner und Herrn Dr. M. Jünger für die Überlassung von dermatologischen Operationspräparaten.

Frau L. Wörner für die unermüdliche Hilfe beim Erlernen der Arbeitstechniken und das angenehme Klima bei der täglichen Laborarbeit. Herrn Dr. M. Höher für die trotz Zeitmangels übernommene Gestaltung eines Großteils der Graphiken.

Den Mitarbeitern am Physiologischen Institut für die freundliche Aufnahme und das gute Betriebsklima.

Meinen Eltern für die ideale und materielle Unterstützung.

Von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (Vorsitz: Prof. Dr. Dr. D. Rössler) wurden die vorgestellten wissenschaftlichen Untersuchungen mit Zellen von Plaquematerial des Menschen genehmigt.

Die experimentellen Untersuchungen wurden vom Ministerium für Wissenschaft und Kunst des Landes Baden-Württemberg (Forschungsprojekt Nr. 26) und von der Braun-Melsungen AG, Melsungen, finanziell unterstützt.

## LEBENS LAUF

**Name:** Rainer Voisard

**Geburt:** 1.1.1960 Geburt in Augsburg als zweiter Sohn des Dipl.-Ing. Otto Voisard und seiner Ehefrau Trude Voisard, geb. Lenk

**Schulbildung:** 66 - 70 Volksschulbesuch in Hamburg und Gauting bei München  
70 - 77 Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting bei München  
77 - 79 Ludwigsgymnasium in München  
27.6.1979 Abitur am Ludwigsgymnasium in München

**Wehrdienst:** 79 - 80 Grundwehrdienst bei österreichischem Bundesheer in Salzburg

**Studium:** 80 - 87 Studium der Humanmedizin an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck  
24.6.1987 Studienabschluß im Fach Humanmedizin (drittes Rigorosum der Studienrichtung Medizin gemäß § 11 des Bundesgesetzes über die Studienrichtung Medizin) an der Universität Innsbruck.  
4.7.1987 Promotion zum Dr. med. univ. an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck  
23.7.1987 Erwerb der deutschen Staatsbürgerschaft

**Berufstätigkeit:** 87 - 88 Praktikumstätigkeit im Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik I, Ludwigs-Maximilians-Universität München.  
1.7.1989 Erteilung der Approbation als Arzt durch das Bayerische Staatsministerium des Innern  
88 - 89 Vorbereitung einer Dissertation am Physiologischen Institut I der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. med. E. Betz mit dem Titel: "Kultivierung von Zellen aus Atheromen des Menschen und die Beeinflussung ihres Wachstums."  
seit 3.1.90 Wissenschaftlicher Assistent an der Universitäts-Klinik Ulm, Innere Abteilung IV, Direktor Herr Prof. Dr. med. V. Hombach.