

**Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung für Radiologische Diagnostik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen**

**Über die Wirkung von Meclofenaminsäure,  
<sup>90</sup>Yttrium und deren Kombination auf humane  
aortale glatte Muskelzellen in einem  
in-vitro Modell der vaskulären Rezidivstenose**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Alexis Landers  
aus  
Witten**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Duda

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Schröder



**Die Wirkung des Anthranilsäure-Derivats Meclofenaminsäure, des  $\beta$ -Emitters  $^{90}\text{Yttrium}$  und deren Kombinationen auf die Proliferation, Migration, die klonogene Aktivität und den Zellzyklus humaner aortaler glatter Muskelzellen in vitro und deren Bedeutung für die Therapie der vaskulären Rezidivstenose.**

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung .....	9
1.1. Einführung .....	9
1.2. Definition der Restenose .....	10
1.3. Die Pathophysiologie der Restenose .....	11
1.3.1. Elastisches Recoil (akuter Lumenverlust) .....	12
1.3.2. Murale Thrombusformation und -organisation .....	13
1.3.3. Intimale Hyperplasie - die Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen .....	13
1.3.4. Vaskuläres Remodeling .....	16
1.3.5. In-Stent Restenose .....	19
1.4. Maßnahmen zur Prävention und Therapie der Restenose .....	20
1.4.1. Rekanalisierende Verfahren – alternative angioplastische Techniken .....	20
1.4.2. Genterapie .....	21
1.4.3. Pharmakotherapeutische Ansätze .....	21
1.5. Anthranilsäurederivate - Tranilast und Meclofenaminsäure .....	22
1.6. Strahlung zur Verhinderung der Restenose .....	25
1.6.1. Radioaktivität .....	25
1.6.2. Das Nuklid <sup>90</sup> Yttrium .....	27
1.6.2. Biologische Strahlenwirkungen .....	28
1.6.2.1. Strahlenschäden an der DNA .....	29
1.6.2.2. Zellzyklus und ionisierende Strahlung .....	31
1.6.3. Einflussfaktoren auf die Wirkung ionisierender Strahlen .....	35
1.7. Versuchsstrategien .....	36
1.8. Fragestellungen .....	37
2. Materialien und Methoden .....	38
2.1. Materialien für das Zellkultursystem .....	38
2.1.1. Zellen .....	38
2.1.2. Kulturmedium .....	38
2.1.3. Trypsin .....	39
2.1.4. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) .....	39
2.1.5. Meclofenaminsäure (MFS) .....	39
2.1.6. Das Radionuklid <sup>90</sup> Yttrium .....	40
2.2. Methoden für das Zellkultursystem .....	41
2.2.1. Kultivierung / Subkultivierung der haSMC .....	41
2.3. Methoden der einzelnen Versuche .....	42
2.3.1. Proliferationskinetik (PK) der MFS-Dauerbehandlung .....	42
2.3.2. Proliferationskinetik (PK) der Versuche mit <sup>90</sup> Yttrium .....	42
2.3.3. Kolonie-Bildungs-Assay (KoBi) .....	43
2.3.4. Migrations-Assay .....	44

2.3.5.	Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt .....	45
2.3.5.1.	<i>Grundlagen der Durchflusszytometrie</i> .....	45
2.3.5.2.	<i>Methodik der Durchflusszytometrie</i> .....	46
2.3.6.	Dosisschätzung .....	47
2.3.7.	Immunfluoreszenz-Färbungen .....	48
3.	Ergebnisse .....	50
3.1.	<b>Übersicht</b> .....	<b>50</b>
3.1.1.	Proliferationskinetik .....	50
3.1.2.	Koloniebildungsassays .....	50
3.1.3.	Zellzyklusanalyse .....	51
3.1.4.	Migrationsassays .....	51
3.2.	<b>Ergebnisse der Proliferationskinetik</b> .....	<b>53</b>
3.2.1.	PK der Einzelbehandlung mit MFS .....	53
3.2.2.	PK der Einzelbehandlung mit <sup>90</sup> Yttrium.....	58
3.2.3.	PK der Kombinationsbehandlung von MFS und <sup>90</sup> Yttrium.....	63
3.2.3.1	<i>Die Kombination von 2Gy und Meclofenaminsäure</i> ..... (50-200µM).....	63
3.2.3.2	<i>Die Kombination von 4Gy und Meclofenaminsäure</i> .....	66
3.2.3.3	<i>Die Kombination von 8Gy und Meclofenaminsäure</i> .....	68
3.3.	<b>Koloniebildungs-Assays</b> .....	<b>72</b>
3.2.1.	Vorbemerkungen .....	72
3.2.2.	Koloniebildungsassays der Einzelbehandlung mit Meclofenaminsäure .....	74
3.2.3.	Koloniebildungsassays der Einzelbehandlung mit <sup>90</sup> Yttrium.....	78
3.2.4.	Koloniebildungsassays der Kombinationsbehandlung von Meclofenaminsäure und <sup>90</sup> Yttrium .....	83
3.4	<b>Ergebnisse Migrationen</b> .....	<b>89</b>
3.5.	<b>Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse</b> .....	<b>95</b>
3.5.1.	Punktwolken-Diagramme .....	95
3.5.2.	G <sub>2</sub> /M-Phase .....	97
3.5.3.	G <sub>1</sub> -Phase.....	100
3.5.4.	S-Phase .....	104
3.6.	<b>Morphologie</b> .....	<b>105</b>
4.	Diskussion .....	109
4.1.	<b>Evaluation einer Therapie mit MFS zur Restenose- prophylaxe</b> .....	<b>109</b>
4.1.1.	Bisheriger klinischer Einsatz von MFS.....	109
4.1.2.	Pharmakokinetik, Nebenwirkungen und therapeutische Breite von MFS - Berücksichtigungen für eine medikamentöse Restenoseprophylaxe.....	110
4.1.3.	Applikationsmöglichkeiten - systemisch oder lokal? .....	112
4.1.3.1.	<i>Eignung von MFS zur systemischen Low-Dose-Langzeittherapie oder als hochdosierte „Kurzchemotherapie“ ?</i> .....	112
4.1.3.2.	<i>Lokale Medikamenten-Applikation – local drug delivery und drug-eluting Stents</i> .....	114
4.1.3.3.	<i>Lokale Medikamenten-Applikation</i> .....	114

4.1.4.	Subzelluläre Wirkungsweisen von Anthranilsäurederivaten – Bedeutung für die Restenosetherapie .....	116
4.1.4.1.	<i>Die Wirkungsmechanismen von Tranilast</i> .....	116
4.1.4.2.	<i>Mechanismen und Effekte der Wirkung von Meclofenaminsäure</i> .....	118
4.1.4.3.	<i>Cyclooxygenasen und Restenose</i> .....	120
<b>4.2.</b>	<b>Ionisierende Strahlung zur Prävention der Restenose</b> .....	<b>122</b>
4.2.1.	Die Effekte ionisierender Strahlung auf glatte Muskelzellen in vitro .....	122
4.2.1.1.	<i>Zellzahlinhibition, klonogene Aktivität</i> .....	123
4.2.1.2.	<i>Migration und ionisierende Strahlung</i> .....	129
4.2.1.3.	<i>Zellzyklus und ionisierende Strahlung</i> .....	133
4.2.2.	Die Radiobiologie endovaskulärer Bestrahlung – Beobachtungen aus Tiermodellen .....	134
4.2.3.	„From bench to bedside“ – Berücksichtigungen bei der Umsetzung von Erkenntnissen aus in-vitro Experimenten und präklinischen Studien .....	138
4.2.3.1.	<i>Die Wahl des Radionuklides</i> .....	138
4.2.3.2.	<i>Die Wahl des günstigsten Dosisbereichs</i> .....	141
4.2.3.3.	<i>Das effektivste Timing</i> .....	143
4.2.3.4.	<i>Die Wahl der Applikationsart</i> .....	144
4.2.3.5.	<i>Die wirtschaftliche Effizienz einer endovaskulären Strahlentherapie</i> .....	145
4.2.4.	Klinische Studien.....	146
<b>4.3.</b>	<b>Die kombinierte Radio-Chemotherapie als mögliche Restenoseprophylaxe</b> .....	<b>150</b>
4.3.1.	Mechanismen einer kombinierten Radio-Chemotherapie .....	150
4.3.2.	kRChT und Restenose .....	151
4.3.3.	Überlegungen zur Bedeutung von MFS als Radiosensitizer .....	153
5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	159
6	Zusammenfassung .....	160
	Tabellenanhang .....	162
	Literaturverzeichnis .....	170
	Lebenslauf .....	188

# ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Arterienwand .....	12
Abbildung 2: Schema der Pathogenese der Restenose .....	18
Abbildung 3: Strukturformel von Anthranilsäure und Tranilast .....	23
Abbildung 4: Meclofenaminsäure (Meclomen <sup>®</sup> ) .....	24
Abbildung 5: Das $\beta$ -Spektrum von <sup>90</sup> Yttrium .....	27
Abbildung 6: Zerfallsgraphik von <sup>90</sup> Yttrium .....	28
Abbildung 7: Schema des Zellzyklus-Phasenverlaufs .....	31
Abbildung 8: DNA-Gehalt während des Zellzyklus .....	32
Abbildung 9: Membraneinsatz des Migrations-Assays .....	44
Abbildung 10: Wachstumskurven der haSMCs unter verschiedenen Konzentrationen mit MFS .....	55
Abbildung 11: Tag-zu-Tag Wachstumsraten der PK mit Meclofenaminsäure ...	58
Abbildung 12: Aktivitätsabnahme von <sup>90</sup> Yttrium in 4 Tagen .....	59
Abbildung 13: Tag-zu-Tag Wachstumsraten der Einzelbehandlung mit <sup>90</sup> Y .....	62
Abbildung 14: PK der Kombinationsbehandlung von 2Gy <sup>90</sup> Y mit MFS .....	64
Abbildung 15: Proliferationskinetik von Behandlungskombinationen mit 4Gy und 0-200 $\mu$ M MFS .....	67
Abbildung 16: Proliferationskinetik von Behandlungskombinationen mit 8Gy und 0-200 $\mu$ M MFS .....	69
Abbildung 17: Dreidimensionales Iso-Diagramm zu den Strahlungs/Medikament-Kombinationen .....	71
Abbildung 18: Relative klonogene Aktivität der Low-Dose-MFS-Gruppen im Verlauf der Zeit .....	74
Abbildung 19: Klonogene Aktivität der High-Dose-MFS-Gruppen im Verlauf der Zeit in absoluten Zellzahlen .....	76
Abbildung 20: Klonogene Aktivität der einzelnen MFS-Konzentrationen im Verlauf der Zeit in Prozent von der Kontrolle .....	77
Abbildung 21: Klonogene Aktivität der Einzelbehandlung mit <sup>90</sup> Yttrium im Verlauf der Zeit in Prozent von der Kontrolle an Tag 4. ....	78
Abbildung 22: Aufnahmen der bestrahlten Kobi-wells an Tag 12 .....	79
Abbildung 23: Schulterkurve der bestrahlten Kolonien von Tag 12 .....	82
Abbildung 24: Kombinationsbehandlung mit 2Gy und MFS .....	84
Abbildung 25: Kombinationsbehandlung mit 4Gy und MFS .....	86
Abbildung 26 a-c: Zusammenstellung der Kobis für jeden Untersuchungstag .	87
Abbildung 27: Migrierte Zellen mit Porenmembran auf dem Zählraster der Fuchs-Rosenthal Kammer .....	89
Abbildung 28: Migrierte Zellen der verschiedenen Bestrahlungsgruppen unter PDGF-Stimulation .....	90

Abbildung 29: Schema des Migrationsassays .....	91
Abbildung 30: Ergebnisübersicht der Migrationsversuche .....	92
Abbildung 31a-c: FACS-Diagramme .....	95
Abbildung 32: G <sub>2</sub> /M-Phasenverteilung an Tag 4 .....	97
Abbildung 33: G <sub>2</sub> /M-Phasenverteilung an Tag 12 .....	97
Abbildung 34: G <sub>2</sub> /M-Phasenverteilung an Tag 20 .....	98
Abbildung 35: G <sub>1</sub> -Phasenverteilung an Tag 4 .....	101
Abbildung 36: G <sub>1</sub> -Phasenverteilung an Tag 12 .....	101
Abbildung 37: G <sub>1</sub> -Phasenverteilung an Tag 20 .....	102
Abbildung 38: Trianguläres Phasenverteilungs-Diagramm .....	104
Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Bilder der anti- $\alpha$ -Actin-Färbung .....	105
Abbildung 40: Immunfluoreszenz-Bilder der anti-Vimentin-Färbung .....	106
Abbildung 41: Ausschnitte aus Kolonien von bestrahlten SMCs .....	107
Abbildung 42: SMC-Kolonien .....	108
Abbildung 43: Schema eines Auszugs des Arachidonsäure-Stoffwechsels ...	119

Tabelle 1: Umrechnung der Anfangsaktivitäten des <sup>90</sup> Y in der Suspension des Kulturmediums nach dem MIRDose-Konzept .....	48
Tabelle 2: Schwankungsbreite zwischen den Ansätzen .....	51
Tabelle 3: Übersicht über die Messungen in den Versuchsreihen .....	52
Tabelle 4: „Surviving fractions“ der KoBis mit 2Gy, 4Gy und 8Gy .....	80
Tabelle 5: Übersicht: Statistik der Migrationsversuche .....	93
Tabelle 6: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Meclofenaminsäure .....	111
Tabelle 7: Präklinische Studien mit endovaskulärer $\beta$ -Strahlung .....	137
Tabelle 8: Beta –Isotope zur endovaskulären Strahlentherapie .....	139
Tabelle 9: BETA- VS. GAMMA Strahlung .....	141
Tabelle 10: Klinische Studien mit IVBT unter Verwendung von $\beta$ -Isotopen .....	147
Tabelle 11: Klinische Studien mit radioaktiven Stents .....	149



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	=	Antikörper
BrdU	=	5-Bromdesoxyuridin
COX	=	Cyclooxygenase
EC	=	Endothelzellen
ECM	=	Extrazellulärmatrix
EVST	=	endovaskuläre Strahlentherapie (=IVBT und radioakt. Stents)
FACS	=	Fluoreszenz-Activated-Cell-Sorting = Durchflusszytometrie
FGF	=	Fibroblast Growth Factor
haSMCs	=	humane aortale glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
ISR	=	In-Stent Restenose
IVBT	=	Intravaskuläre Brachytherapie
IVUS	=	Intravaskulärer Ultraschall
keV	=	kilo Elektronen-Volt
KoBi	=	Kolonie-Bildungs-Assay
kRChT	=	kombinierte Radio-Chemotherapie
LET	=	Linearer Energie-Transfer
MACE	=	Major Adverse Cardiac Effects (Endpunkte klin. Studien)
MFS	=	Meclofenaminsäure
MIRD	=	Medical Internal Radiation Dosimetry
MW	=	Medienwechsel
NIH	=	Neo-Intimale Hyperplasie
NSAID	=	Non-Steroidal-Anti-Inflammatory Drug
PDGF	=	Platelet Derived Growth Factor
PE	=	Plating Efficiency
PG	=	Prostaglandin
PK	=	Proliferationskinetik
pKa-Wert	=	neg. dec. log. der Dissoziationskonstanten einer Säure
pR	=	post Radiatio (Zeitpunkt nach Bestrahlung)
PTA	=	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	=	perkutane transluminale coronare Angioplastie
RBW	=	Relative Biologische Wirksamkeit
TGF	=	Transforming Growth Factor
TXA	=	Thromboxan

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Einführung

In den industrialisierten Ländern ist der größte Teil der Mortalität und Morbidität auf die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie myokardiale oder cerebrale Infarzierungen oder Gangrän und Funktionsverlust von Extremitäten zurückzuführen. Herz-Kreislauf-Erkrankungen nehmen mit ca. 50 Prozent laut Angaben des Statistischen Bundesamtes den vordersten Platz in der Sterblichkeitsstatistik in Deutschland ein. Im Rahmen der chirurgischen Therapien der Gefäßstenosen und -verschlüsse kommen dabei in Deutschland jährlich ca. 50.000 Bypass-Operationen zum Einsatz. Die Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA), die hingegen ein nicht-operatives interventionelles Verfahren zur Rekanalisation von Gefäßengstellen ist, wird in Deutschland zur Zeit ca. 160.000 mal jährlich an Herzkranzarterien (als PTCA) durchgeführt, in den USA mehr als 800.000 mal <sup>[1]</sup>. Diese Form der Therapie stenosierter Gefäße ist in ihrer ursprünglichen Form von Dotter und Judkins (1964) <sup>[2]</sup> durchgeführt worden und hat sich seither zunehmend weiterentwickelt und etabliert. Jedoch kommt es in Abhängigkeit von der zu dilatierenden Arterie (elastischer oder muskulärer Typ) bzw. der Lokalisation (Zunahme der Restenose nach peripher <sup>[148]</sup>), der Begleitmedikation oder sonst eines Behandlungsparameters in 25-60% der Fälle in einem Zeitraum bis zu einem halben Jahr nach PTA zu Restenosen, die eine erneute Behandlung erforderlich machen <sup>[3,4,5]</sup>. Neben der erheblichen Belastung für den Patienten fordern diese reinterventionellen Maßnahmen einen enormen Kostenaufwand, der nur schwer beziffert werden kann. Vorsichtige Schätzungen W. S. Weintraubs gehen allein von jährlich in den USA verursachten Kosten von 800 Millionen bis 2 Milliarden US Dollar aus <sup>[6]</sup>, andere Berechnungen sogar von über 3.5 Milliarden Dollar pro Jahr <sup>[7]</sup>. Die Ersparnis, die eine Reduktion der Restenoserate mit sich bringen würde, ist somit offensichtlich. Es wird angenommen, dass eine alleinige Senkung der Restenoserate von 33% auf 25% zu einer jährlichen Kostenreduktion von 750 Millionen US Dollar in den

USA führen würde<sup>[8]</sup>. Die in Deutschland mit ca. 3200 Euro angegebenen Folgekosten einer Angioplastie ließen sich bei einer 50%igen Reduktion der Restenoserate auf ca. 1100 Euro senken. Die vorliegende Dissertation hat sich zum Ziel gesetzt anhand eines in-vitro Modells ein Therapiekonzept zu entwerfen, welches zur Reduzierung der Restenoserate beitragen möchte.

## 1.2. Definition der Restenose

„Restenose“ (eigentlich: Rezidivstenose) beschreibt das pathophysiologische Phänomen, dass das Lumen (durch interventionelle Maßnahmen) rekanalisierter atherosklerotisch veränderter Gefäße dazu neigt sich erneut einzuengen. Sie lässt sich also als eine iatrogene, rezurrente, arterielle Obstruktion definieren.

Die in der Literatur vorzufindene Schwankungsbreite der Auftretenshäufigkeit restenotischer Gefäßläsionen (25%-60%) ist nicht zuletzt auf die unterschiedlichen Bezugspunkte im Rahmen untereinander abweichender Definitionen zurückzuführen. Somit kann Restenose nach angiographischen, klinischen oder histologischen Kriterien definiert werden. Angiographisch signifikante Restenosen sind Läsionen mit >50% Stenose oder >30% Lumenreduktion (ausgehend vom initialen postinterventionellen Befund)<sup>[9]</sup>. Andere Autoren definieren den restenotischen Prozess als eine Lumeneinengung, die den mittleren Gefäßdurchmesser um zwei Standardabweichungen übersteigt. Klinische Definitionen richten sich nach limitierenden Ereignissen (sogenannten „endpoints“) wie Exitus letalis, Re-Intervention oder Bypass-OP, auftretender Angina pectoris Symptomatik (bei koronarer Restenose) oder Infarzierungen.

### 1.3. Die Pathophysiologie der Restenose

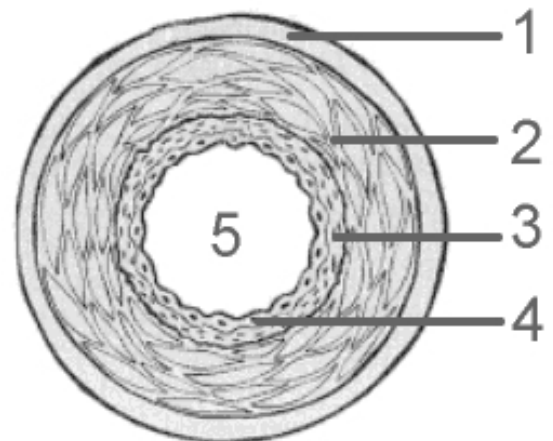
Die Entstehungsmechanismen der Restenose sind wegen ihrer multifaktoriellen Ätiologie äußerst komplex und weder in der Gewichtung ihrer einzelnen Komponenten noch in ihren zeitlichen Abläufen vollständig geklärt. In der Vergangenheit dienten vornehmlich Tiermodelle der Erforschung der Ausbildung von Restenosen. Die Arteria carotis der Ratte ist das wahrscheinlich meist verwendete Tier-„Modell“ (neben anderen Tiermodellen wie Hase, Schwein, Hund). Die gefundenen Ergebnisse sind daher nur bedingt auf den Menschen übertragbar. (Schon der Gefäßwandaufbau ist bei der Ratte anders als beim Menschen.) So mögen die Abläufe in einer experimentell gesetzten arteriellen Läsion in der Halsschlagader der Ratte nicht exakt die Mechanismen der Restenose nach Ballondilatation eines atherosklerotischen humanen Gefäßes wiedergeben. Ebenso scheinen die zeitlichen Abläufe, die zum „multiwave Modell“<sup>[13]</sup> der Restenose geführt haben (das Modell beschreibt das wellenförmige Auftreten der zellulären Reaktionen auf einer arterielle Verletzung, s. 1.3.1.bis 1.3.4.), sowie die Gewichtung der einzelnen ineinandergreifenden und interagierenden Mechanismen beim Menschen bezüglich ihrer Dauer oder der Reihenfolge des Auftretens zumindest teilweise anders zu sein.

Die Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA) ist eine Technik zur Rekanalisation eines durch eine atherosklerotische Läsion eingeengten Gefäßes, die durch die Aufdehnung der Gefäßwand ein fokales Trauma induziert. Diese diskrete Verletzung der Arterie initiiert die Entzündungs-, Reparations- und Wundheilungsprozesse, welche die restenotische Läsion charakterisieren<sup>[10,25]</sup>. Die Sequenz der Ereignisse, die letztendlich die Wiedereinengung des Gefäßes zur Folge hat, beginnt also mit einer mechanischen Schädigung, die sich in tiefen Fissuren der Tunica intima und Teilen der Tunica media, einer Überdehnung aller Gefäßwandschichten mit Kompression der Vasa vasorum der Tunica adventitia, einer Plaquekompression mit möglicher Dissektion und Deendothelialisierung mit Exposition der thrombogenen subendothelialen Schichten an Blutbestandteile äussert.

### Abbildung 1: Arterienwand

Die Zeichnung verdeutlicht schematisch den Aufbau einer Arterienwand im Querschnitt

- 1: Tunica adventitia
- 2: Tunica media
- 3: Tunica intima
- 4: Endothel
- 5: arterielles Gefäßlumen



Die sich anschließenden Kaskaden und Phasen, die in einem Zeitraum von ca. 6 Monaten beim Menschen zur Restenose führen, laufen zum Teil parallel und beeinflussen sich wechselseitig<sup>[4]</sup>. Sie sollen im Folgenden aber getrennt voneinander vorgestellt werden:

#### 1.3.1. Elastisches Recoil (akuter Lumenverlust)

Die Wanddehnung nach PTA kann eine luminale Querschnittszunahme von bis zu 43% unmittelbar nach der Intervention erreichen. Ein frühes, von den viskoelastischen Eigenschaften des Gefäßes abhängiges passives elastisches Zurückfallen der Gefäßwand (elastic recoil) nach PTA kann allerdings wiederum innerhalb des ersten Tages einen Querschnittsverlust von 23% - 46% mit sich führen.

Ein frühes elastisches Recoil hat möglicherweise auch eine Bedeutung für sich später entwickelnde restenotische Prozesse. Die Einführung endoluminaler Gefäßstützen aus feinen Metallstreben, sogenannter Stents, verhindert das elastische Recoil<sup>[11]</sup>.

### 1.3.2. Murale Thrombusformation und -organisation

Die durch die Angioplastie freigelegten subendothelialen thrombogenen Gefäßwandschichten begünstigen die Anlagerung und Aktivierung von Blutplättchen (Degranulation mit Freisetzung von Cytokinen, Entzündungsmediatoren, Mitogenen, vasoaktiven Substanzen etc.) mit konsekutiver Thrombusformation schon innerhalb der ersten 10 Minuten nach Ballondilatation<sup>[3,5]</sup>. Während die Bedeutung einer massiven Thrombusformation nach PTA für die Ausbildung der Restenose in den letzten Jahren abgenommen hat, wird der prozessinitiierenden Bedeutung der Plättchen und der durch ihre lokale Formation hervorgerufenen lokalen Blutflussveränderung in letzter Zeit mehr Aufmerksamkeit gewidmet<sup>[12]</sup>. So bewirkt die Deendothelialisierung und die Plättchenadhäsion und –aggregation eine Aktivierung und Invasion von Leukozyten (Monozyten, polymorphkernigen Granulozyten, T-Lymphozyten), die ihrerseits wiederum eine Reihe an Substanzen freisetzen (z.B. vasoaktive Substanzen, reaktive radikalische Sauerstoffmetaboliten, proteolytische Enzyme, Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokine u.a.), welche zur Entstehung bzw. Progression von intimaler Hyperplasie beitragen könnten<sup>[10]</sup>.

### 1.3.3. Intimale Hyperplasie - die Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen

Diese Phase (ca. 24h bis 3 Monate post PTA) ist charakterisiert durch eine Proliferation glatter Muskelzellen der Tunica media, deren Migration in die Tunica intima und deren dortige Replikation und Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM).

Bei der Ratte findet die Replikation in der Tunica media innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach PTA statt<sup>[12,13]</sup>. Hanke et al. konnten bei ihrem verwendeten Kaninchen-Modell für die mediale Replikation einen Zeitraum von 21 Tagen und für die intimale Replikation eine Zeitspanne von 7 Tagen nachweisen<sup>[14]</sup>. Alle bisherigen Untersuchungen weisen insgesamt geschlossen

darauf hin, dass die Proliferation der medialen SMCs einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum (unmittelbar postinterventionell) einnimmt. Mindestens 20%-40% der medialen SMCs werden aktiviert und treten nach 24h bis 72h in den Zellzyklus ein. Nur etwas mehr als die Hälfte der in die Tunica media auswandernden SMCs synthetisiert weiter DNA und durchläuft bis zu drei weitere Teilungen <sup>[15]</sup>. Eine weitere Eigenschaft, die das Migrationsverhalten der glatten Gefäßmuskelzellen von deren Proliferationsaktivität abgrenzen lässt, ist beispielsweise die Tatsache, dass ihre Migrationsfähigkeit unter Strahlendosen oder Medikamentenspiegeln, welche die Zellteilung hemmen, unbeeinflusst bleibt <sup>[12]</sup>.

Neueste Untersuchungen können an einem Schweine-Tiermodell zwei phänotypisch unterscheidbare Arten verschieden differenzierter glatter Gefäßmuskelzellen (einen epitheloiden Typ und einen rhomboiden Typ) mit unterschiedlichem biologischen (insbesondere migratorischen) Verhalten nachweisen, die unter dem Einfluss von Endothel oder Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF) im Gegensatz zu Beobachtungen bei der Ratte reversibel ineinander überführt werden können <sup>[32]</sup>.

Für menschliche SMCs wird ebenfalls eine bidirektionale Differenzierungsfähigkeit angenommen. Aktivierte glatte Gefäßmuskelzellen erfahren demnach einen ultrastrukturellen Wandel (basierend auf einer unterschiedlichen Verteilung ihrer Actinfilamente und der Formation größerer Mengen rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) und von Golgi-Apparaten,) so dass SMCs eines kontraktiven Typs von solchen eines synthetisierenden Typs abgegrenzt werden können. Zellen des kontraktiven Phänotyps antworten vermehrt auf Mediatoren, die Vasodilatation oder Vasokonstriktion vermitteln (u.a. PGE, Kathecholamine, PGI<sub>2</sub>, Leukotriene, NO), wohingegen Zellen des synthetisierenden Typs zur Genexpression eine Reihe von wachstumsregulierenden Molekülen und Cytokinen befähigt sind, entsprechende Wachstumsfaktor-Rezeptoren exprimieren und Extrazellulärmatrix (ECM) synthetisieren <sup>[16,17]</sup>.

Die proliferative Aktivität einzelner glatter Muskelzellen scheint heterogen zu sein <sup>[18]</sup>. Ob diese Heterogenität beim Menschen direkt mit dem teilweise

veränderten Phänotyp der glatten Muskelzellen nach Stimulation durch Verletzung zusammenhängt, eine spezielle Subpopulation vorliegt oder nur ein allgemeiner Unterschied der generellen Eigenschaften der SMCs existiert, muss noch geklärt werden.

Rasmussen et al.<sup>[147]</sup> konnten in ihren Experimenten verschiedene Reaktionen muskulärer und elastischer peripherer Arterien auf den Verletzungsreiz eines Ballonkatheters nachweisen. Ob dieser Unterschied in der individuellen Läsionscharakteristik begründet liegt oder in der Tatsache, dass es sich um unterschiedliche Subpopulationen glatter Gefäßmuskelzellen handelt (glatte Muskelzellen in verschiedenen Arterien könnten verschiedenen Subpopulationen angehören, da sie in der Embryogenese vom lokalen individuellen Organparenchym stammen<sup>[16]</sup>), ist ebenfalls unbekannt.

Glatte Muskelzellen werden durch eine Vielzahl von Reizen stimuliert<sup>[16,10]</sup>. Die alleinige mechanische Dehnung der SMCs während der PTA ist ein solcher Stimulus, ebenso die von geschädigten oder zerstörten SMCs freigesetzten Substanzen, aber auch Signalstoffe aus einwandernden Entzündungszellen (v.a. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten), aus dem geschädigten Endothel sowie von den degranulierenden Blutplättchen tragen dazu bei. Der basische fibroblastische Wachstumsfaktor (bFGF) scheint bei der Proliferation der SMCs in der Media eine Schlüsselfunktion zu übernehmen und wird von Endothelzellen, Makrophagen sowie geschädigten SMCs selbst gebildet<sup>[13]</sup>. Als Stimulanz der intimalen Proliferation ist er wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung.

Im Rahmen der Migration wird PDGF (einem Plättchen-Wachstumsfaktor) eine herausragende Rolle zugesprochen<sup>[19]</sup>. PDGF, der ebenfalls von verletzten oder aktivierten glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert wird, ist auch an der intimalen Proliferation der SMCs beteiligt, sowie auch basic fibroblast growth factor ( $\beta$ -FGF), insulin-like-growth-factor (IGF), epidermal-growth-factor (EGF), transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und andere Faktoren und Cytokine<sup>[4,12]</sup>. Vor dem Hintergrund der von uns an glatten aortalen Muskelzellen durchgeführten Experimente ist ferner interessant, dass



einige Eicosanoide (u.a. Prostaglandine und Prostazykline) die Proliferation glatter Muskelzellen beeinflussen <sup>[20]</sup>.

TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) ist maßgeblich an der Transdifferenzierung der SMCs vom kontraktilen zum synthetisierenden Typ beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die Kollagen- und Fibronektinsynthese von SMCs positiv beeinflusst. TGF- $\beta$  scheint somit in der Pathogenese des negativen vaskulären Remodelings (s.u.) nach PTA, das sich in einer Konstriktion der Media aufgrund einer fibrosierenden Adventitia zeigt, eine Schlüsselstellung einzunehmen <sup>[21]</sup>. Aktuelle Ergebnisse von Untersuchungen an In-Stent-Läsionen legen auch die Beteiligung von TGF- $\beta$  an der neointimalen Läsionsformation nahe.

Nach 14 Tagen sinkt die Proliferationsrate der SMCs wieder ab. Jede weitere Durchmesserzunahme der Intima, die erst nach einem Zeitraum von 8-12 Wochen abgeschlossen ist, wird dann durch die von den SMCs produzierte Extrazellulärmatrix hervorgerufen <sup>[3]</sup>. Zelluläre Komponenten nehmen schlussendlich nur einen kleinen Teil des neointimalen Volumens ein (nach Untersuchungen von Schwartz und al. nur ca. 11% <sup>[22]</sup>).

#### 1.3.4. Vaskuläres Remodeling

Vaskuläres Remodeling beschreibt eine reaktiv-kompensatorische Umorganisation der Geometrie und Struktur eines Gefäßes. Es stellt einen normalerweise adaptiven Prozess als Reaktion auf Langzeitveränderungen der Hämodynamik des Blutes dar. Eine Gefäßquerschnittszunahme definiert man dabei als sogenanntes „positives“ Remodeling. Ebenso tragen die remodelierenden Vorgänge aber auch (als „unvorteilhaftes“, sog. „negatives“ Remodeling) zur Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen und zirkulatorischer Funktionsstörungen bei. Initiationssignale des vaskulären Remodelings sind demnach vermutlich Veränderungen hämodynamischer Bedingungen (wie Blutflussgeschwindigkeit, Gefäßwanddehnung oder Scherkräfte) und humorale Faktoren (wie Cytokine und vasoaktive Substanzen). Zellen (und deren Mediatoren und Botenstoffe) aller

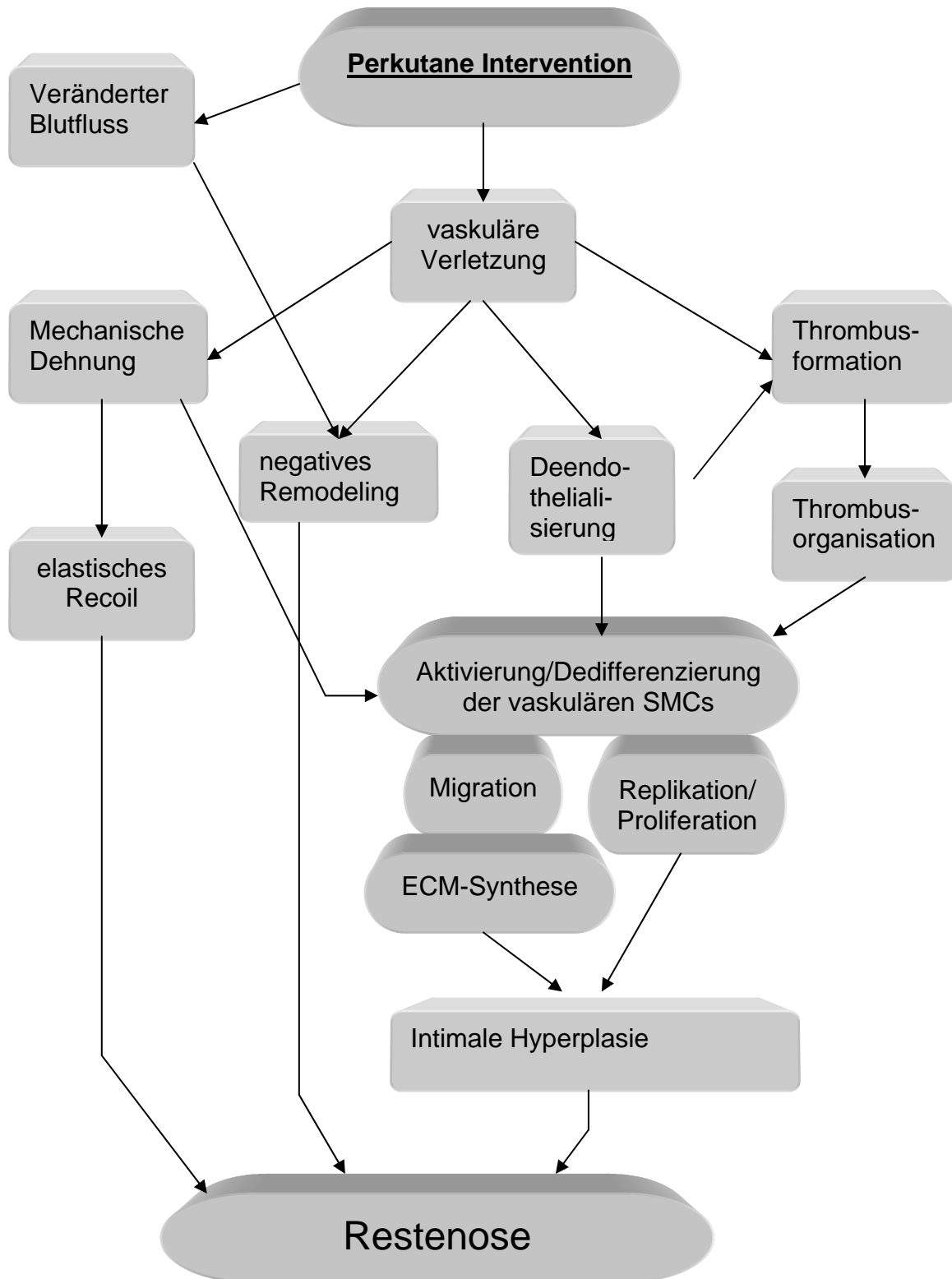
Gefäßwandschichten scheinen am Prozess des vaskulären Remodeling beteiligt zu sein (insbesondere adventitielle Myofibroblasten<sup>[25]</sup>), aber auch die Extrazellulärmatrix, die als vaskuläres Bindegewebe das Gerüst des Gefäßes darstellt und deren Gehalt und Zusammensetzung durch Matrix-Metalloproteinasen reguliert wird, spielt eine entscheidende Rolle<sup>[23]</sup>.

An atherosklerotischen Läsionen konnte gezeigt werden, dass positives Remodeling eine Plaqueausbildung von bis zu 40% des stenosierten Bereiches zu kompensieren vermag. Minz et al.<sup>[24]</sup> fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass 73% der Querschnittsabnahme restenotischer Läsionen durch negatives vaskuläres Remodeling erklärt werden kann.

In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass bestrahlte Gefäße signifikant gegenüber der Kontrolle dilatiert waren<sup>[26]</sup>, also einem positiven Remodelingprozess unterworfen waren. Auch Ergebnisse humaner Intra-Vaskulärer Ultra-Schall-Untersuchungen (IVUS) berichten ein fehlendes Schrumpfen des Durchmessers der membrana elastica externa 6 Monate post radiatio in ballondilatierten Gefäßen.

Über Terminationsfaktoren restenotischer Prozesse ist bisher relativ wenig bekannt. Die Re-endothelialisierung mit ihrer NO-vermittelten SMC-Inhibition und der Beendigung der Plättchenexposition an die subendotheliale Gefäßwand sind jedenfalls nicht die einzigen Mechanismen<sup>[4]</sup>.

**Abbildung 2: Schema der Pathogenese der Restenose**



*Das Schema zeigt die Verknüpfungen der an der Restenose maßgeblich beteiligten Mechanismen.*

### 1.3.5. In-Stent Restenose

Seit einigen Jahren implantiert man mit Hilfe eines Ballonkatheters endoluminale Gefäßstützen aus feinen Metallstreben (sogenannte Stents) um dem Problem der Restenose zu begegnen. Nachdem „das Stenten“ anfänglich besonderen Indikationen vorenthalten war <sup>[28]</sup>, sind immer mehr Zentren wegen der positiven Studienergebnisse (z.B. BENESTENT-Studie <sup>[60]</sup>, STRESS-Studie <sup>[61]</sup>) dazu übergegangen auch primär Stents zu implantieren. Der Einsatz koronarer Stents z.B. hat die Inzidenz der Restenose bei Herzkranzarterien signifikant auf bis zu 20%-50% gesenkt <sup>[27]</sup>. Inzwischen werden bei Weitem mehr Stent-Implantationen (in bis zu 80% der Fälle) als reine Angioplastien durchgeführt. Somit nimmt auch die In-Stent-Restenose einen dominierenden klinischen Stellenwert ein.

Zur Prävention der früher häufig mit einiger Verzögerung aufgetretenen subakuten Stentthrombosen kommen heute routinemäßig Thrombozytenaggregationshemmer als Begleittherapie zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass die Implantation eines Stents das elastische Recoil und somit den akuten postinterventionellen Lumenverlust verhindert. Das Hineinpressen der Metallstreben des Stents in die Gefäßwand mittels des Ballonkatheters verursacht ein tiefes fokales Trauma in der Arterie, welches wahrscheinlich durch die aufrechterhaltene Spannung der expandierten Stentdrähte im Vergleich zur reinen Ballonangioplastie noch prolongiert ist. Entsprechend wurde beobachtet, dass die zur neointimalen Formation führende zelluläre Antwort bei einer Stentimplantation diejenige nach PTA noch übersteigt. Moreno et al. kommen vor dem Hintergrund vorheriger postmortemstudien zu dem Schluss, dass die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen den Hauptmechanismus für In-Stent Restenose darstellt <sup>[29]</sup>. Des Weiteren stellte sich heraus, dass das eingebrachte Fremdmaterial im Rahmen einer Fremdkörperreaktion einen chronischen Entzündungsprozess in der Gefäßwand aufrecht erhält, was sich unter anderem histologisch an der Anreicherung von Makrophagen um die Stentstreben erkennen lässt <sup>[29,30]</sup>. Die Implantation des Stents als eine relativ starre endoluminale Gefäßstütze scheint das vaskuläre Remodeling, wie es sich bei Restenosen nach PTA

darstellt, zu verhindern. Da negatives (= konstriktives) Remodeling auf einer der Narbenbildung ähnlichen fibrotisch-inflammatorischen Veränderung der Adventitia mit Akkumulation aktivierter Myofibroblasten zu beruhen scheint, ist es interessant, dass in gestenteten Arterien im Tiermodell von Christen et al. keine signifikanten adventitiellen Veränderungen ausmachbar waren <sup>[31]</sup>. Allerdings scheint das präinterventionelle Remodeling der atherosklerotischen Gefäßläsion das Ausmaß der sich später entwickelnden In-Stent Restenose zumindest teilweise zu prädisponieren.

## 1.4. Maßnahmen zur Prävention und Therapie der Restenose

### 1.4.1. Rekanalisierende Verfahren – alternative angioplastische Techniken

Wegen der hohen Restenoseraten nach PTA sind in der jüngeren Vergangenheit neben der Implantation von Stents (s. 1.3.5.) alternative Methoden zur Behandlung vaskulärer Engstellen entwickelt worden. Es wurden dabei verschiedene Verfahren angewandt, die zum Ziel hatten überschüssiges Plaquematerial mechanisch aus der Arterienwand zu entfernen (sogenanntes „debulking“). Die angewendeten Techniken, u.a. Rotationsangioplastie (= Hochfrequenzrotablation) oder direktionale Atherektomie ebenso wie perkutane Thrombusaspiration oder Excimer-Laserangioplastie können nach Ergebnissen neuerer Studien die Restenoserate im Vergleich zur PTA aber nicht langfristig senken <sup>[33,34]</sup>.

### 1.4.2. Gentherapie

In der letzten Zeit ist auch einigen Ansätzen nachgegangen worden die Restenosebildung lokal gentherapeutisch zu beeinflussen.

Gentherapie besteht in dem Transfer von Nukleinsäuren in somatische Zellen mit dem Effekt einer Korrektur genetischer Defekte oder der Überexpression von Proteinen mit therapeutischem Wert.

Mögliche Angriffspunkte („targets“) stellen dabei im Rahmen der Restenoseforschung z.B. die selektive Hemmung von Wachstumsfaktoren, die unspezifische Inhibition der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen über den Zellzyklus oder die Stimulation der Reendothelialisierung durch Induktion eines Endothel-Wachstumsfaktors dar. Trotz einiger vielversprechender Ansätze auf diesem noch jungen Forschungsgebiet bleiben Fragen offen (wie z.B. die Steuerung der Genexpression des transferierten Gens bzw. die Steuerung des induzierten Proteins, die geeignete Wahl eines Vektors oder die Entwicklung passender Applikations-Systeme), die weiterer Grundlagenforschung bedürfen <sup>[39]</sup>.

### 1.4.3. Pharmakotherapeutische Ansätze

Die Ausbildung einer restenotischen Gefäßveränderung ist ein komplexer Prozess und der Vorgang dieser Läsionsbildung von der Interaktion einer Fülle unterschiedlichster beteiligter Strukturen, Zellen, Mediatoren und Mechanismen abhängig. Vor dem Hintergrund, dass mit der Komplexität der Erkrankung ebenfalls die Zahl der Orte verschiedenster Angriffs- und Interventionsmöglichkeiten steigt, verwundert es nicht, dass in den vergangenen Jahren ein enormes Spektrum an möglichen pharmakologischen Präventions- und Therapieansätzen erforscht worden ist. Nur wenige Medikamente erwiesen sich allerdings in den bisherigen Studien und Experimenten als effektiv. Die außerdem zum Teil sehr von einander abweichenden Resultate der Untersuchungen an denselben Wirkstoffen sind wahrscheinlich häufig auf die idealisierten Bedingungen der in-vitro Versuche,

die bedingte Übertragbarkeit von gewonnenen Aussagen aus Tiermodellen und die Wahl verschiedenster klinischer Studiendesigns zurückzuführen.

Die wohl meist verwendeten Substanzgruppen sind <sup>[35-38]</sup>:

- Antithrombotische Medikamente und Antikoagulantien
- Zytostatika und Antiproliferativa
- Immunsuppressiva und Anti-Inflammatorische Substanzen
- Antioxidantien
- Lipidsenker
- Anti-Hypertensiva (inkl. ACE-Hemmer (=Angiotensin-Converting Enzyme) und NO-Donatoren (=Stickstoffmonoxid-Donatoren))
- Calcium-Kanal-Blocker
- Antibiotika
- u.a.

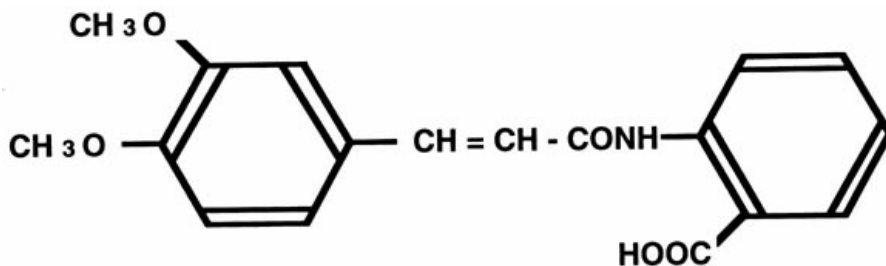
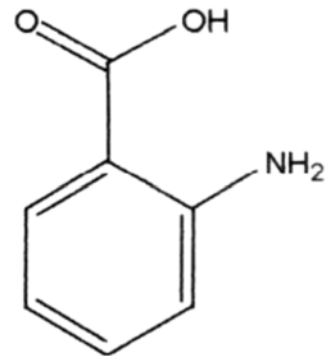
## 1.5. Anthranilsäurederivate – Tranilast und Meclofenaminsäure

Unter den im Zusammenhang mit Restenoseprävention untersuchten Medikamenten aus der Gruppe der antiproliferativen Substanzen nimmt das Anthranilsäurederivat Tranilast eine besondere Stellung ein.

Tranilast (3,4-Dimethoxyphenylacrylsäure(2,Carboxyphenyl)amid), ein oral applizierbares Antiallergikum, das ursprünglich in Japan von Kissei Pharmaceuticals entwickelt worden ist, hat bisher bei Patienten mit Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis Anwendung gefunden. Aber auch bei der Behandlung hypertropher Narben (sog. Keloide) ist dieses Medikament schon erfolgreich zum klinischen Einsatz gekommen <sup>[40]</sup>.

**Abbildung 3: Strukturformel von Anthranilsäure und Tranilast**

**Abbildung 3a: Strukturformel von Anthranilsäure** (2-Amino-benzoessäure)



**Abbildung 3b: Strukturformel von Tranilast**, dem Säureamid aus 3,4-Dimethoxyzimtsäure und der 2-Aminogruppe von Anthranilsäure (N(3,4-dimethoxycinnamoyl)anthranilic acid), (3,4-Dimethoxyphenylacrylsäure(2,Carboxyphenyl)amid)

Auf dem Gebiet der Restenoseforschung hat sich Tranilast in in-vitro Experimenten als ein potenter Hemmer der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen erwiesen. Des Weiteren konnte eine Inhibition der Kollagensynthese aktivierter vaskulärer SMCs nachgewiesen werden <sup>[41,42]</sup>. Die Wirkungsmechanismen von Tranilast scheinen außerordentlich vielfältig zu sein (s. a. 4.1.4.1.). In vielen Publikationen wird daher von einer „multi-action drug“ gesprochen. In einer großen Zahl unterschiedlicher Tiermodelle konnte das Anthranilsäurederivat eindrucksvoll die Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie hemmen <sup>[43-45]</sup>.

Eine Reihe kleiner klinischer Studien hat die Potenz dieses Medikamentes zur Prävention der Restenose zeigen können <sup>[46,47]</sup>. Die PRESTO-Studie allerdings, die mit ca. 11.500 Patienten die größte bisherige internationale Restenose-Studie überhaupt gewesen ist, konnte eine signifikante Senkung der Restenoserate (unter Einnahme von 300mg und 450mg Tranilast zweimal

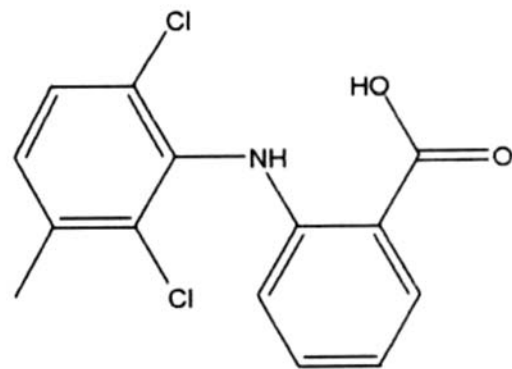


täglich über einen Zeitraum von einem oder drei Monaten) unter dieser Medikamentendosis nicht bestätigen<sup>[48]</sup>.

Die insgesamt aber vielversprechenden Resultate von Tranilast bei der Behandlung der Restenose geben Anlass ein anderes Fenamat (= Anthranilsäurederivat) bezüglich seiner Potenz zur Prävention der Restenose zu untersuchen: Meclofenaminsäure.

**Abbildung 4: Meclofenaminsäure**  
**(Meclomen<sup>®</sup>)**

2-((2,6-Dichloro-3-Methylphenyl)amino)-benzoessäure  
Summenformel:  $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$



Meclofenaminsäure (=MFS) wird den nicht-steroidalen Antiphlogistika (= Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID)) zugerechnet und wirkt unter anderem über eine Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Klinisch wird es bei der Behandlung der Arthritis (osteo- und rheumatoide Arthritis), zur Analgesie (leichten bis mittelschweren Schmerzes), bei Dysmenorrhöen und Menorrhagien eingesetzt<sup>[49]</sup>.

Erste in vitro Versuche mit MFS im Zusammenhang mit der Restenoseforschung lassen dessen hemmende Wirkung auf proliferierende glatte humane aortale Muskelzellen erkennen<sup>[50]</sup>.

## 1.6. Strahlung zur Verhinderung der Restenose

Seit rund hundert Jahren werden in der Medizin Röntgenstrahlen und Radioaktivität auch zur Therapie benigner entzündlicher und hyperplastischer Prozesse angewendet. Da es sich bei der Entwicklung der Restenose eines Gefäßes ebenfalls um einen entzündlichen und insbesondere bei der In-Stent Restenose um einen proliferativen Vorgang handelt, ist die Erforschung eines Therapieansatzes mit elektromagnetischer oder korpuskulärer Strahlung auf diesem Gebiet gerechtfertigt.

Einige Studien der jüngeren Vergangenheit haben bereits gezeigt, dass die Einsetzbarkeit radioaktiver Strahlung zur Prävention der Restenose erfolgversprechend zu sein scheint. Zur klinischen Anwendung sind dabei fast ausschliesslich intravaskuläre Bestrahlungsverfahren gekommen. Zum einen können Afterloading Techniken (= endovaskuläre Brachytherapie (EVBT)) verwendet werden, bei denen innerhalb eines kurzen Zeitraumes hohe Aktivitäten zum Einsatz kommen, oder die Implantation radioaktiver Stents mit niedrigerer Aktivität. Bei der Frage nach den verwendeten Radionukliden stehen momentan ebenfalls verschiedene Strahler zur Auswahl. Zum einen erweisen sich hochenergetische Betastrahler als günstig ( $^{90}\text{Yttrium}$ ,  $^{188}\text{Rhenium}$  oder  $^{32}\text{Phosphor}$ ) zum anderen niedrigenergetische Gammastrahler ( $^{192}\text{Iridium}$ ).

### 1.6.1. Radioaktivität

Die radioaktiven Eigenschaften bestimmter Elemente sind Folge einer energetischen Instabilität ihrer Atomkerne, die auf ein Missverhältnis zwischen Neutronen- und Protonenzahl zurückzuführen ist. Unter Radioaktivität versteht man also spontane Kernumwandlungsprozesse unter Aussendung von elektromagnetischer Strahlungsenergie (z.B.  $\gamma$ -Quant) oder Bewegungsenergie der emittierten Teilchen zu denen z.B. Elektronen ( $\beta^-$ -Strahlen) oder Helium<sup>2+</sup>-Kerne ( $\alpha$ -Strahlen) gehören <sup>[57]</sup>.

Die gebräuchliche Maßeinheit der Radioaktivität ist das *Becquerel* (Bq). 1 Bq ist dabei gleich der Aktivität eines Radionuklids, in dem pro Sekunde ein Zerfall stattfindet.

Die Zahl der Zerfälle pro Zeiteinheit ist eine charakteristische Größe für eine radioaktive Substanz. Das Zerfallsgesetz lautet:

$$N_{(t)} = N_{(0)} \cdot e^{-\lambda t}$$

Dabei entspricht  $N_{(t)}$  der Zahl der zur Zeit  $t$  noch nicht zerfallenen radioaktiven Atome,  $N_{(0)}$  der Anfangszahl der radioaktiven Atome und  $\lambda$  der Zerfallskonstanten.

Da die Zahl der Zerfälle pro Zeiteinheit der Anzahl der noch vorhandenen radioaktiven Atome proportional ist, beschreibt die sog. Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) das Intervall, in dem die anfangs vorhandene Aktivität auf die Hälfte abgesunken ist. Zwischen der Zerfallskonstanten und der Halbwertszeit besteht folgende Beziehung:

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

Im Rahmen der Experimente mit den haSMCs und  $^{90}\text{Y}$  ist bei der dosimetrischen Abschätzung der Bestrahlungsplanung als Dosisgröße die Energiedosis ( $D$ ) verwendet worden. Sie ist definiert als die im betreffenden Gewebevolumen mit der Masse  $dm$  absorbierte Energie  $dW$ :

$$D = \frac{dW}{dm} \quad \text{Die Einheit ist das Gray (Gy)} = \frac{\text{Joule}}{\text{kg}} = \frac{\text{Ws}}{\text{kg}}$$

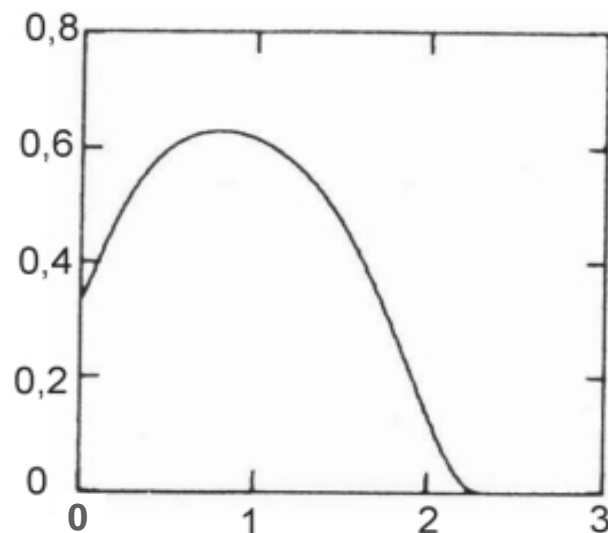
Neben der Energiedosis spielt die Äquivalentdosis, die die biologische Wirkung der verschiedenen Strahlenarten berücksichtigt, eine entscheidende Rolle. Die effektive Äquivalentdosis berücksichtigt darüber hinaus noch die verschiedene Strahlenempfindlichkeit unterschiedlicher Gewebe <sup>[58]</sup>.

### 1.6.2. Das Nuklid $^{90}\text{Yttrium}$

$^{90}\text{Yttrium}$  ist ein radioaktives Element mit 51 Neutronen und 39 Protonen. Es handelt sich dabei um einen reinen  $\beta^-$ -Strahler, was impliziert, dass bei dessen Zerfall nur Elektronen emittiert werden. Diese besitzen eine maximale Energie von  $E_{\text{MAX}}= 2,284$  MeV (Mega Elektronen-Volt) und eine Durchschnittsenergie von  $E_{\text{AVG}}=0,935$  MeV. Da die maximale Energie zum Beispiel nur einen kleinen Endpunkt einer schwachen Hochenergiekomponente darstellen kann, ist es zur näheren Charakterisierung der emittierten Strahlung sinnvoll das Spektrum des Strahlers zu betrachten, welches bei verschiedenen Nukliden hohe interindividuelle Unterschiede besitzen kann. Die Formen dieser Spektren sind primär für Variationen in der Gestalt der Tiefen-Dosisverteilung mitverantwortlich.

**Abbildung 5: Das  $\beta$ -Spektrum von  $^{90}\text{Yttrium}$ .**

*Auf der Abszisse sind die  $\beta$ -Energien in MeV, auf der Ordinate die Anteile von  $\beta$ -Partikeln pro MeV für eine nukleäre Desintegration aufgetragen.*

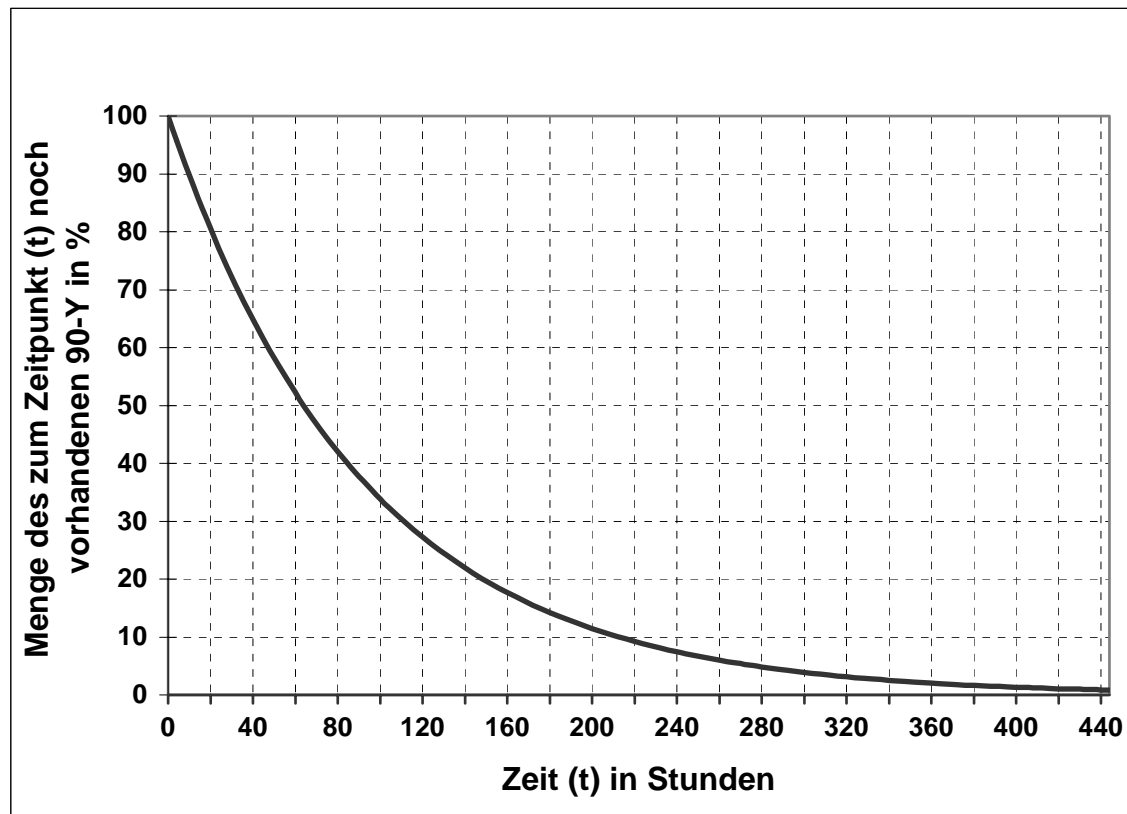


Dadurch ergibt sich für die Elektronen eine maximale

Reichweite von  $R_{\text{MAX}/\text{H}_2\text{O}}=11$  mm in Wasser (das gilt allerdings nicht für die durch die Wechselwirkung der Elektronen mit der Materie entstehende Sekundärstrahlung). Diese Reichweite gilt auch für Gewebe sowie Plastik. Die durchschnittliche Reichweite wird für Gewebe mit  $R_{\text{AVG}/\text{TIS}}=3,6\text{mm}$  angegeben<sup>[59]</sup>.

Die Halbwertszeit von  $^{90}\text{Y}$  beträgt 2.67 Tage (ca. 64h), woraus sich folgende Zerfallsgraphik ergibt:

**Abbildung 6: Zerfallsgraphik von  $^{90}\text{Yttrium}$**



*In der Abbildung ist der radioaktive Zerfall von  $^{90}\text{Yttrium}$  in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.*

### 1.6.2. Biologische Strahlenwirkungen

Für das Ausmaß biologischer Strahlenwirkungen bei gleicher Dosis ist die Strahlenenergie und die Strahlenart von großer Bedeutung. Die Strahlenqualität kann in Form des linearen Energietransfers (LET) beschrieben werden, der die Energieübertragung eines Teilchens bezogen auf seine Wegstrecke (in  $\text{keV}/\mu\text{m}$ ) angibt. Der LET nimmt mit steigender Ladung und sinkender Energie des Teilchens zu. Locker ionisierende Strahlen sind dabei z.B. 250keV-Röntgenstrahlung oder  $\beta$ -Strahlen/Elektronen, dicht ionisierende Strahlen sind z.B. Neutronen, Protonen und  $\alpha$ -Strahlen.

Um verschiedene Strahlenqualitäten vergleichen zu können, ist der Begriff der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) eingeführt worden:

$$\text{RBW} = \frac{\text{Dosis der Vergleichsstrahlung}}{\text{Dosis der untersuchten Strahlung}}$$

Zur Ermittlung der RBW werden solche Strahlendosen der beiden zu untersuchenden Strahlenqualitäten miteinander verglichen, die den biologischen Effekt in gleicher Höhe hervorrufen <sup>[51]</sup>.

#### **1.6.2.1. Strahlenschäden an der DNA**

Zwar ist der primäre physikalische Absorptionsprozess der Strahlenenergie in Hinblick auf die chemische Struktur des getroffenen Moleküls unspezifisch, für die folgenden Reaktionsabläufe (radikalchemische, inter- und intramolekulare Prozesse) ist die Molekülstruktur aber mit entscheidend. Somit weisen Strahlenschäden an der DNA auch folgende typische Veränderungen auf:

- = Kettenbruch: Dabei können eine oder beide Stränge der Polynukleotidstränge unterbrochen werden. Doppelstrangbrüche sind zwar maßgebend für eine eventuelle Zellabtötung, Säugetierzellen können aber auch diesen schweren Strahlenschaden reparieren.
- = Modifizierung oder Eliminierung der Nukleinsäurebasen: Strahlenchemische Reaktionen können so Veränderungen in der Konformation und der Basensequenz der DNA zur Folge haben.
- = Vernetzungen der DNA-Polynukleotidketten: Diese Veränderungen treten

bei höheren Strahlendosen auf. Die mögliche Veränderung der Chromosomen begünstigt einen Schwester-Chromatid-Austausch (sister-chromatide exchange).

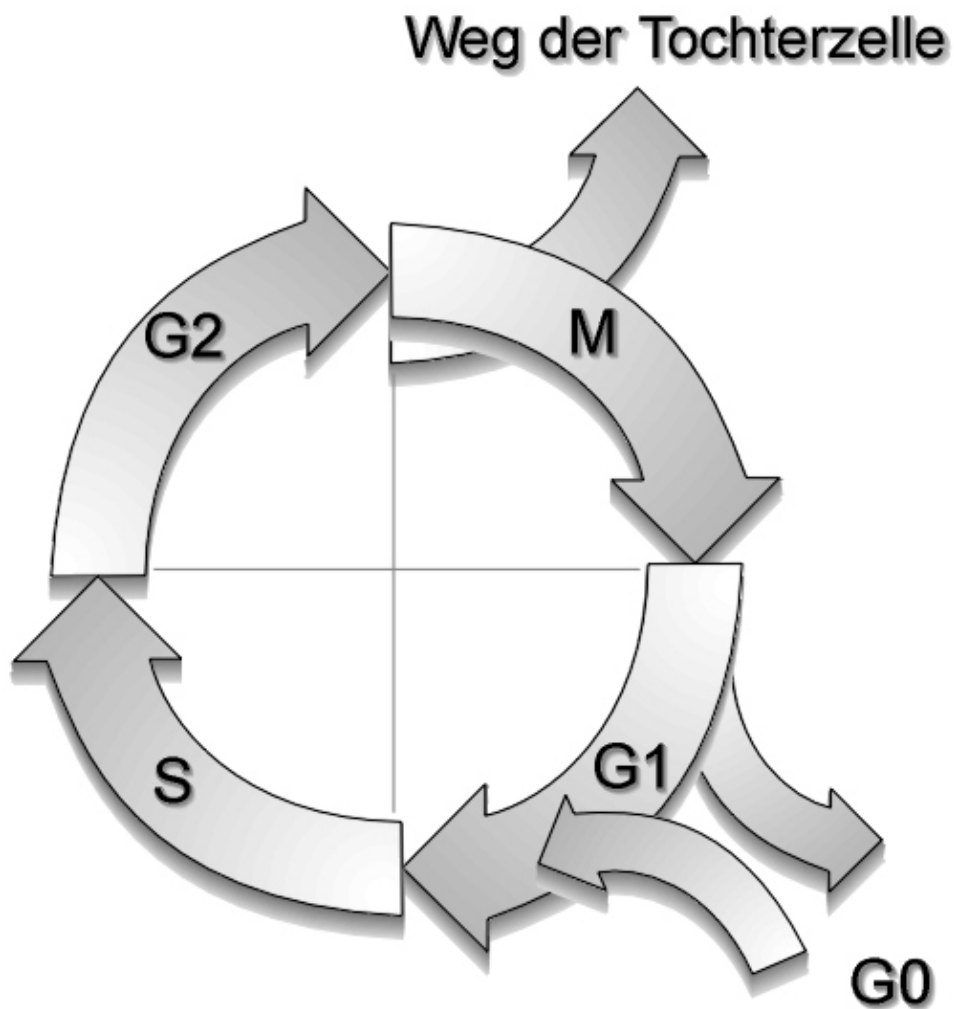
Die DNA von Säugetierzellen unterliegt einem effektiven Schutz von regulierten Reparatursmechanismen. Zumindest in einem Dosisbereich von bis zu etwa 2Gy wird der weitaus überwiegende Teil an DNA-Schäden repariert. In Dosis-Wirkungs-Kurven, bei denen die Koloniebildungsfähigkeit (=klonogene Aktivität) von Zellen als Maß der Überlebensrate halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen wird, zeigt die Graphik in diesen niedrigen Dosisbereichen als Ausdruck von auf DNA-Reparatur beruhenden Erholungsphänomenen typischerweise eine Schulter (=Schulterkurve).

Der Vorgang der DNA-Synthese (= Replikation) scheint allgemein wesentlich strahlenempfindlicher zu sein als die Neubildung von RNA (= Transkription). Zelluläre Strahlenschäden resultieren folglich zunächst in einem reproduktiven, später in einem synthetisierenden Stillstand. Mit erhöhter Proliferation und abnehmender Differenzierung steigt allgemein die Strahlenempfindlichkeit der Zellen an<sup>[52]</sup>. Wenn ein subletaler Schaden (z.B. chromosomale Aberrationen) sich erst bei weiteren Zellzyklusdurchläufen in der Weise weiterentwickelt, dass schließlich der Zelltod eintritt und die Zelle somit aber schon bei der initialen Schädigung die Fähigkeit zur Koloniebildung verloren hat, bezeichnet man diesen Vorgang als *reproduktiven Zelltod* (s.auch 2.3.3.). Im Gegensatz dazu beschreibt der sogenannte *Interphasetod* einer Zelle, dass diese in derselben Interphase (einer Zellzyklusphase, s. auch 1.6.2.2.), in der sie bestrahlt worden ist, stirbt. Letzteres tritt aber meist nur nach Exposition höherer Dosen auf (>10Gy).

### 1.6.2.2. Zellzyklus und ionisierende Strahlung

Lebende Zellen durchlaufen einen Generationszyklus mit unterschiedlichen Phasen. Der Zyklus lässt sich grob in eine Mitose- (=Teilungsphase) und eine Intermitosephase einteilen, wobei die Intermitosephase noch weiter in eine  $G_1$ -, eine S-, und eine  $G_2$ -Phase differenzierbar ist:

Abbildung 7: Schema des Zellzyklus-Phasenverlaufs



*Das Schema skizziert die Abfolge der verschiedenen Phasen im Generationszyklus einer Säugetierzelle.*



Während der  $G_1$ -Phase findet vor allem das Wachstum der Zellen und die Enzymsynthese für die Vorbereitung der DNA-Synthese statt. Der DNA-Gehalt der Zelle bleibt jedoch konstant.

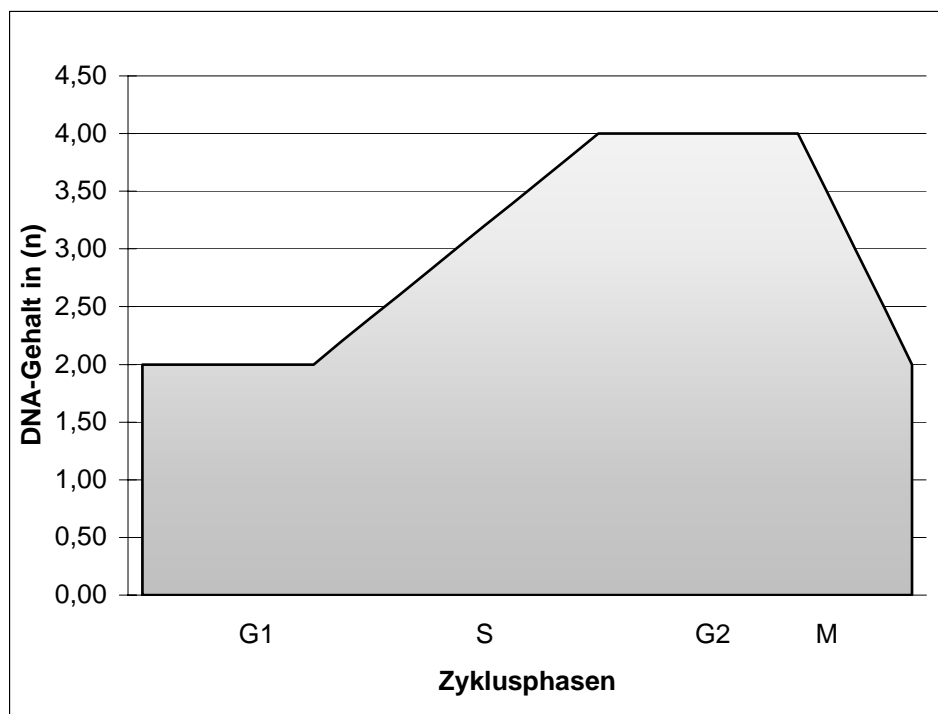
In der  $G_2$ -Phase wird insbesondere durch Protein- und RNA-Synthese die Mitosephase vorbereitet.

Im Laufe der S-Phase wird der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt, es wird also eine Replikation des gesamten Genoms durchgeführt.

Nach der Mitose hat jede Tochterzelle wieder den einfachen DNA-Gehalt in Form des diploiden Ein-Chromatid-Chromosomensatzes.

Sich differenzierende Zellen, die nicht Teil der proliferierenden Fraktion sind, können aus der  $G_1$ -Phase in die sog.  $G_0$ -Phase übertreten, einen Zustand der Teilungsrufe <sup>[53]</sup>.

**Abbildung 8: DNA-Gehalt während des Zellzyklus**



Die Abbildung verdeutlicht den wechselnden Gehalt an DNA einer Zelle während der verschiedenen Phasen des Generationszyklus. Ein DNA-Gehalt von  $2n$ , wie er in der  $G_1$  Phase auftritt, entspricht dabei einem diploiden Ein-

*Chromatid-Chromosomensatz, ein DNA-Gehalt von  $4n$  (in der  $G_2$ -Phase) demjenigen eines diploiden Zwei-Chromatid-Chromosomensatzes.*

Bei der Proliferationskinetik einer Zellkultur ist die Zellpopulation in bezug auf ihre Zyklusphasenverteilung zeitlich asynchron. Unter diesen optimalisierten Bedingungen einer Zellkultur, bei der die Wachstumsfraktion der Zellen (dies entspricht dem proliferierenden Anteil) maximal ist, verdoppelt sich die Zahl der verwendeten haSMCs innerhalb der mittleren Generationszeit; die Zellzahlzunahme ist, solange sie nicht durch Kontaktinhibition oder andere limitierende Faktoren gehemmt wird, exponentiell. Für die haSMCs lässt sich somit eine Zellzykluslänge von einem bis zu zwei Tagen ermitteln.

Generell können auf zellulärer Ebene zwei verschiedene Phänomene der Strahlenwirkung unterschieden werden:

- = die Mitoseverzögerung und
- = der Zelltod.

Mit zunehmender Strahlendosis entstehen in verstärktem Maße irreversible Schäden, die zu anomalen Teilungsprozessen und Zytolyse führen. Der Interphasetod tritt in der Regel erst bei Dosen von einigen 10Gy auf. Dabei wird von der Zelle ein „Selbstmordprogramm“ gestartet, bei dem zelleigene Endonukleasen die DNA degradieren und fragmentieren – ein Vorgang, den man auch als Apoptose bezeichnet und der dadurch charakterisiert ist, dass im Gegensatz zur Strahlennekrose keine perizelluläre Entzündungsreaktion im Gewebsverband entsteht.

Bei dem überwiegenden Teil der bestrahlten Zellen wird nach Dosen unter 10Gy mindestens noch eine Zellteilung beobachtet. Die (bei abnehmender Dosis zunehmend reversible) Abnahme der Mitoserate ist auf eine Verlängerung des Generationszyklus zurückzuführen, welcher wiederum in einer unterschiedlichen Verzögerung einzelner Zellzyklusphasen begründet ist. Es tritt eine Verlängerung der S- und der  $G_1$ -Phase, vor allem aber ein  $G_2$ -Phasenblock auf. Der  $G_2$ -Block wird als eine Phase der Erholung angesehen, bei der Zeit gewonnen wird Strahlenschäden vor der nächsten Mitose zu

reparieren <sup>[54]</sup>. Der Generationszyklus einer Säugetierzelle verfügt dabei über sogenannte Restriktionpunkte oder „checkpoints“. Ist der checkpoint der G<sub>2</sub>/M-Phase einer Zelle zum Zeitpunkt des Bestrahlungsbeginns bereits überschritten, tritt die Zelle unmittelbar in die Mitose ein. Bei einem weiteren checkpoint des Zyklus, an dem es bei vorausgegangenen Schäden zu einem G<sub>1</sub>-Phasenblock kommt, ist das Tumorsuppressorgen p53 maßgeblich beteiligt. Aus den obigen Ausführungen geht also hervor, dass die Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle zu Bestrahlungsbeginn befindet, von großer Bedeutung für die Wirkung der Strahlung ist. An zyklussynchronisierten Zellpopulationen konnte die unterschiedliche Empfindlichkeit von Säugetierzellen auf Strahlung in Bezug auf ihre Generationszyklusphase untersucht werden. Es stellte sich dabei heraus, dass die Überlebensraten der Zellen besonders gering sind, wenn die Bestrahlung während der Mitosephase bzw. während der frühen S-Phase oder der G<sub>2</sub>-Phase vorgenommen wird. Erhöhte Strahlenresistenz konnte hingegen in der späten S- und der frühen G<sub>1</sub>-Phase beobachtet werden. Interessanterweise wird die längste Mitoseverzögerung häufig bei den Zellen beobachtet, die in der späten S-Phase bestrahlt werden, während die Strahlenwirkung auf die *Überlebensraten* in diesem Zyklusteil am geringsten ist <sup>[55]</sup>.

Nach reversibel strahleninduzierter Hemmung von Geweben in vivo kann es zu einer Stimulation der Proliferation kommen, die die Wachstumsgeschwindigkeit der Population vor der Bestrahlung noch übersteigen kann. Die Proliferationsstimulation ist dabei umso größer, je kleiner die Wachstumsfraktion der Zellen vor der Bestrahlung gewesen ist. In diesem Zusammenhang kommt den Zytokinen (v.a. Wachstumsfaktoren und Interleukinen) eine besondere Bedeutung zu <sup>[54]</sup>.

1.6.3. Einflussfaktoren auf die Wirkung ionisierender Strahlen Neben der Strahlenqualität und zelleigenen Parametern (wie Reparationsvermögen und Zellzyklusphase) existieren auch zahlreiche exogene Einflussfaktoren, welche die Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen modifizieren. Diese sind zum einen physikalischer Art:

- = Sauerstoffeffekt: Ausreichend oxygenierte Gewebe sind strahlensensibler als hypoxische Gewebe.
- = Hyperthermie-Effekt: Säugetierzellen reagieren bei Temperaturen über 37°C deutlich strahlenempfindlicher.
- = Dosisfraktionierung: Wird dieselbe Dosis in Intervallen verabreicht, so wird sie von Zellen besser toleriert.

Zum anderen sind für zahlreiche Substanzen teilweise strahlenresistenzsteigernde, teilweise strahlensensibilisierende Effekte beschrieben worden. Bei den sensibilisierenden Substanzen, die z.B. in der Krebstherapie Anwendung finden, handelt es sich unter anderem um Medikamente, die bereits ohne ionisierende Strahlen einen zytotoxischen (und/oder zytostatischen) Effekt aufweisen. Andere Stoffe haben, wenn sie allein appliziert werden, keinen (oder nur einen geringen) Effekt, können aber eine erhebliche Verstärkung der Strahlenwirkung hervorrufen. Eine strenge Definition des Begriffes Sensibilisierung umfasst nur die zuletzt genannte Substanzgruppe, bzw. die Applikation von Substanzmengen, die allein ohne nachweisbare Wirkung ist. Im Folgenden sollen in den Begriff Sensibilisierung aber auch solche Stoffe miteinbezogen werden, die nur zu einem additiven oder subadditiven Effekt in Kombination mit der Bestrahlung führen <sup>[56]</sup>.

## 1.7. Versuchsstrategien

Den durchgeführten Experimenten liegt ein in-vitro Modell des Restenosemechanismus zugrunde, welches den entstehenden proliferativen Prozess in einer Arterienwand nach Perkutaner Transluminaler Angioplastie bzw. Stentimplantation simulieren soll. Als Zellmodell für die Zellkultur dienen dabei humane aortale glatte Muskelzellen, eine Zellart, von der angenommen wird, dass sie bei der Restenoseentwicklung (insbesondere nach Stentimplantation) die vorherrschende Rolle einnimmt.

Die Versuche werden in einem Beobachtungszeitraum von 20 Tagen an proliferierenden haSMCs durchgeführt, die durch die Zugabe 20%igen fetalen Kälberserums zum Nährmedium stimuliert worden sind.

Mit diesem Modell soll einerseits die Situation nach Implantation eines radioaktiven Stents niedriger Aktivität nachgeahmt werden, zum anderen wird die Etablierung einer postinterventionellen Pharmakotherapie in Lang-Zeit-Behandlung simuliert. Als dritte Möglichkeit beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit einer Kombination aus Radio- und Pharmakotherapie.

## 1.8 Fragestellungen

Die oben genannten Entstehungsmechanismen der Restenose und deren Interventionsmöglichkeiten werfen vor dem Hintergrund des verwendeten in-vitro Modells folgende Fragestellungen auf, denen diese Dissertation nachgehen möchte:

- = Welche Wirkung hat Meclofenaminsäure in einer Lowdose Langzeit-Behandlung auf die proliferative Aktivität der verwendeten humanen aortalen glatten Muskelzellen?
- = Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von MFS und der klonogenen Aktivität der haSMCs?
- = Wird der Zellzyklus durch MFS über den Beobachtungszeitraum hinweg verändert?
- = Lassen sich zytoskeletale Veränderungen der Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachweisen?
- = Kann  $^{90}\text{Y}$  das Wachstum der proliferierenden haSMCs im in-vitro Modell hemmen?
- = Wie beeinflusst  $^{90}\text{Y}$  in den applizierten Dosen den Zellzyklus der haSMCs?
- = Zeigt sich eine Dosisabhängigkeit in Bezug auf die klonogene Aktivität der verwendeten glatten Muskelzellen?
- = Gehen die Daten mit den in der Literatur beschriebenen Modellen einher?
- = Existiert eine wechselseitige Beeinflussung von  $^{90}\text{Y}$  und MFS in einer simulierten Kombinationsbehandlung – existieren antagonistische, additive oder überadditive Wirkungen?

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1. Materialien für das Zellkultursystem

#### 2.1.1. Zellen

Alle Versuche werden an humanen aortalen glatten Muskelzellen (haSMC) durchgeführt, die in der 10. Passage von der Firma AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen wurden. Es werden für alle durchgeführten Versuche wegen der besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der angestrebten Gleichheit der Ausgangsbedingungen nur Zellen der 18. und 19. Passage dieses Stammes verwendet.

Die Zellen lagern in Portionen zu ca. 1Mio. haSMCs als 17. Passage eingefroren bei  $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$  in flüssigen Stickstofftanks, bis sie für jeden Versuchsansatz neu aufgetaut und in (bei  $37^{\circ}\text{C}$ ) vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert werden. Das Einfriermedium besteht zu 20% aus FCS, 5% DMSO (Di-methyl-sulfoxid) und Grundmedium (Waymouth und HAM's Nutrient Mixture F-12 im Verhältnis 1:1). Es werden für alle Versuche ebenfalls nur Zellen verwendet, die nach 12h eine Anwachsrate von  $\geq 80\%$  aufweisen. Dabei durchlaufen sie bis zur Verwendung in den Versuchen im Rahmen eines festen Kultivierungsschemas mindestens zwei, höchstens aber drei Passagen. In Vorversuchen wurde ein homogenes Wachstum über weitere acht bis zehn Passagen beobachtet.

#### 2.1.2. Kulturmedium

In Vorversuchen ist diejenige Zusammensetzung des Kulturmediums ermittelt worden, bei der die haSMCs ihr homogenstes Wachstumsverhalten aufweisen. Das jeweils frisch angesetzte Kulturmedium, das zur Ernährung und Neutralisation von Abfallprodukten der Zellen dient, ist für alle Versuche in

derselben Komposition beibehalten worden. Es besteht zu jeweils 40% aus Waymouth- (GIBCO BRL) und Nutrient Mixture F-12 Medium (GIBCO BRL) und zu 20% aus fetalem Kälberserum (FCS, GIBCO, INVITROGEN CORPORATION Karlsruhe, Deutschland). Das FCS enthält u.a. wachstums- und proliferationsstimulierende Hormone sowie Vitamine. Der Nährlösung wird des Weiteren je 1% Streptomycin/Penicillin-Lösung (BIOCHROM KG Berlin; 10000 U / 10000 µg/ml) als Antibiotikum und 1% L-Glutamin (GIBCO BRL) als essentieller und schnell verbrauchender Aminosäure zugesetzt.

### 2.1.3. Trypsin

Das Enzym Trypsin dient der Ablösung der am Kulturfaschenboden adhärent wachsenden Zellen. Trypsin (verwendet wurde Trypsin/EDTA-Lösung, GIBCO BRL) führt dabei zu einer Andauung der Adhäsionsmoleküle, die die Zellen untereinander und mit dem Flaschenboden verankern. Um Schäden an den Zellen zu vermeiden wird die Einwirkzeit des Trypsins möglichst kurz gewählt (2-4 Minuten), bevor es durch Zugabe von Kulturmedium verdünnt und inaktiviert wird. Je dichter der Zellmonolayer und je älter die Zellen desto längere Trypsineinwirkzeiten sind nötig.

### 2.1.4. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Da auch Reste des nach dem Absaugen in der Kulturflasche verbliebenen Mediums das frisch hinzu pipettierte Trypsin in seiner Wirkung beeinträchtigen können, wird die Zellkulturflasche vor der Zugabe des Enzyms mit 5ml PBS (GIBCO BRL) gewaschen <sup>[63]</sup>.

### 2.1.5. Meclofenaminsäure (MFS)

Meclofenaminsäure ist das Medikament aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistka (NSAID), mit dem die Zellen des Zellkultursystems im Rahmen der Simulation einer Prävention der Restenose behandelt werden.



Für die Experimente wird MFS als Pulver von SIGMA bezogen. Es wird eine Lösung von MFS in H<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 10<sup>-2</sup> mol/l angesetzt und nach Passage durch einen 0,22µm Mikroporen-Sterilfilter in Portionen zu ca. 500µl in Eppendorfröhrchen portioniert und bis zur Verwendung im Experiment bei -20°C tiefgefroren.

#### 2.1.6. Das Radionuklid <sup>90</sup>Yttrium

<sup>90</sup>Yttrium ist das Radionuklid, mit dem die haSMCs in den Restenoseexperimenten bestrahlt werden. Über die SCHERING AG Berlin wird dazu von Cis bio international pro Charge 980 MBq/Vial *trägerfreies* <sup>90</sup>Y in 350µl 0,04M HCl bezogen. Unter „trägerfrei“ versteht man eine Substanz, die ausschließlichs aus radioaktiven Atomen besteht. Es ist also nicht von einer Beimengung inaktiver Isotope auszugehen.

Nach Bestimmung der Aktivität unmittelbar vor dem Experiment wird das suspendierte Yttrium mit einem 0,22µm Mikroporenfilter gereinigt und entsprechend mit Kulturmedium verdünnt, so dass eine Zugabe von 100µl zum Kulturmedium einer Kulturflasche einer Applikation von 8Gy entspricht (entsprechend 50µl für 4Gy).

Unter Berücksichtigung der Aktivitätsabnahme mit der Halbwertszeit von <sup>90</sup>Y (2,76d) ist es möglich die Dosis einer Charge an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zu applizieren.

## 2.2. Methoden für das Zellkultursystem

### 2.2.1. Kultivierung / Subkultivierung der haSMC

Alle Arbeitsschritte werden unter einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt, die zuvor für mindestens 30 min mit UV-Licht bestrahlt und deren Ablagen mit 70%igem Alkohol desinfiziert worden sind. Es werden für entsprechende Arbeitsschritte ausschließlich sterile Einmalpipetten verwendet.

Am ersten und vierten Tag nach Neuaussaat oder der letzten Passage der Zellen (Tag der Aussaat bzw. Passage = Tag 0) wird ein Medienwechsel (MW) vorgenommen und am 7. Tag wird eine Subkultivierung (= Passage) durchgeführt um Zellkonfluenz zu vermeiden, da in einem solchen Falle die Kapazität des Mediums überschritten werden würde und sich ferner die Zellen durch Kontaktinhibition an der weiteren Vermehrung hindern.

Zur Routine-Passage werden jeweils 200.000 Zellen in 5ml Medium in eine 25cm<sup>2</sup> große Kulturflasche (Falcon, BD Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Die Zellkulturen werden in Brutschränken (Heraeus, Osterode, Deutschland) bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer Feuchtigkeit von >95% bebrütet. Zur Passage wird das Medium abgesaugt, die Zellkulturflasche mit 5ml PBS gewaschen und 1ml Trypsin hinzu pipettiert. Nach 2-4 minütiger Inkubation bei 37°C (je nach Alter und Wachstumsdichte der Zellen) haben sich SMCs in der Regel als Einzelzellsuspension vom Flaschenboden gelöst, werden in 5 ml Medium resuspendiert und ein Teilvolumen (in der Regel 100 µl) zur Zellzahlbestimmung mittels einer elektronischen Zählhilfe (Coulter Particle Counter, Coulter®, USA) entnommen.

## 2.3. Methoden der einzelnen Versuche

### 2.3.1. Proliferationskinetik (PK) der MFS-Dauerbehandlung

Eine PK wird angesetzt um die Vermehrungsgeschwindigkeit und die Höhe des erreichten Plateaus (sie entspricht der maximal erreichten Zelldichte) der behandelten haSMC-Kultur zu untersuchen.

Für die Proliferationskinetik werden pro Kulturflasche (mit 25cm<sup>2</sup> Bodenfläche) an „Tag -2“ 30.000 Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät und danach sofort bei 37°C inkubiert. An Tag 0 wird dann die Ausgangszellzahl zur Kontrolle (d0) bestimmt und ein Medienwechsel bei allen Flaschen vorgenommen, wobei bei den Experimenten zur Dauerbehandlung mit MFS über eine Verdünnungsreihe Medikamentenkonzentrationen zu 10µM, 25µM, 50µM, 100µM und 200µM im Kulturmedium für die verschiedenen Untersuchungsbedingungen angesetzt werden.

An den Tagen 4, 8, 12, 16 und 20 erfolgt die Zellzahlbestimmung in den Kulturflaschen. Dazu wird die Zellzahl einer Kulturflasche aus einer Konzentrationsgruppe bestimmt und bei den jeweils verbleibenden Kulturflaschen ein Medienwechsel vorgenommen (unter Beibehaltung der jeweiligen Medikamentenkonzentrationen im Medium).

### 2.3.2. Proliferationskinetik (PK) der Versuche mit <sup>90</sup>Yttrium

Analog zu den Versuchen zur Dauerbehandlung mit MFS wird der gleiche Algorithmus bis Tag 0 beibehalten. Sechs bis acht Stunden vor Zugabe des <sup>90</sup>Y (an Tag 0) wird ein Medienwechsel durchgeführt, wobei die einzelnen Kulturflaschen entsprechend der geplanten Versuchsbedingungen Medien mit den verschiedenen MFS-Konzentrationen erhalten. Aus dosimetrischen Gründen (die kleinste von MIRDOSE zu berechnende Volumendosis bezieht sich auf eine Kugel mit dem Durchmesser von 2,6 mm (s. 2.3.5.)) werden statt 5ml

Medium 6,2ml hinzu pipettiert, so dass das Medium einen Quader der Dicke von 2,6mm über dem Zellmonolayer bildet.

An Tag 4 wird ein Medienwechsel durchgeführt, wobei nach Abpipettieren des alten Mediums zweimal mit 7 ml PBS gewaschen wird um die verbleibende Restaktivität in zurückgebliebenen Medienresten mit zu entfernen. Aus dem gleichen Grund erfolgt (an Tag 8) ebenfalls noch ein Waschwischenschritt während des Medienwechsels.

Die radioaktiven Kulturen werden in einem separaten Brutschrank inkubiert um die Kontrollen nicht zu beeinflussen. Um die gegenseitige Beeinflussung der radioaktiv strahlenden Kulturen während der Inkubationszeit zu minimieren werden sie in Portionen zu je vier Flaschen in 17mm Wanddicke messenden Plexiglasbehältnissen aufbewahrt.

### 2.3.3. Kolonie-Bildungs-Assay (KoBi)

Ein Kolonie-Bildungs-Assay ist ein Maß für die sogenannte *klonogene Aktivität* der zu untersuchenden Zellen. Es lassen sich damit Aussagen über die Proliferationsfähigkeit von Zellen machen. Ein KoBi ist in Bezug auf das veränderte Wachstumsverhalten von durch eine Noxe geschädigten Zellen ein empfindlicherer Test als die Proliferationskinetik.

Für alle Versuche werden an den Tagen 4, 12 und 20 KoBis angesetzt. Dazu werden in jede Vertiefung einer 6-well-Platte (Multiwell TM, FALCON, Becton Dickinson) je 500 Zellen in 2 ml Nährmedium ausgesät und für 10 Tage inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für je ca. 10 Minuten mit 3,7%iger Formaldehydlösung und anschließend 70%igem Ethanol fixiert. Nach den Trocknen schließt sich dann eine Färbung mit Coomassie an, um den Assay mikroskopisch auswerten zu können. Als eine Zellkolonie wird bei der Auswertung eine aus einer Zelle hervorgegangene Ansammlung von 50 Zellenklonen definiert. Konglomerate von weniger als 50 Zellen gelten als subletal geschädigt und werden nicht gezählt (s.a. 1.6.2.1.).

Aus dem Quotienten der Zahl der Kolonien der Kontrolle ( $=K_0$ ) und der Zahl aller ausgesäten Zellen zu Beginn der Inkubation erhält man die sog. „plating efficiency (PE)“, die dem Anteil an klonogenen Zellen ohne Behandlung entspricht:

$$PE = \frac{\text{Zahl der Kolonien}}{\text{Zahl der Zellen zu Beginn der Inkubation}}$$

Die plating efficiency kann als Bezugspunkt für die Kolonienzahl der behandelten Versuchsansätze dienen.

#### 2.3.4. Migrations-Assay

Ein Migrations-Assay untersucht die Eigenschaft von Zellen sich gerichtet bewegen zu können. Bei dem Experiment wird das Durchwandern einer mit  $8\mu\text{m}$  Porendurchmesser perforierten Membran dargestellt.

Dazu werden Membraneinsätze (FALCON) mit einer Wachstumsfläche von  $0,31\text{cm}^2$  verwendet, die in je eine Vertiefung einer 24-well Compound-Platte (FALCON, Beckton Dickinson) gehängt werden können.

##### **Abbildung 9: Membraneinsatz des Migrations-Assays**

*Der Boden des Bechers ist mit einer Membran überzogen, die Poren mit  $8\mu\text{m}$  Durchmesser besitzt. Der Unterboden, bzw. die Membran selbst hat einen Durchmesser von  $1\text{cm}$ , der Becher ist  $1,7\text{cm}$  hoch.*



Die Membraneinsätze werden mit je  $500\mu\text{l}$  einer Zellsuspension befüllt, die  $310.000$  Zellen/ml enthält. In das Kompartiment unterhalb des Membraneinsatzes (bzw. um den Einsatz herum) werden  $800\mu\text{l}$  normales Nährmedium (20% FCS) oder PDGF-BB -angereichertes Medium ( $20\text{ng/ml}$ )

Endkonzentration) pipettiert. PDGF (Platelet-derived-growth-factor) ist einer der stärksten Migrationsstimulatoren für haSMCs. Danach werden die 24-well-Platten für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wandern einige Zellen durch die Poren des Membraneinsatzes und heften sich an dessen Außenseite an. Anschließend werden die Einsätze herausgenommen, die Membraninnenseiten zweimal mit einem Q-Tip von den verbliebenen Zellen befreit und mit PBS gewaschen und die an die Membranaußenseite migrierten Zellen durch je 10minütiges Fixieren in 3,7%igem Formaldehyd und 70%igem Ethanol zur anschließenden Coomassie- und Giemsa-Doppelfärbung vorbereitet.

Zur mikroskopischen Auswertung des Assays werden die Membraneinsätze auf das Quadratraster einer FUCHS-ROSENTHAL Zählkammer gestellt und die mittlere Zahl der pro  $\text{mm}^2$  Membranfläche migrierten Zellen bestimmt.

### 2.3.5. Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt

#### 2.3.5.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Im Rahmen der Restenoseexperimente werden an den behandelten haSMCs durchflusszytometrische 2-Parameter-Messungen durchgeführt um eventuelle Auswirkungen der radioaktiven Strahlung des  $^{90}\text{Y}$  oder der MFS-Behandlung bzw. ihrer Behandlungskombinationen auf den Zellzyklus aufzeigen zu können. Crissman et al. <sup>[64]</sup> entwickelten 1975 die sogenannte Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting), eine Methode zur Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Säugetierzellen, die sich die Eigenschaften der Fluoreszenz zu Nutze macht. Fluoreszenz beschreibt das Phänomen, dass bestimmte chemische Verbindungen, nachdem sie durch Anregung (z.B. mittels eines Lasers) auf ein höheres Energieniveau gehoben worden sind, bei ihrem Übergang in den Grundzustand einen diskreten Teil des Energieunterschiedes in Form von Licht aussenden, das gemessen werden

kann. Zur Zellzyklusanalyse wird dabei einerseits die fluoreszierende Substanz Propidiumjodid verwendet, die unspezifisch mit DNA interkaliert und mit der sich der Gesamtgehalt an zellulärer DNA darstellen lässt und andererseits fluoreszierende sekundäre Antikörper gegen primäre Antikörper, die an 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) binden, einer Substanz, die als Thymidinanalogon nur in neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Der Anti-BrdU-Antikörper ist dabei ein monoklonaler Maus-IgG-AK (BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, NY, USA) und der zweite AK ein monoklonaler Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK (Fa. DAKO, Hamburg, Germany), der mit Fluorescein-Isothiocyanat markiert ist.

#### **2.3.5.2. Methodik der Durchflusszytometrie**

Für die FACS-Analyse werden pro Kulturflasche (mit 25cm<sup>2</sup> Bodenfläche) an „Tag -2“ 100.000 Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät und danach sofort bei 37°C inkubiert.

Die zu untersuchenden Zellkulturen werden an dem jeweiligen Versuchstag (Tag 4, 12 und 20) eine Stunde lang mit jeweils 10µl 10mM BrdU-Lösung im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Lösung abpipettiert, die Zellen abtrypsiniert, resuspendiert und zweimal mit PBS bei 200g für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Bodensatz wird anschließend in 250µl 70%igem Ethanol resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Vor der flusszytometrischen Messung werden die Zellen mit 3ml PBS resuspendiert, mit 275•g für sechs Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin folgt eine Inkubation mit 1ml RNAse (0,1 mg/ml) für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C, ein erneuter Waschschrift mit PBS und eine Zentrifugation für 6 Minuten. Im Anschluss daran werden die haSMCs mit 1 ml Pepsin (350 FIP-Units/ml) für 10 Minuten in ein Wasserbad (37°C) und danach zum Stoppen der enzymatischen Verdauung für 5 Minuten bei 0°C auf Eis gestellt. Nach erneutem Waschen mit PBS und Zentrifugation werden die Zellen mit 1ml 2M HCl für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es schließen sich zwei Waschschriffe mit jeweiliger Zentrifugation an. Danach werden 200µl der

ersten AK-Suspension auf die Proben pipettiert und diese bei Raumtemperatur und Lichtabschluss für 30 Minuten aufbewahrt. Als Negativkontrolle wird bei einer Probe eine unspezifische Antikörperkontrolle verwendet. Später erfolgt wieder ein Waschschrift und eine Zentrifugation. Im Anschluss werden 200µl der zweiten AK-Suspension unter gleichen Bedingungen auf die Proben gegeben. Es schließt sich ein Waschschrift mit 500µl Propidiumjodid-Lösung (10µg/ml) und Zentrifugation an. Als nächstes wird mit 200-500µl (abhängig von der Anzahl der Zellkerne) Propidiumjodid-RNase unter Lichtabschluss für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Durch diese Schritte werden die Zellkerne isoliert, das in die DNA eingebaute BrdU indirekt mit FITC (Fluorescein – Isothiocyanat) Kaninchen-Anti-Maus AK markiert und die DNA durch Propidiumjodid angefärbt.

Die sich anschließende Messung erfolgt an einem FACSort-Gerät (Becton Dickinson) mit dem Zellanalyseprogramm *CELL-Quest 1.1.1.™*, wobei  $10^4$  Zellkerne mit einer Flussgeschwindigkeit von 150 Kerne/sec gemessen werden.

### 2.3.6. Dosisschätzung

Die Abschätzung der Gesamtdosis, der die Zellen in dem mit  $^{90}\text{Y}$  angereicherten Kulturmedium exponiert sind, erfolgt mit Hilfe des Programms MIRDSE 3.1. <sup>[65]</sup>. Das sogenannte MIRD Konzept (= Medical Internal Radiation Dosimetry), welches den Berechnungen des Programms zugrunde liegt, ist ursprünglich für die Kalkulation von Organdosen entwickelt worden, so dass einige Veränderungen zur Adaptation an die in vitro Bedingungen vorgenommen werden müssen. Somit wird im Folgenden angenommen, dass die Zielvolumendosis, die auf den Zellmonolayer appliziert wird, 50% der Eigendosis des überstehenden  $^{90}\text{Y}$ trium-haltigen Kulturmediums entspricht. Dies trifft weitgehend unter der Bedingung zu, dass eine homogene Verteilung des Radionuklides im Kulturmedium vorliegt. Durch Verwendung ungebundenen, trägerfreien  $^{90}\text{Y}$ triums ist nicht von einer Sedimentation des Nuklids auszugehen und somit diese Annahme gerechtfertigt. Das Volumen des



radioaktiv angereicherten Kulturmediums stellt ferner einen Quader der Kantenlängen 2,67mm x 53mm x 47mm dar, so dass die den haSMCs während eines Zeitraums von von 4 Tagen applizierte Zielvolumendosis 0,74 Gy pro MBq beträgt. Für die verwendeten Dosisgruppen von 4 und 8 Gy ergibt dies entsprechend:

**Tabelle 1: Umrechnung der Anfangsaktivitäten des <sup>90</sup>Y in der Suspension des Kulturmediums nach dem MIR-Dose-Konzept**

Aktivität in MBq	Umgerechnet in Gy nach MIR-Dose	Gerundete Werte in Gy
5,5	4,07	4
11	8,14	8

*Die Tabelle zeigt in der linken Spalte die Anfangsaktivitäten der einzelnen Gruppen in Megabequerel, in der mittleren Spalte die nach dem MIR-Dose-Konzept berechneten Dosiswerte (nach einer Bestrahlungszeit von 4 Tagen) und in der rechten Spalte die gerundeten, in der Diskussion verwendeten Dosiswerte.*

### 2.3.7. Immunfluoreszenz-Färbungen

Immunfluoreszenz-Färbungen der mit MFS behandelten haSMCs mit AK gegen Vimentin und  $\alpha$ -Aktin werden angefertigt um eventuelle mikroskopische Veränderungen des Cytoskeletts aufzuzeigen.

Als Träger dienen in 6-well-Platten eingebrachte Deckgläser mit 80.000 Zellen pro well, die für 4 Tage in 2 ml Medium oder 50 $\mu$ M MFS-enthaltenem Medium inkubiert werden.

Anschließend wird das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser werden mit den auf ihnen angewachsenen Zellen zehn Minuten in Methanol bei -20°C fixiert. Nach folgenden zwei weiteren Waschschritten mit PBS wird 8  $\mu$ l der Lösung des ersten Antikörpers (Maus-anti- $\alpha$ -Actin oder Maus-anti-Vimentin) in 150 $\mu$ l PBS hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C

inkubiert. Anschließend erfolgt wieder ein zweimaliges Waschen mit PBS und Zugabe von 1µl des in 150µl PBS gelösten 2. Antikörper (anti-Maus-Alexa 488) und ebenfalls eine Inkubation für 30 Min. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit PBS können die Deckgläser auf einen mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium + DAPI (Vector, Burlingame) versehenen Objektträger aufgebracht und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1. Übersicht

#### 3.1.1. Proliferationskinetik

Die Auswertung der Proliferationskinetik umfasst drei Ansätze mit insgesamt 54 Messreihen. Ein Ansatz ( $V_1$ ) entfällt dabei auf die Behandlung mit MFS in Niedrigdosis-Konzentrationen (10-50 $\mu$ M), der zweite ( $V_2$ ) auf die Versuchsreihen mit 4Gy und 8Gy, 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M MFS und deren Kombinationen mit MFS (50-200 $\mu$ M) und der dritte Ansatz ( $V_3$ ) auf die 2Gy-Gruppen und deren Kombination mit MFS (50-200 $\mu$ M).

Pro Messreihe werden an jedem Messtag Dreifachbestimmungen der einzelnen Versuchsbedingungen (inklusive Kontrolle) durchgeführt, sodass auf den Ansatz  $V_1=12$  Messreihen, auf den Ansatz  $V_2=27$  Messreihen und auf den Ansatz  $V_3=15$  Messreihen fallen.

Die Mittelwerte der Zellzahlen an Tag 0 (zu Behandlungsbeginn) schwanken dabei zwischen 42.933 ( $\pm 2.370$ ) bei  $V_3$  und 65.067 ( $\pm 21.749$ ), die Zellzahlen der Kontrollwerte an Tag 20 zwischen 1.069.367 ( $\pm 47.431$ ) bei  $V_3$  und 1.822.875 ( $\pm 117.896$ ) bei  $V_2$ .

#### 3.1.2. Koloniebildungsassays

Die Auswertung der Koloniebildungsassays setzt sich ebenfalls aus 3 Ansätzen mit 15 Messreihen zusammen, sodass sie mit Bezug zur Proliferationskinetik interpretiert werden kann. Jede der durch die PK untersuchten Versuchsbedingungen wurde auch auf die klonogene Aktivität hin untersucht. Die klonogene Aktivität der einzelnen Ansätze schwankt dabei zwischen 64,4 Kolonien der Kontrollen an Tag 4 bei Ansatz 3 und 79,5 Kolonien bei Ansatz 1.

### 3.1.3. Zellzyklusanalyse

Die Daten zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometer rekrutieren sich aus 2 Ansätzen mit 48 Messreihen. Davon entfallen 18 Messreihen auf die Experimente mit den verschiedenen Konzentrationen an MFS (0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M) und 30 Messreihen auf die 4Gy und 8Gy Gruppe und deren Kombinationen mit MFS (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M MFS).

### 3.1.4. Migrationsassays

Die Experimente zum gerichteten Bewegungsverhalten der FCS-stimulierten SMCs setzen sich aus zwei Ansätzen mit Dreifachbestimmungen jeder Versuchsbedingung zusammen, die jeweils Doppelmessungen darstellen. Sie wurden als Ansatz 1 an Tag 4 für 0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25; und 50 $\mu$ M und als Ansatz 2 an Tag 4 für 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M MFS, für 2Gy, 4Gy und 8Gy, sowie für Kombinationen von 200 $\mu$ M MFS und 2Gy, 4Gy und 8Gy durchgeführt.

<b><u>Tabelle 2: Schwankungsbreite zwischen den Ansätzen</u></b>			
	<b>Ansatz 1</b>	<b>Ansatz 2</b>	<b>Ansatz 3</b>
Maximale Zellzahl der Ko an d20	1325100	1822875	1069367
Kolonien der Kontrolle an d4	79,5	73,2	64,4
Zellzyklusanteile der Kontrolle an d4	G <sub>1</sub> :74,86 G <sub>2</sub> /M:11,62 S:12,83	G <sub>1</sub> :85,44 G <sub>2</sub> /M: 9,14 S: 4,92	-
Migrierte Zellen der Kontrolle pro mm <sup>2</sup> (+PDGF)	78,2	118,5	-

**Tabelle 3: Übersicht über die Messungen in den Versuchsreihen**

Ansatz	Dosis in Gy / Konz in µM	Zellzahl Tag 0	PK	KOBI	FACS	MIGR
1	0/0	60533	✓	✓	✓	✓
	0/10		✓	✓	✓	✓
	0/25		✓	✓	✓	✓
	0/50		✓	✓	✓	✓
2	0/100	65067	✓	✓	✓	✓
	0/200		✓	✓	✓	✓
	0/0		✓	✓	✓	✓
	4/0		✓	✓	✓	✓
	4/50		✓	✓	✓	-
	4/100		✓	✓	✓	-
	4/200		✓	✓	✓	✓
	8/0		✓	✓	✓	✓
	8/50		✓	✓	✓	-
	8/100		✓	✓	✓	-
	8/200		✓	✓	✓	✓
	3		0/0	42933	✓	✓
2/0		✓	✓		-	✓
2/50		✓	✓		-	-
2/100		✓	✓		-	-
2/200		✓	✓		-	✓

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der durchgeführten Experimente sowie die Zellzahlen der einzelnen Ansätze an Tag 0.

## 3.2. Ergebnisse der Proliferationskinetik

### 3.2.1. PK der Einzelbehandlung mit MFS

#### Darstellung und Statistik

Während der Erstellung der Graphiken für die Proliferationskinetik ist ein rechnerisches Modell zur Erklärung des Wachstumsverhaltens der Zellen entstanden, das ca. 99 Prozent der Beobachtungen einschließt. Demnach kann das Wachstumsverhalten der Zellen nach Exposition (mit MFS und/oder  $\beta$ -Strahlen) in Form einer sigmoiden Kurve mit Wendepunkt und Plateau-Bildung beschrieben werden, die folgender mathematischen Gesetzmäßigkeit folgt:

$$y = c_0 + \frac{c_1 - c_0}{1 + \left[ \frac{T}{t} \right]^b}$$

Der Faktor „ $c_1$ “ für ceiling wurde eingeführt, da die Kurvenverläufe im Rahmen der Plateaubildung nicht zwingend gegen eins (bzw. 100%) streben müssen, sondern die Darstellung auch dem beobachteten Sättigungsverhalten bei niedrigeren Prozentzahlen nach Exposition Rechnung tragen kann. Der Faktor „ $T$ “ charakterisiert die Stelle (bzw. den Zeitpunkt) des Wendepunkts der Kurven, das heißt den Umschlagspunkt vom beschleunigten zum gebremsten Wachstum; die Variable „ $b$ “ in der Formel besitzt einen stets zur Steigung im Wendepunkt proportionalen Wert. Durch die Einführung der Formel lassen sich nun Werte für beliebig kleine Zeitabschnitte zwischen den einzelnen Messtagen rechnerisch ermitteln sowie die Kurvenverläufe jenseits des zwanzigtägigen Beobachtungszeitraums abschätzen.

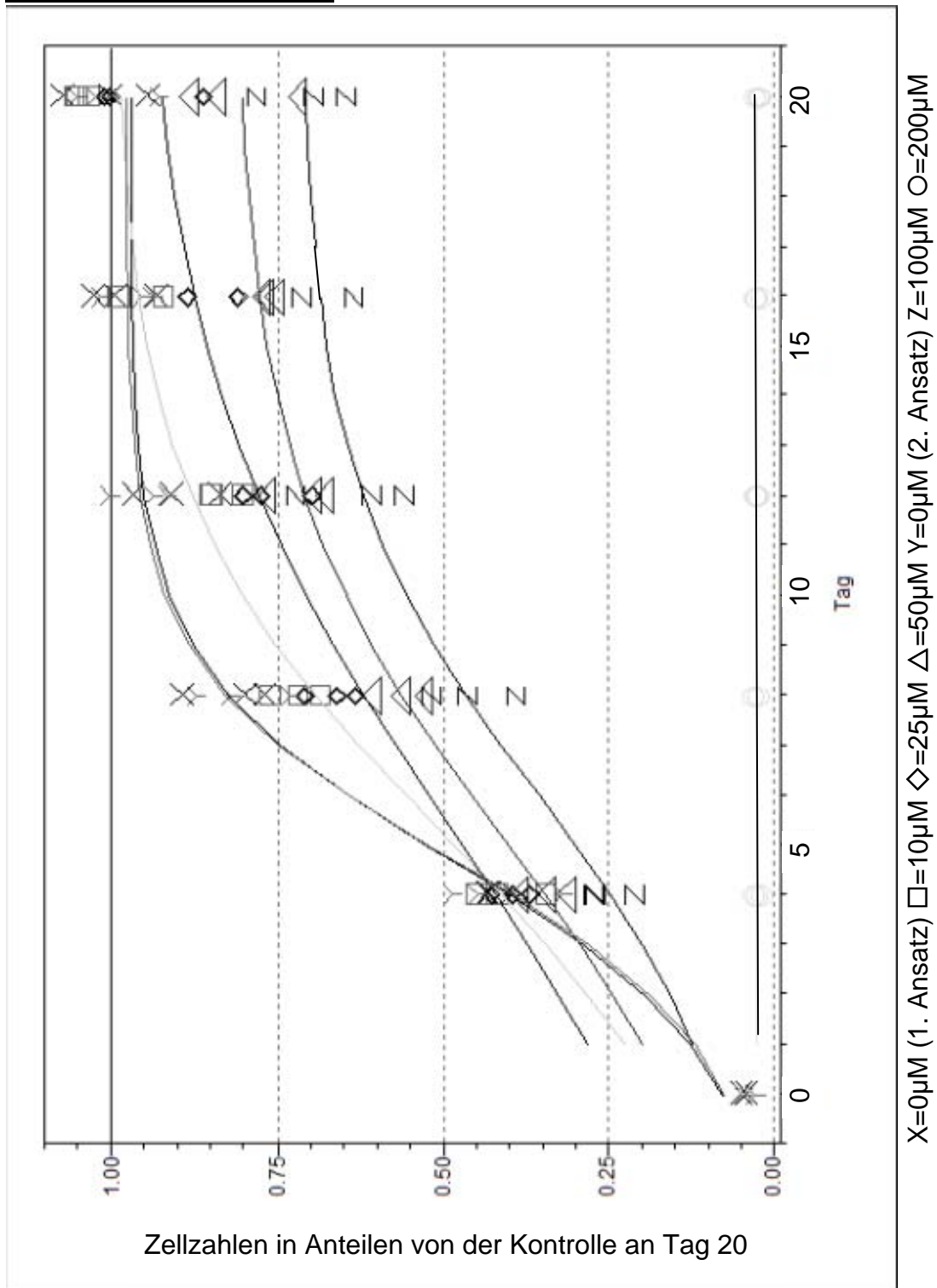
Bis zu Tag 0 ist der Anzuchtalgorithmus für alle Versuchsgruppen identisch durchgeführt worden, was man in den minimalen Schwankungen der einzelnen Versuchsreihen bis zu diesem Zeitpunkt bestätigt sieht. Im Kurvenverlaufsmodell findet dies nur am Rande Berücksichtigung, obwohl der Faktor  $c_0$  als Konstante den auf die Maximalzellzahl bezogenen geometrischen

Mittelwert darstellt. Vereinzelt Abweichungen der Wertedarstellung an Tag 0 kommen dadurch zustande, dass hierbei der Modellvorhersage bzw. dem Kurvenverlaufsmodell nachgegeben worden ist.

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen an den einzelnen Tagen ist der Tukey-Kramer-Test eingesetzt worden. Dazu sind die Rohwerte zuvor logarithmiert und als Relativwerte dargestellt worden, indem von ihnen der logarithmierte Wert der Kontrollzellzahl subtrahiert worden ist („DiffLog-Werte“).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art ist mit  $\alpha=0,05$  festgelegt worden.

**Abbildung 10: Wachstumskurven der haSMCs unter verschiedenen Konzentrationen mit MFS**



Die Abbildung zeigt die Relativwerte der absoluten Wachstumszahlen der mit verschiedenen Konzentrationen von MFS behandelten Zellen über einen Zeitraum von 20 Tagen. Obwohl sich die Kurvenverläufe für die Kontrolle des ersten und derjenigen des zweiten Ansatzes kaum unterscheiden, sind sie



*beide als Bezugskurven für die ihnen zugehörigen Versuchsreihen mit in die Zeichnung aufgenommen worden. In allen Versuchsreihen mit Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit 200µM MFS konnten die Graphenverläufe als Gerade dargestellt werden (daher existieren die Parameter  $c_1$ ,  $T$  und  $b$  für diese Gruppe nicht).*

Die Wachstumskurven geben für Konzentrationen von 0µM bis 100µM die typische Form einer proliferierenden Zellpopulation wieder, die durch einen steilen, also schnell wachsenden Anfangsteil gekennzeichnet ist, der in eine Plateau-Phase mündet, in der das Zellwachstum in ein dynamisches Gleichgewicht übergeht und die Netto-Zahlen um einen Endwert schwanken. Dieses Gleichgewicht ist erreicht, wenn die Proliferation der Zellen durch Kontaktinhibition gedrosselt ist, oder sich die Vermehrungskapazität aufgrund einwirkender Noxen erschöpft. Diese Phasen fallen in der Proliferationskinetik für die Wachstumskurven der Kontrolle (0µM) und für die Konzentrationen bis 100µM zeitlich in etwa zusammen. Die steile, stark proliferative Phase hält bis Tag 8 an, durchläuft ein Übergangsstadium mit abnehmender Wachstumsgeschwindigkeit (bis Tag 12) und mündet bis Tag 20 überall in einen deutlich flacheren Kurvenverlauf.

Man erkennt ferner leicht, dass die erreichten Plateau-Zellzahlen mit zunehmender Konzentration auf einem zunehmend niedrigeren Niveau liegen. Entsprechend sind auch die Anstiegssteilheiten in der Anfangsphase mit steigender Konzentration geringer. Eine Ausnahme bildet der (geometrische Mittel-)Wert von 10µM an Tag 20, der denjenigen der Kontrollgruppe übersteigt. In der Regel durchlaufen stimulierte Zellen nach dem Passagieren bzw. Aussäen eine Phase des verzögerten und des verlangsamten Wachstums (sog. „lag-Phase“), die mit dem ihnen ausgesetzten Stress bei der Passage und der Adapatation an die neuen Kulturbedingungen erklärt wird. Da die Zellen in diesen Versuchen bereits an Tag -2 ausgesät worden sind, haben sie diese Phase zum Zeitpunkt der Zugabe von MFS zum Medium (an Tag 0) schon zum größten Teil durchlaufen und befinden sich im Übergang zu einem maximal stimulierten Zustand.

Bei der Kontrolle, bei 10µM und bei 25µM ist an Tag 12 ein leichter Einbruch der Zellzahlen feststellbar, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass

zu diesen Zeitpunkt schon über eine Million Zellen pro Kulturflasche vorhanden sind, und diese noch sehr stark proliferieren. Das Kulturmedium, das zuvor an Tag 8 gewechselt worden ist, könnte hierbei zum limitierenden Faktor geworden sein und den Zellen nicht mehr genügend Nährstoffe zur Verfügung stellen bzw. nicht in einem ausreichenden Maße die anfallenden Abfallstoffe abfangen und aufnehmen.

Die mit 200 $\mu$ M behandelten Zellen zeigen keinerlei Zunahme der Zellzahl über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg. Ihr Wachstumskurvenverlauf kann durch eine einfache Gerade dargestellt werden. Das Nährmedium der Kulturflaschen, die mit 200 $\mu$ M MFS behandelte Zellen enthielten, ließ anhand des deutlich in den roten Bereich umschlagenden Indikators des Mediums die Verschiebung in den basischen Bereich des Milieus erkennen. Die Kontrollzellen hingegen färbten durch die Entstehung saurer Stoffwechselmetaboliten aufgrund ihres regen Wachstumsverhaltens das Medium hell gelb, was eine Verschiebung in den sauren Bereich anzeigt.

Aus den Mittelwerten der Kontroll-Zellzahlen der drei Ansätze von Tag 0 ( $56.178 \pm 11.692$ ) und Tag 20 ( $1.405.781 \pm 383.178$ ) lässt sich ableiten, dass die Zellen mit Wachstumsraten von ca. 25-facher Zellzahlsteigerung sich in diesem zwanzigtägigen Beobachtungszeitraum ungefähr 4 ( $2^4=16$ -fach) bis 5 ( $2^5=32$ -fach) mal teilen. Daraus kann man im Mittel unter diesen Kulturbedingungen für haSMCs von einer Generationszeit, d.h. der Dauer für einen Durchlauf des Zellzyklus von 4-5 Tagen ausgehen. Drei bis vier Teilungen finden davon in den ersten 4 Tagen statt (Wachstumsrate der Kontrolle d0-d4 ca. 10). Die Zellen proliferieren also initial mit einer Generationszeit von 1 bis 1,3 Tagen. Sie erreichen dann in der Phase des Wachstumsgleichgewichts auf dem Boden der 25cm<sup>2</sup> messenden Kulturflasche eine Dichte von ca. 56.231 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Zellen der 100 $\mu$ M Gruppe erreichen ihr Plateau schon bei 71% der Plateauwerte der Kontrollzellen, die Messreihe der 200 $\mu$ M Experimente pendelt um Werte von im Mittel ca. 51.400 Zellen pro Flasche.

Das Niveau der Wachstumsraten ist bei den Gruppen mit niedrigen Konzentrationen (10 $\mu$ M und 25 $\mu$ M) gegen Ende der Kinetik noch relativ hoch.

Somit besitzt die 10 $\mu$ M Gruppe für die Wachstumsraten zwischen Tag 12 und Tag 16 im Vergleich zu den anderen Gruppen den größten Wert. Das Gleiche gilt für das Beobachtungsintervall von d16-d20 für die Konzentrationsgruppe von 25 $\mu$ M, deren Wachstumsrate damit in diesem letzten Intervall diejenige der beiden vorangegangenen Intervalle dieser Gruppe damit noch überschreitet.

**Abbildung 11: Tag-zu-Tag Wachstumsraten der PK mit Meclofenaminsäure**

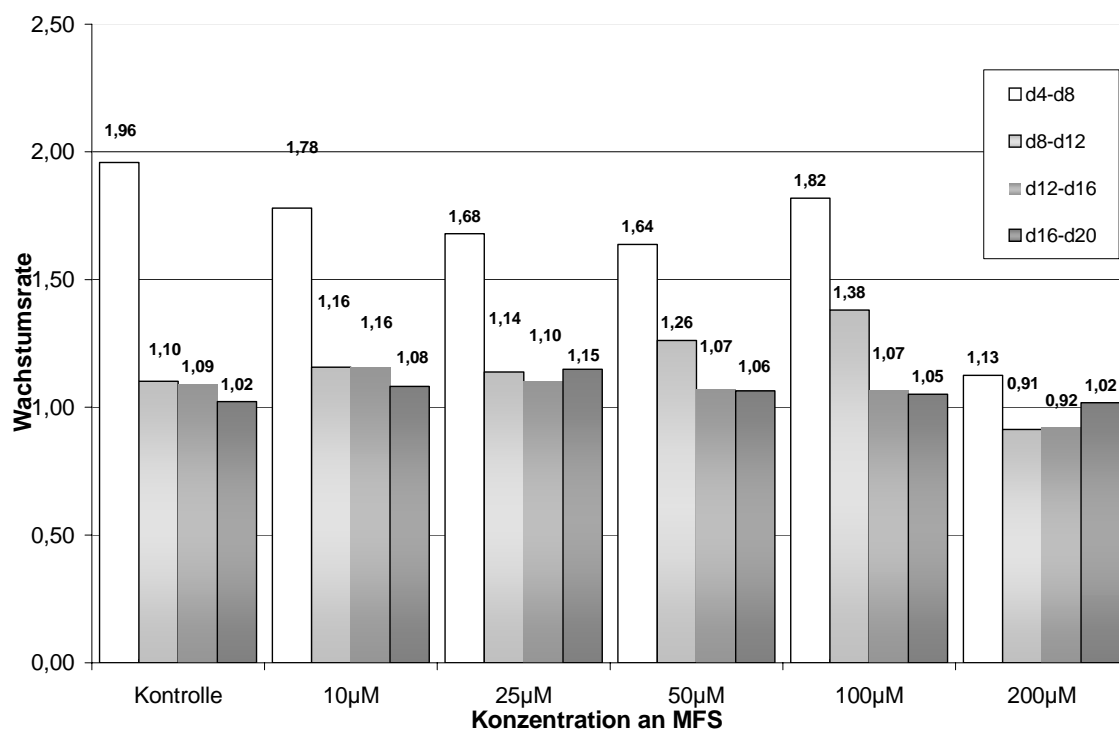


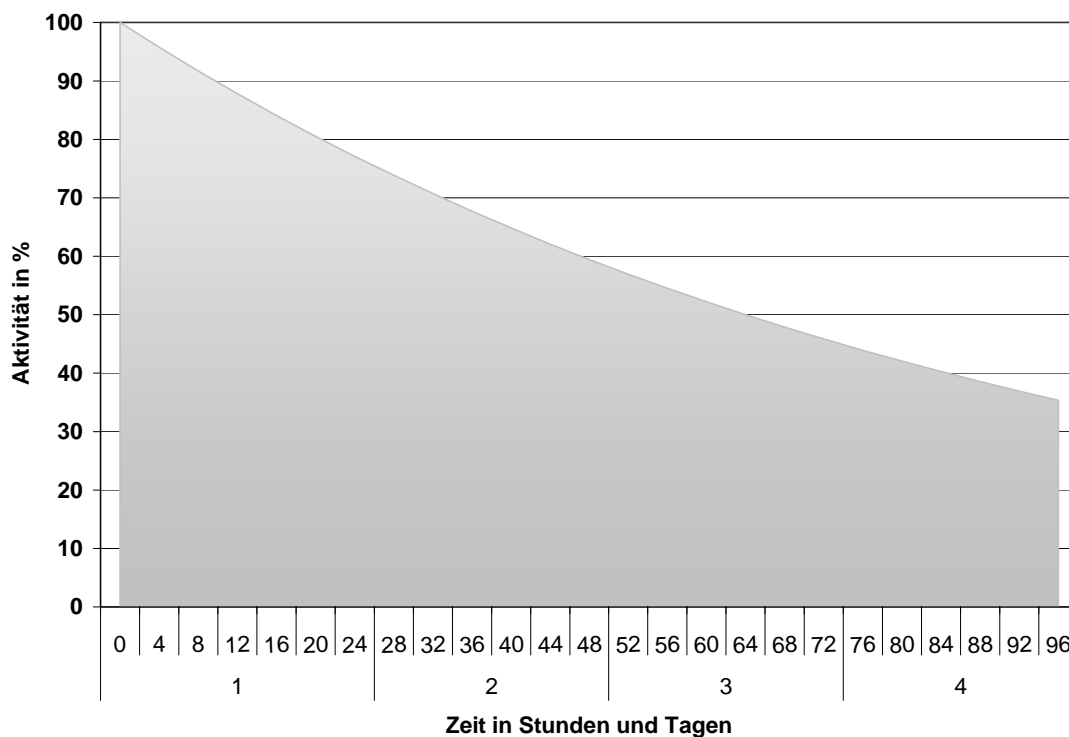
Abbildung 11: Das Balkendiagramm veranschaulicht die Tag-zu-Tag Wachstumsraten der mit unterschiedlichen Konzentrationen an MFS behandelten Messreihen. Die Zahlen über den Reihen entsprechen den auf die zweite Dezimalstelle gerundeten Wachstumsraten der zugehörigen Balkenwerte.

### 3.2.2. PK der Einzelbehandlung mit $^{90}$ Yttrium

In Vorversuchen wurde anhand von Doppelwertmessreihen mit dem Radionuklid  $^{90}$ Yttrium das Dosisspektrum ausgemacht, welches deutliche Effekte auf das Wachstumsverhalten der SMCs in Zellkultur zeigt ohne die Zellen sofort gänzlich zu zerstören. Für die Hauptversuche der Arbeit sind dann

Dosiswerte für 2Gy, 4Gy und 8Gy kalkuliert worden. Im Gegensatz zur Dauereinzelbehandlung mit Meclofenaminsäure, die dem Medium über den gesamten Beobachtungszeitraum der Kinetik hinzugefügt wird (und mit jedem Medienwechsel zwischen den Beobachtungsintervallen neu angesetzt wird), erfolgt die Zugabe des trägerfreien Yttriums an Tag 0 zu Beobachtungsbeginn und wird mit dem Medienwechsel und unter zweimaligem Nachwaschen mit PBS an Tag 4 wieder entfernt. In diesem Zeitraum werden also die Zellen den entsprechend gewählten Dosen (2-8Gy) exponiert. Die Aktivität des Nuklids mit der Halbwertszeit von 2,67 Tagen sinkt dabei auf 35,35% der Anfangsaktivität von Tag 0 ab.

**Abbildung 12: Aktivitätsabnahme von  $^{90}\text{Yttrium}$  in 4 Tagen**

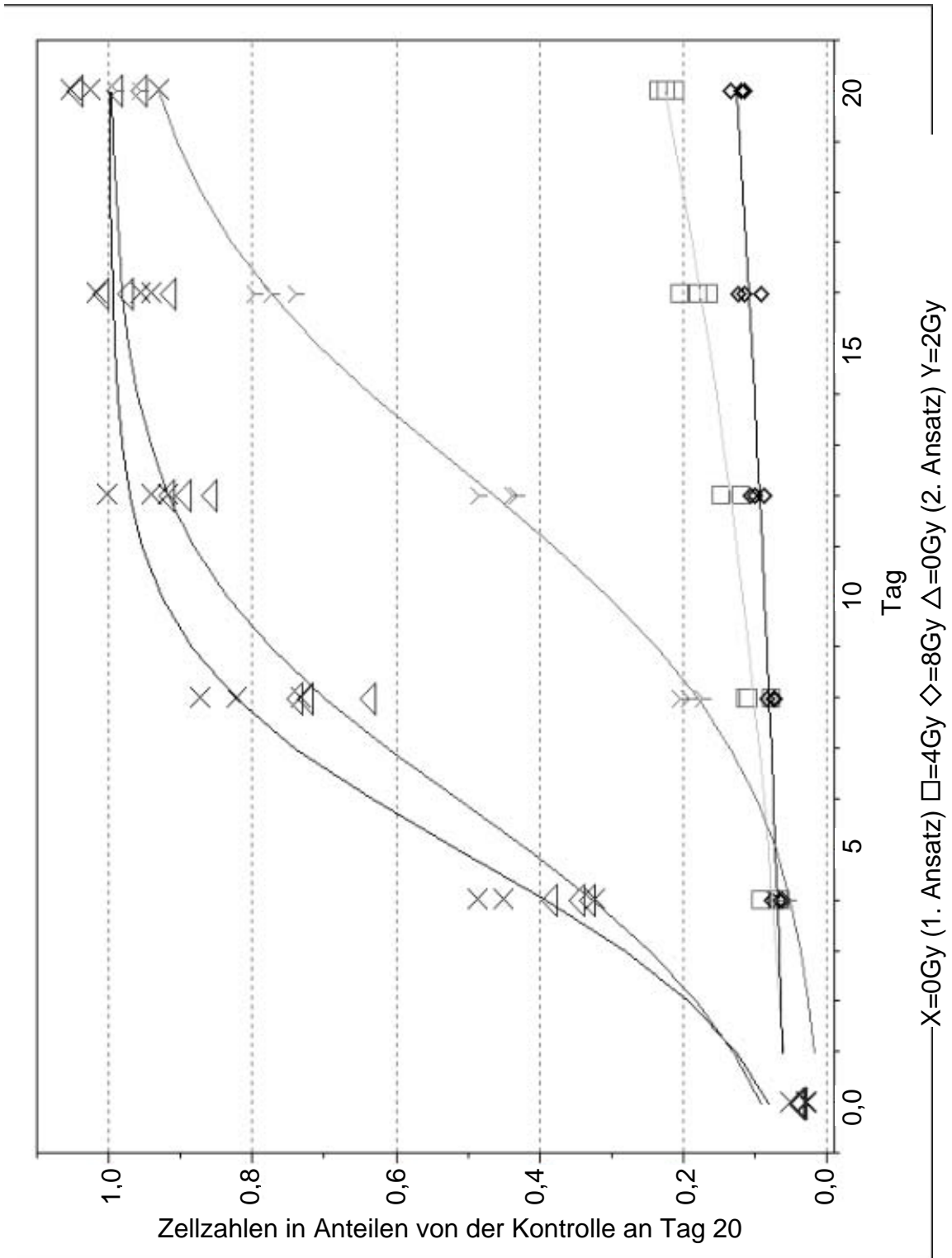


*Abbildung 12: Die Abbildung gibt die Abnahme der Aktivität des Radionuklids  $^{90}\text{Yttrium}$  in der Suspension des Nährmediums während der viertägigen Expositionszeit wieder.*

Die Exposition der Zellen mit radioaktiver Strahlung unterschiedlicher Dosen für eine Zeit von 4 Tagen zeigt eine gänzlich andere Charakteristik bezüglich der Kinetik der Vermehrungshemmung als die Langzeitbehandlung mit MFS (s. Abbildung 13). Bereits an Tag 4 lässt sich ein signifikanter Unterschied

zwischen den Zellzahlen der unbehandelten Kontrollgruppe und den bestrahlten Zellen ausmachen. Interessanterweise liegen die Zellzahlen der bestrahlten Gruppen an Tag 4 unmittelbar beieinander. Die relativen Wachstumsraten, die für die drei untersuchten Dosen um den Wert 2 herum verstreut liegen (s. Abbildung 13), lassen erkennen, dass sich die Zellen im Dosispektrum zwischen 2Gy und 8Gy während der Exposition mit radioaktiver Strahlung in dem Intervall von 4 Tagen einmal teilen. In den folgenden Beobachtungstagen spaltet sich das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Dosisgruppen nach Entfernen des suspendierten Radionuklides aus dem Medium aber sehr deutlich auf:

**Abbildung 13: Proliferationskinetik der Einzelbehandlung mit  $^{90}\text{Yttrium}$**

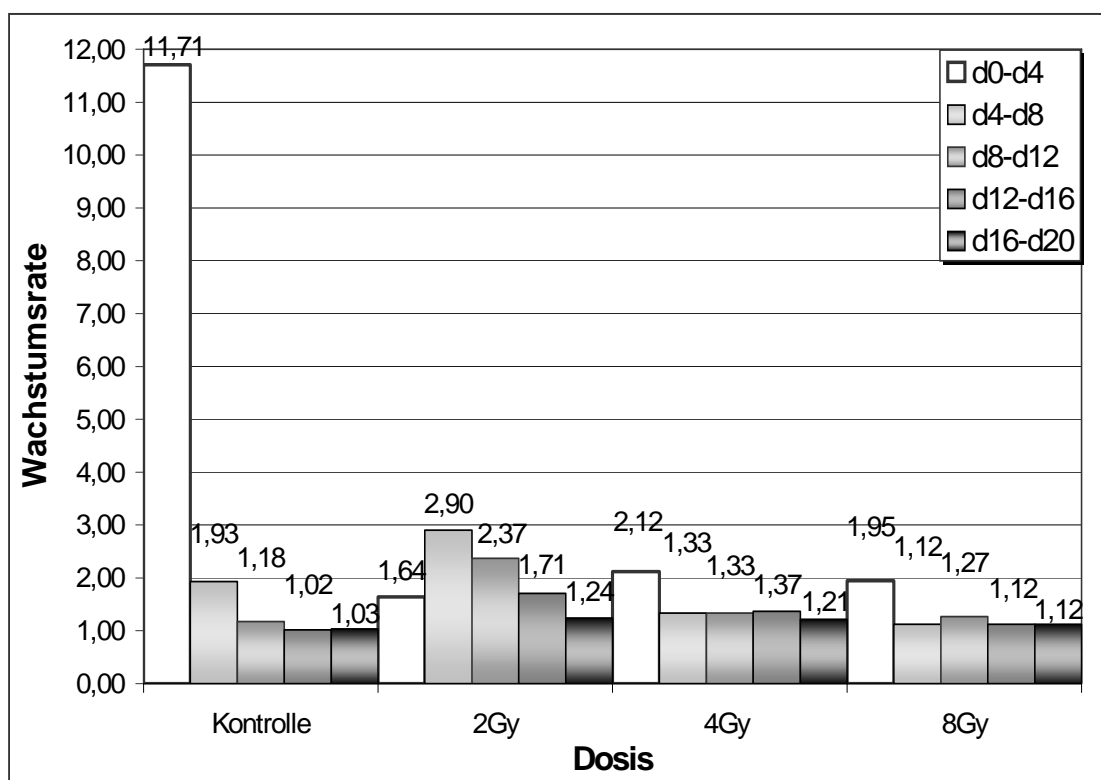


*Abbildung 13: In der Graphik sind die relativen Zellzahlen gegen die Zeit aufgetragen. Die betreffenden Dosen sind in dem Beobachtungsintervall von Tag 0 bis Tag 4 appliziert worden.*

Die Populationskinetik der 2Gy Gruppe gibt einen typischen sigmoiden Kurvenverlauf mit einem Wendepunkt bei Tag 12 wieder und reicht gegen Ende des Beobachtungszeitraumes bis knapp an die Zellzahlen der Kontrollgruppe heran. Dies zeigt eindeutig, dass sich die Zellen nach einer vorübergehenden Wachstumshemmung wieder, zumindest partiell, von der Bestrahlung erholen. Ob die Zellen dieselbe proliferative Potenz der Kontrollzellen wieder erreichen, d.h. sich generell noch mit der gleichen Anzahl teilen können wie unbestrahlte glatte Muskelzellen, denen physiologischerweise eine limitierte Anzahl von Teilungen zugesprochen wird, ist aus dem Beobachtungszeitraum von 20 Tagen nicht beurteilbar. Jedenfalls sind die Tag-zu-Tag Wachstumsraten in der 2Gy Gruppe ab Tag 4 in jedem Intervall größer als alle korrespondierenden Wachstumsraten der Kontrollgruppe (s. Abbildung 14)

relativer Anteil der Zellzahlen

**Abbildung 14: Tag-zu-Tag Wachstumsraten der Einzelbehandlung mit <sup>90</sup>Y**



Obwohl die Zellzahlen am Ende der Kinetik bei der 4Gy und der 8Gy Gruppe nur 22% bzw. 12% der Kontrollzellzahlen erreichen, steigen die Zellzahlen

dieser Dosisgruppen während der gesamten Kinetik kontinuierlich an. Eine Plateau-Bildung ist dabei noch nicht abzusehen, die Werte der Wachstumsraten sind immer größer als 1. Aus dem Rechenmodell für die Funktionsvorschrift der Kurvenverläufe lässt sich entnehmen, dass der Wendepunkt (charakterisiert durch Parameter „T“) für die Versuchsreihe mit 4Gy an Tag 35,1 liegen würde, für die Kinetik mit 8Gy bei 66,3 Tagen.

Die persistierende Abnahme der Wachstumsraten in der 2Gy Gruppe um Tag 16 lässt sich durch die einsetzende Kontaktinhibition erklären, die bei der zu diesem Zeitpunkt erreichten Zelldichte erfahrungsgemäß auftritt. Es ist daher ebenfalls wie bei der Kontrolle von einer beginnenden Plateau-Bildung in dieser Dosis-Gruppe auszugehen.

### 3.2.3. PK der Kombinationsbehandlung von MFS und <sup>90</sup>Yttrium

#### 3.2.3.1 Die Kombination von 2Gy und Meclofenaminsäure (50-200µM)

In der Übersicht der Kombinationsbehandlung von 2Gy mit Meclofenaminsäure (s. Abb. 15) sind aus Gründen der (abschätzenden) Vergleichbarkeit die korrespondierenden Konzentrationen und Dosen aus den Einzelbehandlungen mit in die Graphik übernommen worden. In dieser Zusammenschau wird der unterschiedliche Effekt von Strahlungsbehandlung und Langzeitexposition mit MFS besonders deutlich. Die Kurvenformen der Einzelbehandlungen mit Meclofenaminsäure deuten auf eine Hemmung der Proliferationsrate hin, die sich in langsameren initialen Anstiegen der Wachstumsraten mit Plateaubildung auf niedrigerem Zellzahlniveau äussert, wohingegen Niedrigdosis-Bestrahlungen von 2Gy aufgrund der sigmoiden Verformung der Wachstumskurve auf einen Verzögerungstrend der Proliferation schließen lassen, der sich in einer akzelerierten Vermehrungsrate im Anschluss an ein wachstumsinhibiertes Intervall widerspiegelt.



**Abbildung 15: PK der Kombinationsbehandlung von 2Gy  $^{90}\text{Y}$  mit MFS**

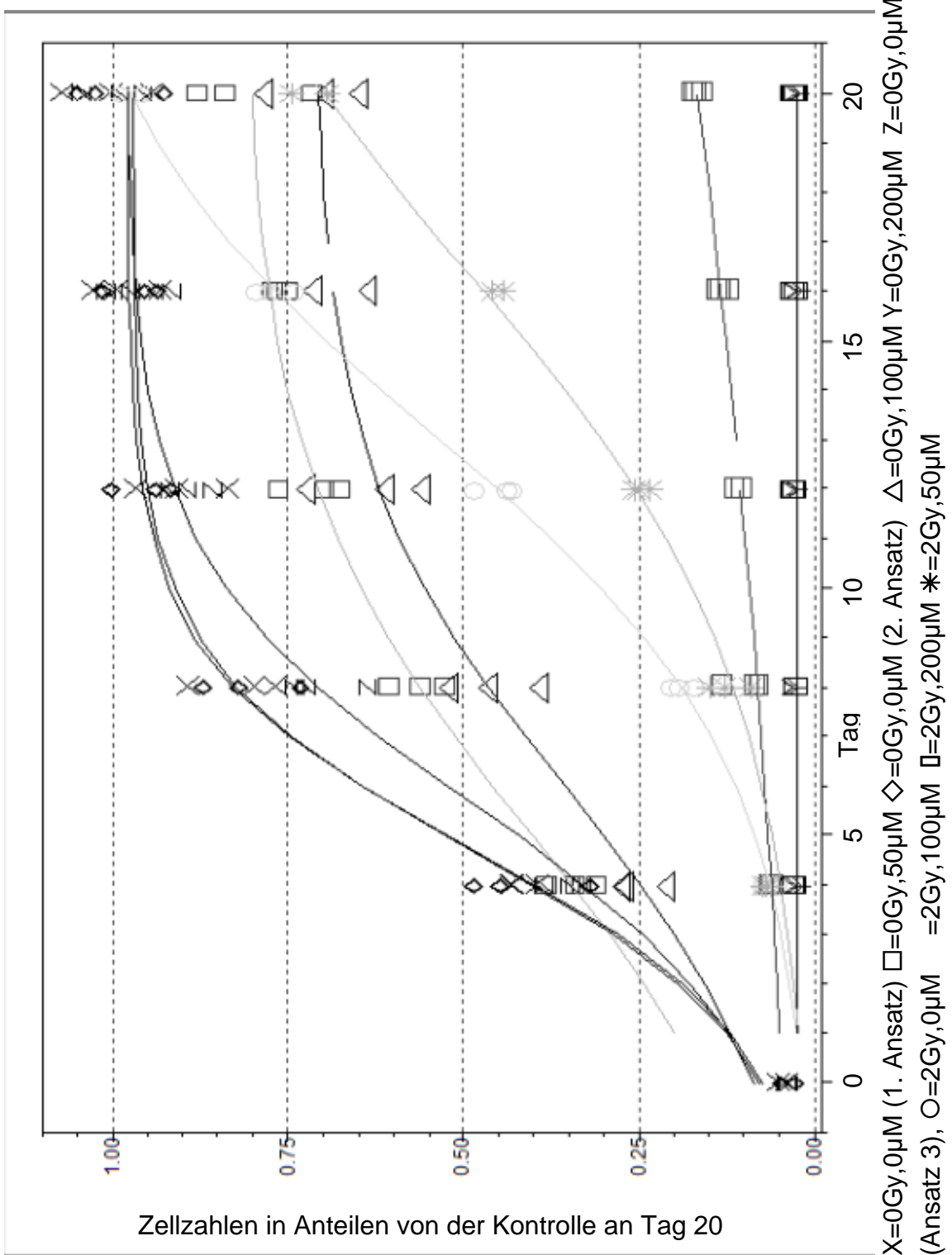


Abbildung 15 : Die Graphik illustriert die Effekte einer Kombinationsbehandlung von 2Gy  $^{90}\text{Y}$  (appliziert in 4 Tagen) und einer Dauerbehandlung mit MFS (für 20 Tage mit Konzentrationen bis 200 $\mu\text{M}$ ).

Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Charakteristika der Wachstumskinetiken bei der Einzelbehandlung (Strahlung vs. Medikament) stellt die Kombinationsbehandlung eine besonders interessante Option dar. In der 2Gy-Gruppe sind dafür, wie auch in der 4Gy und 8Gy Gruppe, Kombinationen mit 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M untersucht worden. Die mit 2Gy und 50 $\mu$ M behandelten Zellen weisen über den Beobachtungszeitraum von allen untersuchten Bedingungen die konstantesten Wachstumsraten auf (zwischen 1,6 und 2), was sich in dem exponentiellen Anstieg der Kurve äussert. Sie läuft damit quasi spiegelbildlich mit der Kurve der 50 $\mu$ M Gruppe auseinander und nähert sich ihr ebenso gegen Ende der Kinetik wieder an. Die 4-Tages-Wachstumsrate von 50 $\mu$ M nimmt hingegen bis Tag 20 exponentiell von 7,5 auf 1,1 ab. Postuliert man für die Kombinationsbehandlung einen streng additiven Effekt der beiden Einzelbehandlungen, so müsste die Kurve von 2Gy,50 $\mu$ M einen Wendepunkt aufweisen. Der Wert von „T“ für diese Versuchsbedingung liegt bei 16.98 Tagen. Eine Plateau-Bildung tritt entsprechenderweise bei 2Gy,50 $\mu$ M im Beobachtungszeitraum nicht auf. Da diese aber bei der 2Gy-Gruppe ab Tag 16 deutlich wird, nähern sich diese beiden Kurven, die bis Tag 16 kontinuierlich divergent waren, im letzten Beobachtungsintervall wieder an. Die Zellen der Kombinationsgruppe aus 2Gy und 100 $\mu$ M zeigen zwar ein gewisses Wachstumsverhalten, das sich in der gering, aber fast linear ansteigenden Kurve zeigt; sie teilen sich netto allerdings in den zwanzig Tagen nur zweimal (Wachstumsrate des d0-d20 Intervalls = 4,2). Ab Tag 8 nehmen ihre Wachstumsraten leicht zu. Die mit 2Gy und 200 $\mu$ M behandelten Zellen zeigen keinerlei Wachstum. Diese Beobachtung ist erwartungsgemäß, da schon bei der MFS-Einzelbehandlung mit 200 $\mu$ M keine Proliferation mehr feststellbar gewesen ist. Bei einer Kombinationsbehandlung der haSMCs mit zwei hemmenden Agentien liegt die Frage nahe, inwieweit sich diese in ihren Wirkungen ergänzen, bzw. ob es einen subadditiven, additiven oder überadditiven Effekt gibt. Da die beiden Noxen vermutlich an ganz unterschiedlichen Stellen in das

Vermehrungsverhalten eingreifen, darf, obwohl es eher weniger wahrscheinlich ist, die Möglichkeit einer antagonistischen Wirkung ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

### **3.2.3.2 Die Kombination von 4Gy und Meclofenaminsäure (50-200 $\mu$ M)**

Eine Einzelbestrahlung der Zellen mit 4 Gy in 4 Tagen supprimiert das Zellwachstum schon in derartiger Weise, dass die Endzellzahlen dieser Gruppe an Tag 20 gerade ca. 20% der Zellzahlen der Kontrollgruppe ergeben. Dennoch lassen sich zusätzlich hemmende Effekte einer Kombinationsbehandlung mit MFS aufzeigen. Gegen Ende der Kinetik spreizen sich die Kurven der Kombinationsbehandlung auf. Dabei ist erkennbar, dass diese Aufteilung streng konzentrationsabhängig erfolgt, d.h. auch bei der Kombination die Zellzahl mit steigender Konzentration abnimmt. Immerhin zeigt die Kombinationsbehandlung mit 4Gy und 50 $\mu$ M ein, wenn auch geringes, aber kontinuierliches Ansteigen der Zellzahlen, für die 4Gy-Kombination mit 100 $\mu$ M könnte (bei einem „T“-Wert von 10,03 Tagen) eine Plateaubildung im letzten Abschnitt der Kinetik vorliegen und die 4Gy+200 $\mu$ M Kombination ist kontinuierlich vollständig wachstumsinhibiert.

**Abbildung 16: Proliferationskinetik von  
Behandlungskombinationen mit 4Gy und 0-200 $\mu$ M MFS**

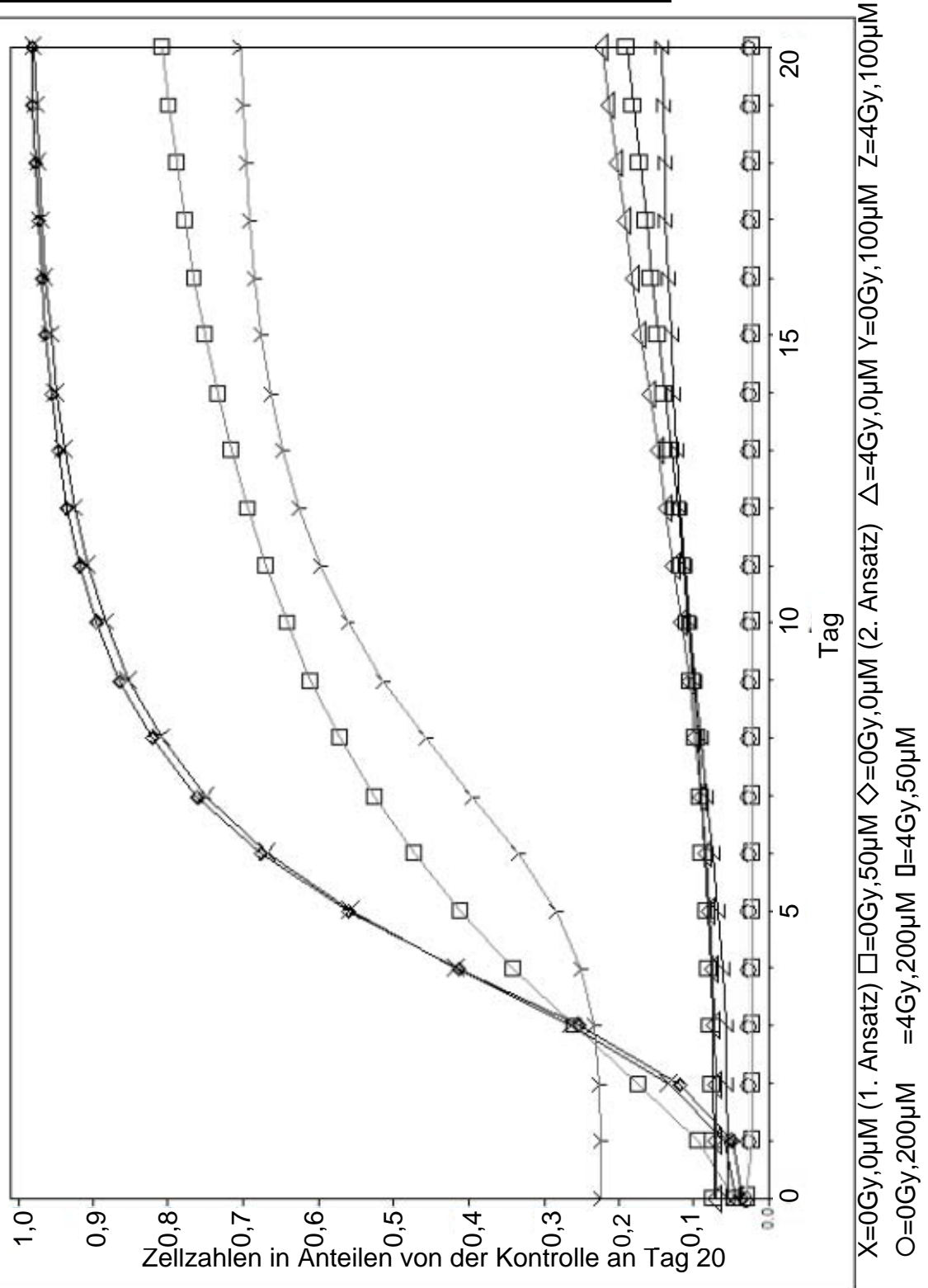


Abbildung 16: Die Abbildung gibt die Wachstumskurven der 4Gy+MFS-Kombinationsbehandlungen wieder sowie die Kurven der entsprechenden Einzelbehandlungen.

### **3.2.3.3 Die Kombination von 8Gy und Meclofenaminsäure (50-200µM)**

Die höchste Dosis der in ihrem Kombinationseffekt mit MFS getesteten Dosen ist die 8Gy Gruppe. Unter der Applikation dieser Dosis in Einzelbehandlung vollziehen die Zellen im gesamten Beobachtungszeitraum im Durchschnitt nicht einmal zwei Zellteilungen (Wachstumsrate d4-d20: ca. 3,5). Die erreichte Zellzahl an Tag 20 ergibt ungefähr 12% von derjenigen der Kontrolle. Dementsprechend haben eventuelle Kombinationseffekte nur eine sehr geringe Auswirkung auf die absoluten Zellzahlen dieser Gruppe.

Bis auf den Endwert von 8Gy, 100µM an Tag 20 und die Gruppe der 200µM Einzel- und Kombinationsbehandlungen steigen die bestrahlten Zellen, wenn auch äusserst gering, bis zum Ende der Kinetik an.

Zwar ist aus den Kurvenverläufen ersichtlich, dass bei jeder Versuchsbedingung, bei der im Nährmedium eine bestimmte MFS-Konzentration mit einer definierten Strahlendosis kombiniert worden ist, eine stärkere Hemmung des Zellwachstums erfolgt als bei der entsprechenden Einzelbehandlung mit Medikament oder Strahler; jedoch fällt die Beurteilung des Ausmaßes der Interaktion bzw. des Anteils, den jede Noxe bei der Kombination an der Wachstumshemmung besitzt, anhand der bloßen Kurvenverläufe der Proliferationskinetik schwer.

**Abbildung 17: Proliferationskinetik von Behandlungskombinationen mit 8Gy und 0-200 $\mu$ M MFS**

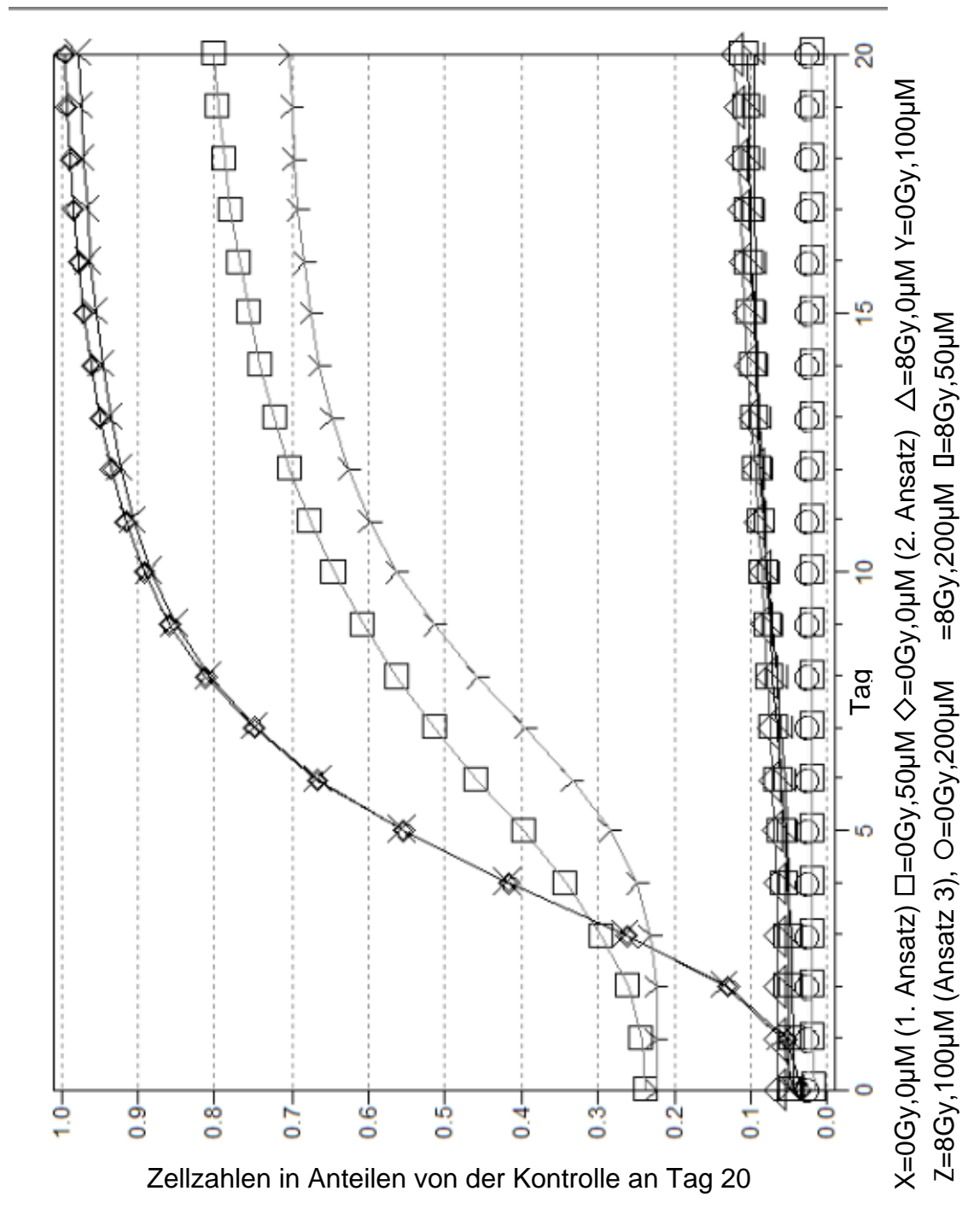


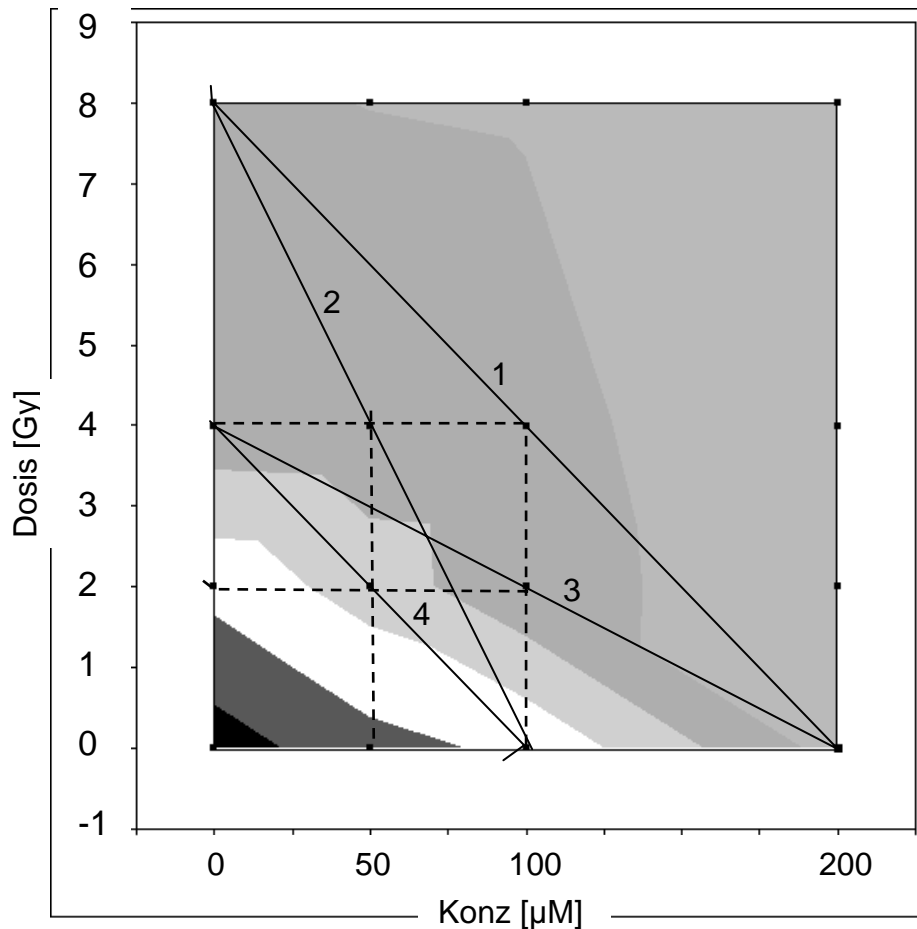
Abbildung 17: Die Graphik illustriert die Einzel- und Kombinationseffekte auf die Zellzahlen in einer Proliferationskinetik bei einer Behandlung mit 8Gy und 0 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M MFS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Mittelwerte bzw. die errechneten Werte abgebildet.

Zu den vier verwendeten MFS-Konzentrationen („0 $\mu$ M“, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M) und den vier zum Einsatz gekommenen Strahlendosen („0Gy“, 2Gy, 4Gy und 8Gy) sollen im Folgenden anhand von vier Bedingungen die Wechselwirkungen untersucht werden. Abbildung 18 veranschaulicht dazu die Vorgehensweise und den theoretischen Hintergrund. Sie bedient sich sog. Iso-Kurven, analog der Höhenlinien auf einer Landkarte oder Druckkurven auf einer Wetterkarte. Auf der Ordinate ist dazu die Dosis in Gray skaliert und auf der Abszisse die MFS-Konzentration in  $\mu$ M, sodass Werte, die Ergebnisse von Versuchsbedingungen mit nur einer Behandlungskomponente sind (die andere besitzt den Wert Null), auf den Achsen liegen. Die Fläche, die von den beiden Achsen aufgespannt wird, beinhaltet nun die Punkte aller erdenklichen Kombinationen, deren Teilkomponenten in Projektion auf die jeweilige Achse abgelesen werden können. Die Werte dazu sind in dieser dreidimensionalen Darstellung als Graustufen wiedergegeben, wobei weniger die absoluten Werte als vielmehr Bereiche (annähernd) gleicher Werte durch gleiche Farbgebung hervorgehoben werden sollen. Die vier durchgezogenen schwarzen Linien (Iso-Kurven) verbinden nun Achsenabschnitte und verlaufen dabei durch Messpunkte in der Diagrammfläche. Alle Punkte (bzw. Behandlungskombinationen) auf einer Iso-Linie hätten bei streng additiver Wirkung der Einzelkomponenten denselben Wert.

Die vier eingezeichneten Iso-Linien sind zwischen folgenden Achsen-Eckpunkten aufgespannt:

- 1.) 200 $\mu$ M, 0Gy  $\leftrightarrow$  0 $\mu$ M, 8Gy
- 2.) 100 $\mu$ M, 0Gy  $\leftrightarrow$  0 $\mu$ M, 8Gy
- 3.) 200 $\mu$ M, 0Gy  $\leftrightarrow$  0 $\mu$ M, 4Gy
- 4.) 100 $\mu$ M, 0Gy  $\leftrightarrow$  0 $\mu$ M, 4Gy

**Abbildung 18: Dreidimensionales Iso-Diagramm zu den Strahlungs/Medikament-Kombinationen**



*Abbildung 18: Im Diagramm sind Bereiche gleicher Ergebniswerte durch gleiche Grauschattierung wiedergegeben. Die Beträge der Komponenten einer bestimmten Kombination können in Projektion auf die jeweilige Achse abgelesen werden. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Iso-Linien.*

Die Untersuchung der Messwerte für die untersuchten Kombinationen auf den einzelnen Isokurven ergibt für jede Kurve ein anderes Ergebnis. Für Kurve 1 zeigt sich ein antagonistisches Verhalten, für Kurve 2 ein synergistisches, für Kurve 3 ein additives (der Unterschied zwischen dem erwarteten Wert auf der Kurve und dem Messwert (von 2Gy, 100µM) ist statistisch nicht signifikant) und für die vierte Kurve zeigt sich sogar eine Veränderung der Kombinationseffekte mit dem Messtag (in der Abb. nicht dargestellt).



## 3.3. Koloniebildungs-Assays

### 3.2.1. Vorbemerkungen

Die Interpretation der Koloniebildungsassays gestaltet sich schwieriger als diejenige der Proliferationskinetik. Die klonogene Aktivität ist als empfindlicher Marker des Proliferationsverhaltens von Einzelzellen unter Kulturbedingungen am besten in Zusammenhang mit vorliegenden Wachstumskurven beurteilbar. Als Kolonie wird ein Zellkonglomerat definiert, das aus mehr als 50 Zellen besteht. In der Regel liegen die Zellzahlen einer Kolonie bei weitem darüber. Interessanterweise scheint die Größe einer Einzelkolonie eher bei Zellen abzunehmen, die aus Zellkulturflaschen gewonnen werden, welche aufgrund der sich entwickelnden hohen Zelldichten einer Kontaktinhibition unterworfen sind, wohingegen bei den mit MFS oder Strahlung inhibierten Zellen zwar die Zahl der Kolonien, weniger aber die Zellzahl pro gebildeter Kolonie abzunehmen scheint.

Die Anzahl der Kolonien, die sich pro well aus den jeweils 500 ausgesäten Einzelzellen innerhalb von 10 Tagen Inkubationszeit bildet, schwankt von im Mittel 79,5 Kolonien bei den Kontrollen von Ansatz 1 an Tag 4 bis 64,4 Kolonien bei Ansatz 3 (der Kontrollen, Tag 4). Die sich daraus ergebende „Plating-efficiency“ („PE“), die als Quotient aus der Anzahl ausgesäter Zellen und der gebildeten Kolonien ein Maß für den Anteil der einzeln proliferierenden Zellfraktion ist, schwankt somit zwischen 15,9% bei Ansatz 1 und 12,9% bei Ansatz 3 . Die Kontrollen von Ansatz 2 an Tag 4 zeigten eine PE von 14,6%. Die PE ist sowohl von der Art und dem Alter der Zellen als auch von den Versuchsbedingungen (ausgesäte Zelldichte, verwendetes Medium, Inkubationszeit etc.) abhängig.

Zur Stabilisierung der Varianzen der Messwerte sind die Daten zur statistischen Auswertung nach der Formel

$$y = \arcsin(\text{MW}(\rho\text{Kobi}))^{1/2}$$

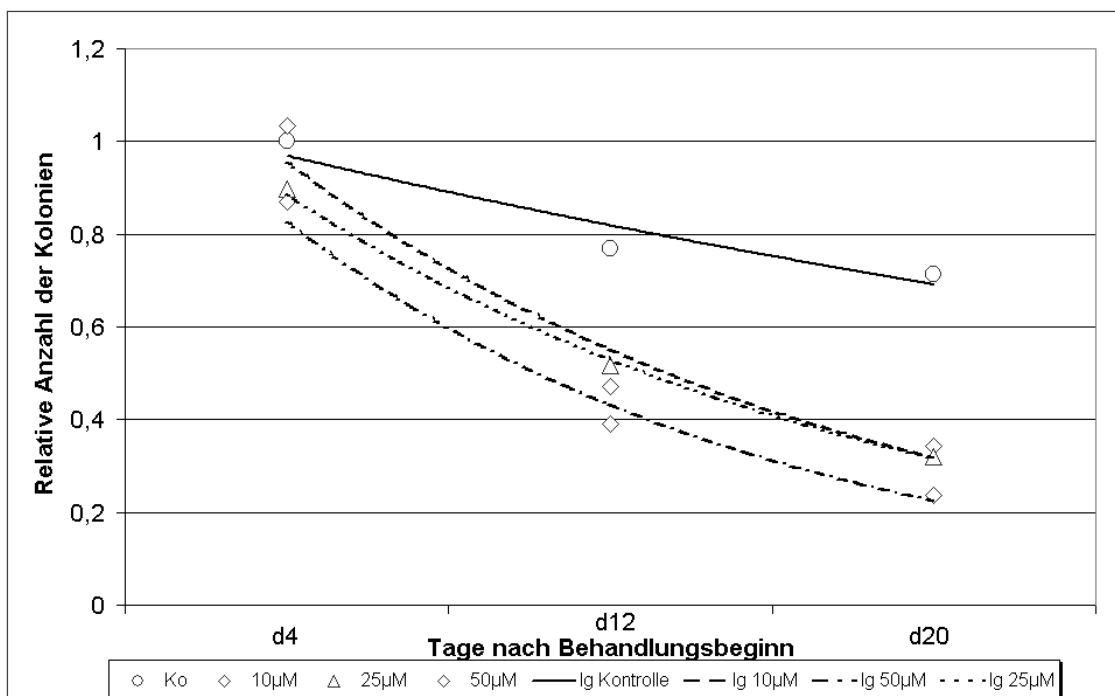
transformiert worden, wobei „ $\rho\text{Kobi}$ “ dem Quotienten aus der Anzahl der Kolonien pro well und pro 500 ausgesäter Zellen entspricht. Mittels des Tukey-Kramer-Tests sind dann die interessierenden Werte hinsichtlich ihrer Unterschiede auf Signifikanz untersucht worden, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler erster Art wiederum mit  $\alpha=0,05$  festgesetzt wurde.

Zu Tag 20 hin nimmt bei der Kontrolle nicht nur die Zahl der Zellen ab, die eine Kolonie formen, sondern auch die absolute Anzahl der einzelnen gebildeten Kolonien, was auf eine mit dem Alter der Zellkultur abnehmende klonogene Aktivität und eine durch Kontaktinhibition verursachte Wachstumshemmung zurückzuführen ist. Bei Ansatz 2 und 3 sinken die Mittelwerte der gebildeten Kolonien der Kontrollen bis Tag 20 auf 71 Prozent der Werte an Tag 4. Bei Ansatz 1, bei dem die Low-Dose Konzentrationen von MFS an den SMCs getestet worden sind, bilden sich mit im Mittel knapp 30 Kolonien an Tag 20 in der Kontrollgruppe nur 37% der Anzahl an Kolonien dieser Gruppe im Vergleich mit Tag 4. Das Auftreten dieses Phänomens, das bei der Zellgruppe dieses Ansatzes auftritt, obwohl die Zellen aus derselben Charge und Passage stammen wie diejenigen der übrigen Ansätze und exakt dem gleichen Behandlungsalgorithmus unterzogen werden, hat zur Konsequenz, dass sich trotz der Verwendung von Relativwerten, die das Problem der sich unterscheidenden Kontrollzellzahlen eliminieren sollen, die Vergleichbarkeit zum Beispiel der Low-Dose und der High-Dose-Werte mit MFS im gesamten Beobachtungszeitraum als schwierig gestaltet. Verwendet man andererseits Relativwerte, die sich jeweils auf die Kontrollzellzahlen an diesem Tag beziehen, und die dann durchgängig den Wert 100 (bzw. 1,00) annehmen, so vernachlässigt man, dass sich Verschiebungen in den gebildeten Quotienten

der dargestellten Werte durch einsetzende Kontaktinhibition der Kontrollzellen (und eventuell der behandelten Gruppen) ergeben, einem Effekt, der von der Inhibition durch die Behandlung mit MFS und/oder  $^{90}\text{Y}$  abgegrenzt werden muss. Zwar tritt das Phänomen der verminderten klonogenen Aktivität durch Kontaktinhibition bei (durch Strahlung und/oder Medikament) geringer inhibierten Zellen schneller und deutlicher auf, da diese in der Kulturflasche schneller größere Zelldichten erreichen, allerdings lässt es sich wegen der Modulation durch die Zellgruppe und die Art der Kinetik selbst schlecht quantifizieren.

### 3.2.2. Koloniebildungsassays der Einzelbehandlung mit Meclofenaminsäure

**Abbildung 19: Relative klonogene Aktivität der Low-Dose-MFS-Gruppen im Verlauf der Zeit**

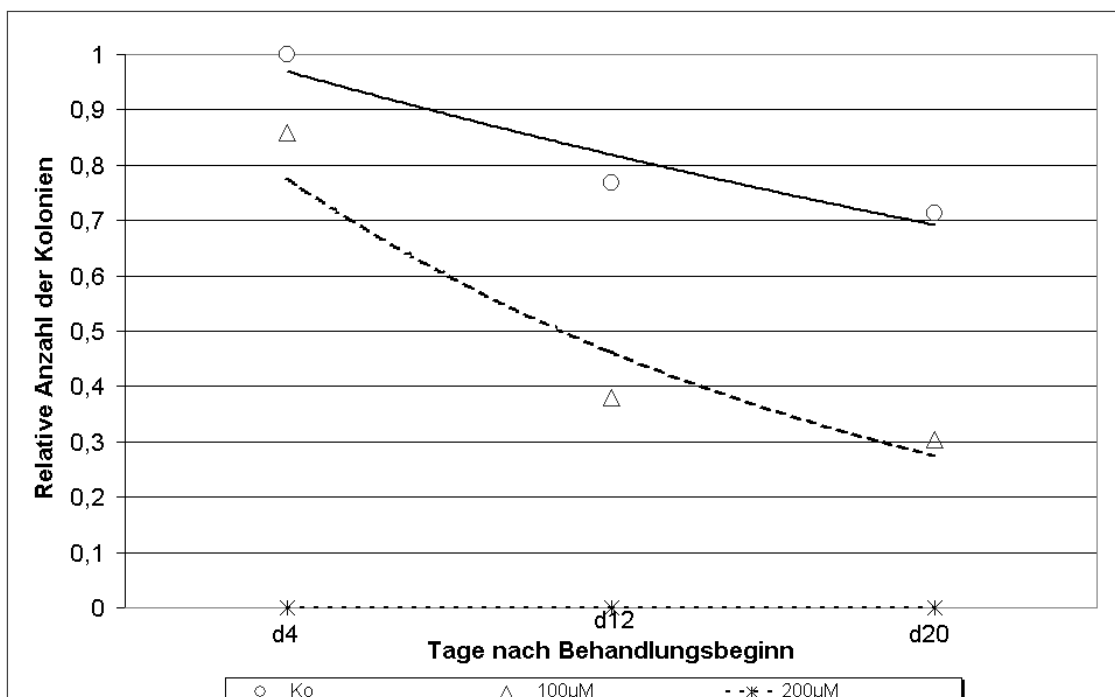


Die Abbildung stellt die Mittelwerte der KoBis der Low-Dose-MFS-Behandlung in Bezug zur Kontrolle an Tag 4 als Relativwerte der Kontrolle an Tag 4 und in Abhängigkeit von der Zeit dar. Die Werte sind in dieser Darstellung durch eine Exponentialfunktion miteinander verbunden.

Die Darstellung in Abbildung 19 zeigt, dass die klonogene Aktivität der Kontrollgruppe kontinuierlich (in Absolutwerten von 79,5 Kolonien an Tag 4 auf 29,8 Kolonien an Tag 20) abfällt, wobei die Abnahme im Beobachtungsintervall zwischen Tag 4 und Tag 12 weitaus stärker ausfällt als diejenige zwischen Tag 12 und Tag 20. Die Kolonien der mit 10-50 $\mu$ M MFS behandelten Zellgruppen zeigen dasselbe Verhalten. Die Kurven der Kontrolle, der 10 $\mu$ M und der 50 $\mu$ M Gruppe verlaufen dabei fast parallel, während die 25 $\mu$ M Gruppe durch ihren relativen Anstieg der klonogenen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an Tag 12 einen etwas anderen Verlauf wählt. Die Mittelwerte der 50 $\mu$ M Gruppe liegen als einzige durchgängig niedriger als diejenigen der Kontrolle, die Unterschiede sind dabei für Tag 12 und Tag 20 statistisch signifikant.

Das anfänglich steile Abfallen der Koloniebildungsrate mit der Zeit, das in einen flacheren Teil mündet, erinnert an die radioaktive Zerfallsgraphik (s. S. 29). Analog zum Zerfallsgesetz lassen sich auch die Messwerte für die Kobis der MFS-Behandlung in guter Näherung durch eine Exponentialfunktion beschreiben, wie dies in Abbildung 19 illustriert ist. Wie bei der Halbwertszeit eines Nuklids kann dann rechnerisch die Zeit ermittelt werden, in der die klonogene Aktivität auf die Hälfte ihres Ausgangswertes gesunken ist. Diese beträgt beispielsweise für die Kontrolle 10,6 Tage, für die 50 $\mu$ M Gruppe 8,1 Tage. Dieser Werte sind jedoch, wie oben beschrieben, nicht nur eine Funktion der MFS-Konzentration, sondern auch von dem Ausmaß der Kontaktinhibition in der Kulturflasche und anderen Faktoren abhängig.

**Abbildung 20: Klonogene Aktivität der High-Dose-MFS-Gruppen im Verlauf der Zeit in absoluten Zellzahlen**

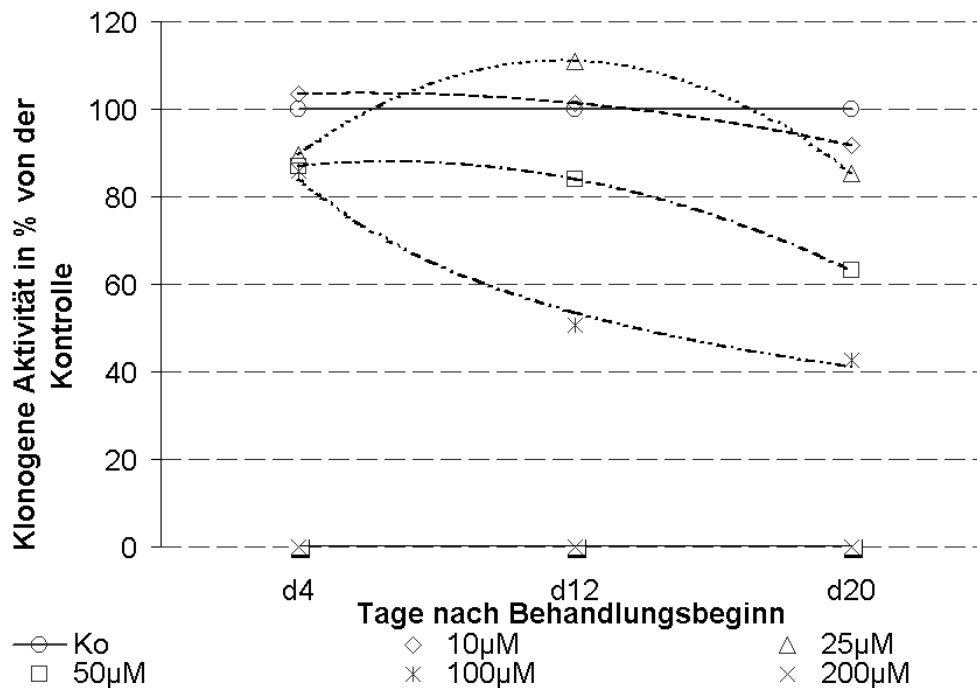


Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der Koloniebildungszahlen der beiden höchsten Konzentrationen an MFS, die als Versuchsbedingungen gewählt wurden, 100µM und 200µM. Die Meßpunkte sind durch eine Exponentialfunktion miteinander verbunden. Die 200µM-Fraktion bildet keine Kolonien aus.

Unter Mediumkonzentrationen von 100µM MFS fällt die Koloniebildungsrate zwischen Tag 4 und Tag 12 bedeutend schneller ab als dies bei der Kontrolle feststellbar ist. Daher laufen die Abstände der Messwerte in diesem Zeitraum auseinander, während sie zwischen Tag 12 und Tag 20 nahezu parallel verlaufen, d.h. in diesem Zeitraum der prozentuale Anteil an Kolonien in Bezug auf die Kontrolle nur wenig abnimmt (50,6% an Tag 12 und 42,6% an Tag 20) (s.a. Abbildung 19). Bemerkenswerterweise unterscheiden sich die „Kobi-Halbwertszeiten“ zwischen der Kontrolle und der 100µM Gruppe ebenfalls nur unwesentlich. Diese Beobachtung ist vor allem unter der Berücksichtigung interessant, dass das Medikament (im Gegensatz zur Strahlung) während der ganzen Kinetik in der jeweils angegebenen Konzentration im Nährmedium auf die Zellen gewirkt hat.

Medikamentenkonzentrationen von 200 $\mu$ M MFS supprimieren die klonogene Aktivität der glatten Gefäßmuskelzellen vollständig während des gesamten Beobachtungszeitraumes.

**Abbildung 21: Klonogene Aktivität der einzelnen MFS-Konzentrationen im Verlauf der Zeit in Prozent von der Kontrolle.**



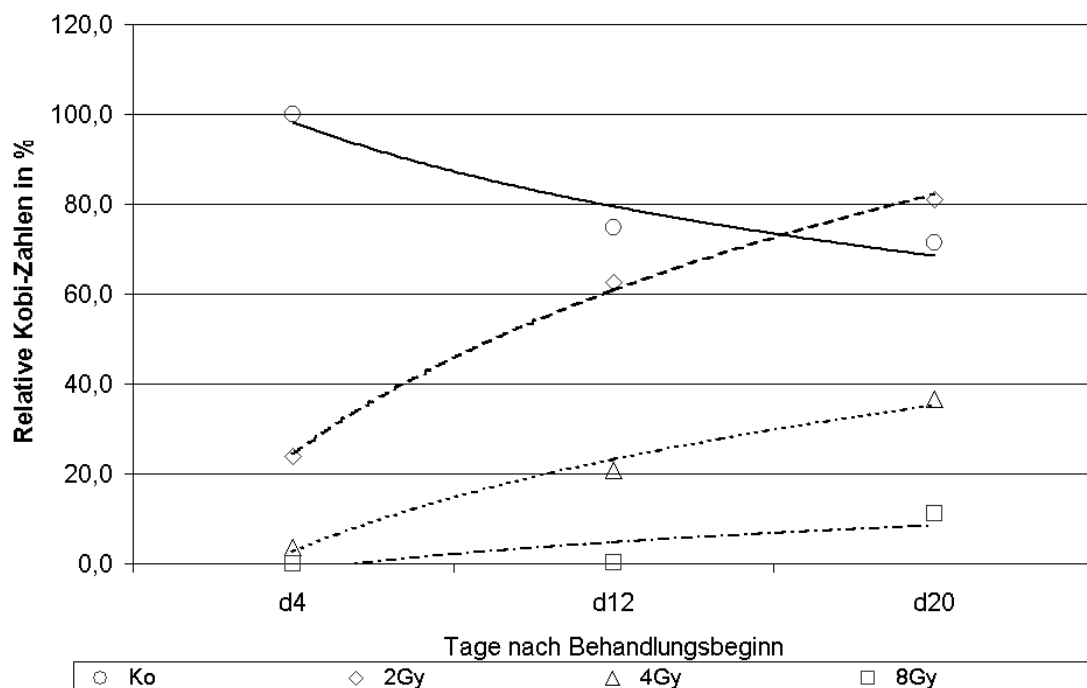
In Abbildung 21 sind die Mittelwerte der Koloniebildungsrate der Einzelbehandlungen mit MFS in Prozent von der Kontrolle aufgetragen, die jeweils als Bezugspunkt den Wert 100% erhalten hat. In dieser Darstellung kristallisieren sich insbesondere Abweichungen von Parallelverläufen zu den Kontrollen heraus.

Mit Ausnahme des Mittelwertes der Koloniebildungsrate von 25 $\mu$ M MFS an Tag 12 fallen unter Zugabe von MFS in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 100 $\mu$ M die Zahlen der gebildeten Kolonien mit der Zeit auch relativ zur Kontrolle stetig ab (s. Abb. 21). Mit Ausnahme des o. g. Wertes ist die Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden umso geringer je höher die Konzentration des Medikamentes war, der sie ausgesetzt gewesen sind. Nur für Tag 20 besteht eine strenge Abhängigkeit der Koloniebildungsrate von der MFS-Konzentration. Niedrigere MFS-Konzentrationen scheinen in der zweiten Hälfte der Kinetik deutlichere Effekte zu zeigen als in der ersten Hälfte, wohingegen höhere

Konzentrationen (100 $\mu$ M) initial, also zwischen Tag 4 und Tag 12, den größten hemmenden Effekt aufzeigen. Mit 200 $\mu$ M behandelte Zellen zeigen keine klonogene Aktivität.

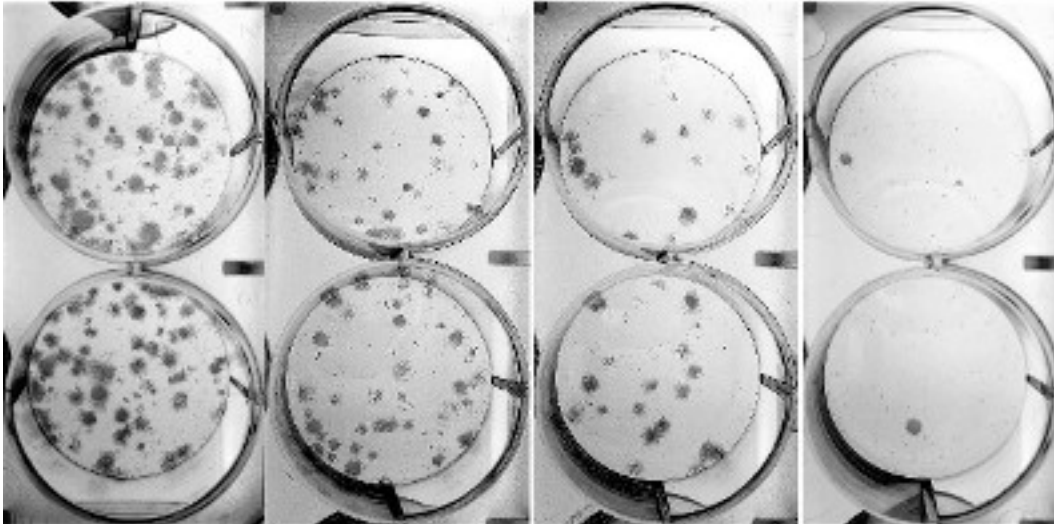
### 3.2.3. Koloniebildungsassays der Einzelbehandlung mit $^{90}\text{Y}$ trium

**Abbildung 22: Klonogene Aktivität der Einzelbehandlung mit  $^{90}\text{Y}$ trium im Verlauf der Zeit in Prozent von der Kontrolle an Tag 4.**



Die Abbildung zeigt die Mittelwerte derjenigen Versuchsgruppen, die mit 2Gy, 4Gy und 8Gy  $^{90}\text{Y}$ trium in den ersten 4 Behandlungstagen bestrahlt worden sind. Anhand der zum Ende der Kinetik ansteigenden Kobizahlen in allen bestrahlten Versuchsgruppen lassen sich Erholungseffekte erkennen.

**Abbildung 23: Aufnahmen der bestrahlten Kobi-wells an Tag 12**



*Übereinander abgebildet sind je zwei wells einer Versuchsbedingung. Von links nach rechts: Kontrolle, 2Gy, 4Gy, 8Gy. Die 2Gy-Gruppe ist zwar einem separaten Ansatz zugehörig, die entsprechenden Kontrollzellzahlen sind aber ähnlich. Die „Flecken“ in den abgebildeten wells sind SMC-Kolonien. Deutlich erkennt man die mit zunehmend applizierter Dosis abnehmende klonogene Aktivität.*

An Behandlungstag 4 unterscheiden sich alle bestrahlten Zellgruppen signifikant hinsichtlich der gebildeten Kolonien in Bezug zur Kontrolle. Während bei der 8Gy-Gruppe zu diesem Zeitpunkt keine klonogene Aktivität nachweisbar ist, bildet von der 4Gy-Gruppe ein Anteil von 3,6% der Kontrolle und von der 2Gy Gruppe 15,3% (in Bezug auf die Kontrolle) Kolonien aus. Diese Werte entsprechen der sogenannten „surviving-fraction“, also der klonogenen Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Strahlenexposition, welche in Prozent von der klonogenen Aktivität der Kontrolle angegeben wird.

Die Abnahme der Kobi-Zahlen der Kontrolle bis Tag 20 auf 71% der Werte von Tag 4 ist gänzlich auf die Kontaktinhibition zurückzuführen, was aus der Plateaubildung in den Wachstumskurven bzw. den Zellzahlen pro cm<sup>2</sup> ableitbar ist. Die 2Gy-Gruppe steigt mit ihren Kobi-Zahlen von allen untersuchten Gruppen bis Tag 20 am steilsten an und überragt gegen Ende der Kinetik mit ihren mittleren Kobi-Zahlen sogar diejenigen der Kontrolle an Tag 20. Allerdings ist die 2Gy Gruppe zu diesem Zeitpunkt noch nicht kontaktinhibiert, da sie, obwohl sie in der Kinetik schon nahe an die Kontrollzellzahlen heranreichende Werte liefert, noch keine Plateaubildung erreicht hat. Aus diesem Grunde ist es



sinnvoll die surviving-fraction auf die maximale klonogene Aktivität dieser Zellart (i.e. Kontrolle an Tage 4) zu beziehen um den hemmenden Effekt der Kontaktinhibition von den wachstumshemmenden Effekten der Bestrahlung abzugrenzen. Sie nimmt für 2Gy an Tag 20 dann ebenfalls einen Wert unter 100% ein (81,3%). Dies ist für alle Werte der surviving-fraction in Tabelle 4 berücksichtigt worden.

**Tabelle 4: „Surviving fractions“ der KoBis mit 2Gy, 4Gy und 8Gy**

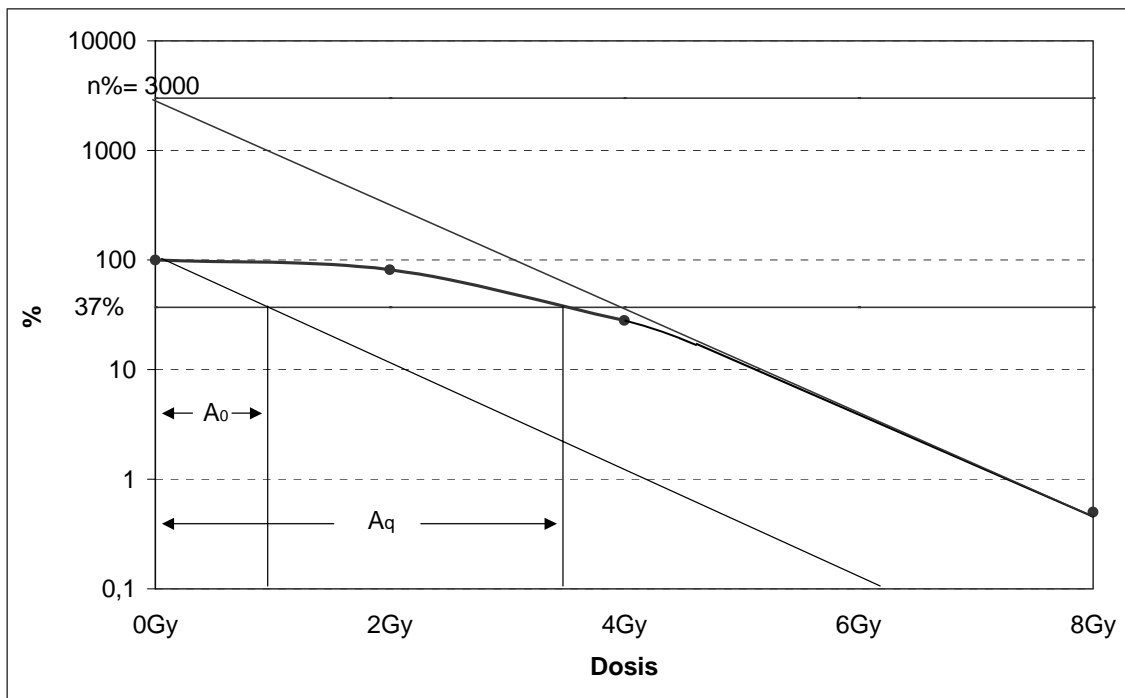
	<b>2Gy</b>	<b>4Gy</b>	<b>8Gy</b>
<b>Tag 4</b>	23,8	3,6	0,0
<b>Tag 12</b>	62,6	20,7	0,4
<b>Tag 20</b>	81,0	36,8	11,2

*Die Tabelle listet die surviving fractions der Dosisgruppen 2, 4 und 8Gy auf. Der in der Literatur weniger gebräuchliche Ausdruck Koloniebildungshemmungsrate charakterisiert diesen Wert treffender (s. Text).*

Die Erholungseffekte der 4Gy-Gruppe drücken sich in einem Anstieg der Mittelwerte der Kolonienzahlen aus, die von 3,6 an Tag 4 auf 36% an Tag 20 ansteigen. Damit sind sowohl die Zahlen, als auch die Anstiege der Werte geringer als diejenigen der 2Gy Gruppe. Allerdings steigen die Werte zwischen Tag 4 und Tag 20 fast linear an, während sie im zweiten Beobachtungsintervall (Tag 12 bis Tag 20) bei der 2Gy Gruppe langsamer ansteigen als in der ersten. Auch die mit 8Gy bestrahlten Zellen zeigen bezüglich ihrer klonogenen Aktivität Erholungseffekte. Die relative Zahl der Kolonien steigt von 0,4% an Tag 12 auf 11,2% an Tag 20 an, nachdem an Tag 4 keine klonogene Aktivität nachgewiesen werden konnte. Da hier offenbar einige Zellen die Bestrahlung während der ersten 4 Tage überlebt haben, diese aber vorübergehend in ihrer Vermehrungsaktivität blockiert gewesen sind, ist es sinnvoller hier statt „surviving fraction“ von „Koloniebildungshemmungsraten“ zu sprechen. Der Anstieg der klonogenen Aktivität der 8Gy Gruppe an Tag 20 auf 11,2 Prozent der maximalen KoBi-Rate der SMCs muss kritisch gesehen werden. Es wäre denkbar, dass sich dieser Wert aus einer sehr kleinen Fraktion strahlenresistenterer Zellen ergibt, die sich zwischen Tag 4 (nach Wegfall der

Strahlung) und Tag 20 bereits in der Zellkulturflasche (also vor der Aussat in die Kobi-wells) weitervermehrt haben könnte. Während der Aussat des Assays an Tag 20 sind diese Zellen, die originär von wenigen überlebenden Zellen stammen könnten, vereinzelt und verteilt worden und hätten ihrerseits in den KoBi-wells Kolonien bilden können, was zu einem zu höheren Werten verschobenen Ergebnis geführt hätte. Immerhin entspricht die Zunahme der klonogenen Aktivität zwischen Tag 12 und Tag 20 einem Faktor von 30.

Zu allen Beobachtungszeitpunkten während der Kinetik, an denen Koloniebildungsassays durchgeführt worden sind, lässt sich eine strikte Abhängigkeit des hemmenden Effektes der Strahlung von der applizierten Dosis erkennen, die trotz der einsetzenden Erholungseffekte bestehen bleibt. Trägt man die aus den Koloniebildungsassays gewonnenen Überlebensraten in Prozent logarithmisch gegen die Dosen auf, denen die Zellen exponiert gewesen sind, so ergibt sich für Säugetierzellen eine charakteristische Schulterkurve, wie sie für die vorliegenden Ergebnisse der Experimente mit haSMCs und <sup>90</sup>Yttrium in Abbildung 24 wiedergegeben ist:

**Abbildung 24: Schulterkurve der bestrahlten Kolonien von Tag 12**

In der Abbildung sind die prozentualen Überlebensraten von Tag 12 logarithmisch gegen die applizierte Dosis aufgetragen.

Die in Abbildung 24 dargestellte Schulterkurve ist durch die Parameter  $A_0$ ,  $A_q$  und  $n$  charakterisiert. Die Werte von  $A_0$  und  $A_q$  werden geometrisch aus dem Diagramm bestimmt und nehmen für die in Abbildung aufgeführte Schulterkurve folgende Werte an:

$$A_0 = 1\text{Gy}$$

und

$$A_q = 3,4\text{Gy}.$$

Die Werte  $A_q$  und  $A_0$  stehen mit dem Parameter  $n$  in Beziehung:

$$A_q = A_0 \cdot \ln n$$

bzw.

$$n = e \left[ \frac{A_q}{A_0} \right] .$$

Der anhand der Formel errechnete Wert von  $n = 29,96$ , der in Prozent ausgedrückt 2996 ergibt, deckt sich mit dem geometrisch ermittelten Wert von ca. 3000. Man erhält den Wert von  $n$  geometrisch, indem man den linearen Teil

der Schulterkurve durch eine Gerade so weit verlängert bis er die Ordinate schneidet.

Der Wert von  $n$  wird als die Anzahl strahlenempfindlicher Bereiche in Säugetierzellen bzw. in diesem Fall humanen aortalen glatten Muskelzellen verstanden, die mindestens einmal getroffen werden müssen, um die Zelle im Wachstum zu inhibieren bzw. die Zelle unfähig macht, Kolonien aus 50 oder mehr Zellen zu bilden. Aus den gewonnenen Daten lässt sich somit z.B. ableiten, dass mindestens 30 Treffer auf strahlenempfindliche Bereiche einer glatten humanen aortalen Gefäßmuskelzelle in vitro nötig sind, um sie bis zur Mitte der Kinetik daran zu hindern Kolonien (mit 50 oder mehr Zellen) zu bilden. Die Variablen  $A_q$  und  $n$  charakterisieren zusammen die Breite der Schulter bzw. des nicht-linearen Kurventeils. Die Schulter ist ein Maß für die Regenerationsfähigkeit und das Reparationsvermögen der Zellen von Strahlenschäden. Gäbe es keine Schulter, wäre  $n = 1$  und  $A_q = 0$ . Der Parameter  $A_0$  liegt mit dem Wert 1Gy in dem engen Dosisbereich von 0,75 bis 1,5Gy, der für Säugetierzellen charakteristisch ist.

### 3.2.4. Koloniebildungsassays der Kombinationsbehandlung von Meclofenaminsäure und $^{90}\text{Y}$ trium

Alle Experimente mit unterschiedlichen Einzel-Konzentrationen an Meclofenaminsäure führen, sofern klonogene Aktivität vorhanden ist, zu einer Verminderung der KoBi-Zahlen im zeitlichen Verlauf der Kinetik. Bei allen Versuchsgruppen mit Bestrahlungs-Einzelbehandlung hingegen lassen sich gegen Ende des Beobachtungszeitraumes steigende Koloniebildungsraten nachweisen.

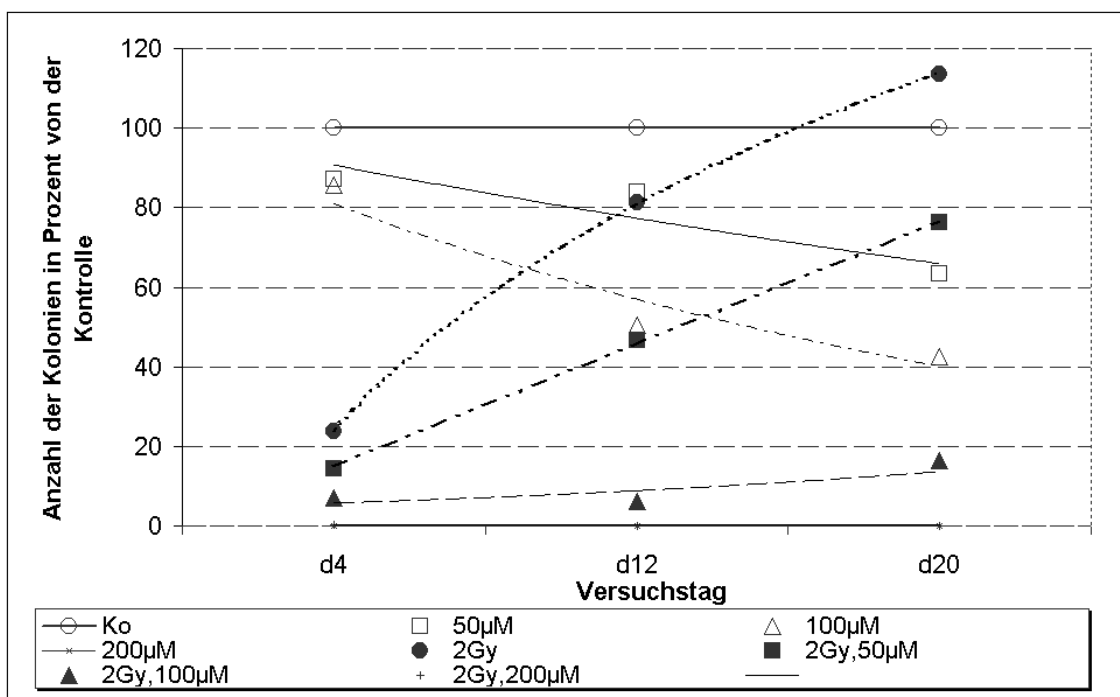
Die Kombinationseffekte von MFS+ $^{90}\text{Y}$  sind für die gleichen Bedingungen untersucht worden wie diejenigen, die für die PK gewählt wurden.

Aus Abbildung 25 lässt sich entnehmen, dass die Zugabe von MFS in einer Konzentration von 50 $\mu\text{M}$  zu einer Bestrahlung von 2Gy deren Erholungseffekt, d.h. die Zunahme der klonogenen Aktivität zum Ende der Kinetik hin, deutlich

abschwächt, was daran erkennbar ist, dass die Graphen von 2Gy und 2Gy, 50µM nicht parallel versetzt sind sondern auseinander laufen.

Aber auch schon an Tag 4 nach Behandlungsbeginn ist die klonogene Aktivität der Kombination aus 2Gy und 50µM um 39% geringer als diejenige der 2Gy-Gruppe, wohingegen die MFS Einzelbehandlung mit 50µM die Kontroll-KoBis nur um 13% unterschreitet.

**Abbildung 25: Kombinationsbehandlung mit 2Gy und MFS**



*In der Graphik sind die Mittelwerte der gebildeten Kolonien der einzelnen Behandlungsbedingungen in Prozent von der Kontrolle wiedergegeben.*

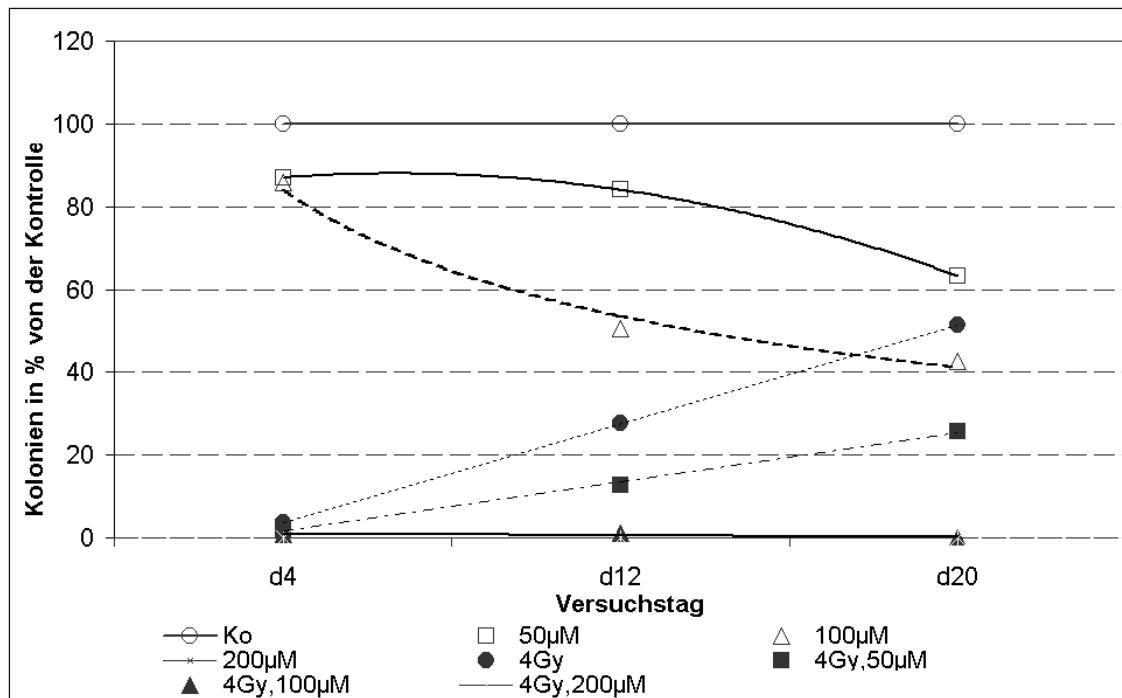
Die Anzahl der Kolonien der 2Gy,100µM Gruppe, die an Tag 4 nur 29% der 2Gy-Gruppe ausmacht und damit einen um 57% höheren hemmenden Effekt ausmacht als die 100µM Einzelbehandlung im Vergleich zur Kontrolle, bleibt bis Tag 12 im Verhältnis zur Kontrolle weitgehend konstant und steigt dann leicht von 6% auf 16% an. Trotzdem halbiert sich die (überadditive) Effizienz des

hemmenden Kombinationseffektes bis Tag 20 auf 17,79% wegen des deutlichen Abfalls der Koloniebildungsrate der 100 $\mu$ M-Gruppe.

Die koloniebildenden 4Gy-Gruppen der Kombinationsbehandlungen (i.e. 4Gy,50 $\mu$ M, 4Gy,100 $\mu$ M) bestätigen, dass die Addition von MFS zu strahlungsexponierten Zellen deren Erholungstendenz nach Bestrahlung deutlich und dosisabhängig abschwächt. In Abbildung 26 liegen die Werte der auf die Kontrolle bezogenen klonogenen Aktivitäten an Tag 4 bei 4Gy, 4Gy+50 $\mu$ M und 4Gy+100 $\mu$ M dicht beieinander und laufen dann geradlinig und konstant auseinander.

Obwohl die MFS-Einzelbehandlung konzentrationsabhängig während des Beobachtungsintervalls die Koloniebildungsfähigkeit in unterschiedlichem Maße inhibiert, fällt auf, dass die 4Gy+MFS Gruppen die gleiche lineare Kurvenform wie die 4Gy Einzelbehandlung behalten und sich nur in ihrer Anstiegssteilheit unterscheiden, welche konzentrationsabhängig abnimmt.

Die Fähigkeit Kolonien zu bilden ist bei der 4Gy,100 $\mu$ M Gruppe an Tag 20 erloschen, bei der 4Gy,50 $\mu$ M Gruppe kommt es immerhin noch zwischen Tag 4 und Tag 20 zu einem Anstieg um das 13-fache (von 1,9% auf 25,6%).

**Abbildung 26: Kombinationsbehandlung mit 4Gy und MFS**

Das Diagramm demonstriert den Einfluss von 50µM, 100µM und 200µM MFS auf die klonogene Aktivität von glatten aortalen Muskelzellen in Einzelbehandlung und in Kombination mit einer Bestrahlung von 4Gy. Die angegebenen Daten verstehen sich als Mittelwerte der gebildeten Kolonien und sind in Prozent von der Kontrolle angegeben.

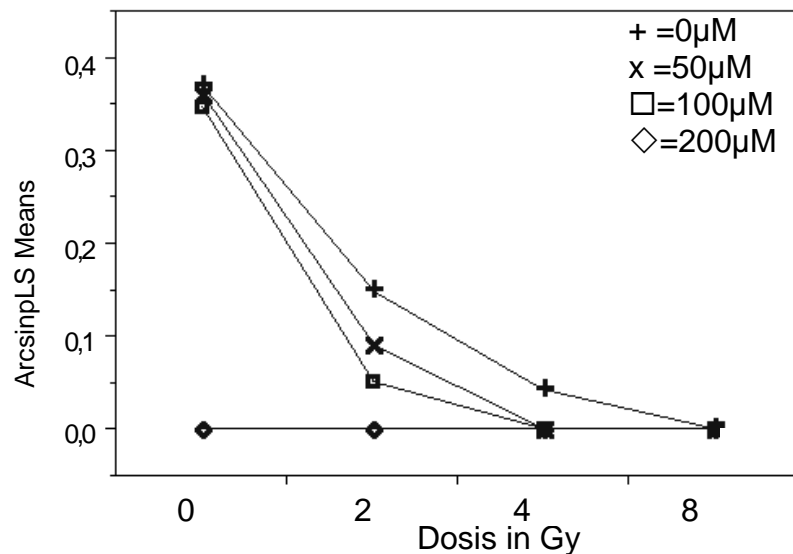
Der Anstieg der Koloniebildungsfähigkeit der Einzelbehandlung mit 8Gy von 0% an Tag 4 auf 15,7% der Kontrolle an Tag 20 kann durch Konzentrationen von 50µM Meclofenaminsäure oder höher vollständig während des gesamten 20-tägigen Beobachtungszeitraums supprimiert werden.

Koloniebildungsassays sind zwar sehr sensitiv, jedoch wenig spezifisch. Auf eine quantitative Analyse der Wechselwirkungen zwischen Medikament und radioaktivem Strahler in Bezug auch die Modulation der klonogenen Aktivität soll daher nicht näher eingegangen werden.

**Abbildung 27 a-c: Zusammenstellung der Kobis für jeden Untersuchungstag**

**Abb.27a: Kobis an Tag4**

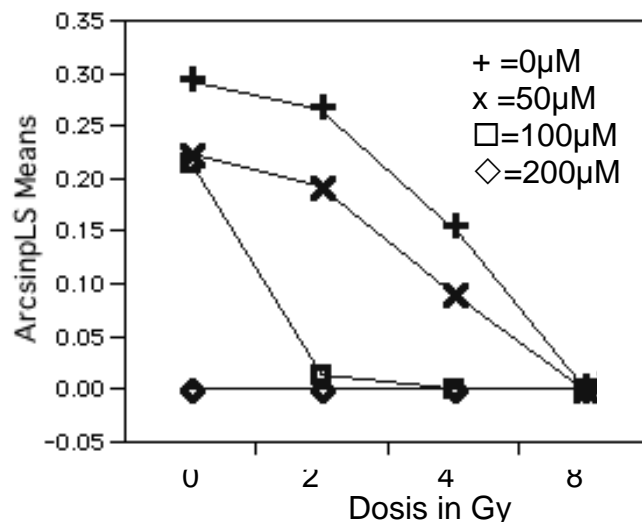
Auf der Ordinate sind die nach  $y = \arcsin(\text{MW}(\text{pKobi}))^{1/2}$  transformierten Werte aufgetragen (s.o.), auf der Abszisse die Bestrahlungsdosis-Gruppen in Gy. Jede Kurve steht dabei für eine bestimmte



Kombination mit MFS. Für die 2Gy Untergruppe zeigt sich die Aufspaltung in Abhängigkeit von der Kombination mit MFS am deutlichsten. Die 8Gy-Gruppe ist unabhängig von der eingesetzten MFS-Konzentration vollständig supprimiert.

**Abb. 27b: Kobis an Tag 12**

Deutlich zeigt sich eine Veränderung und Aufspaltung der Kurvenverläufe. Die Kombinationsbehandlungen mit niedrigen MFS-Konzentrationen (bis 50µM) zeigen einen konvexbogenen Verlauf, die 100µM Untergruppe wird durch Zusatzbestrahlung mit 2Gy schlagartig supprimiert (der Unterschied zum vollständig aufgehobenen Wachstum bei der 2Gy, 200µM-Gruppe ist statistisch nicht signifikant).





**Abb. 27c: Kobis an Tag 20**

Die Kurvenverläufe an Tag 20

sind ohne die

Proliferationskinetiken schwer

zu beurteilen, da zwei

Phänomene die

Behandlungseffekte

überlagern. Zum einen greift in

den stark proliferierten

Gruppen (0Gy, 0 $\mu$ M, 2Gy,

0 $\mu$ M) die beginnende

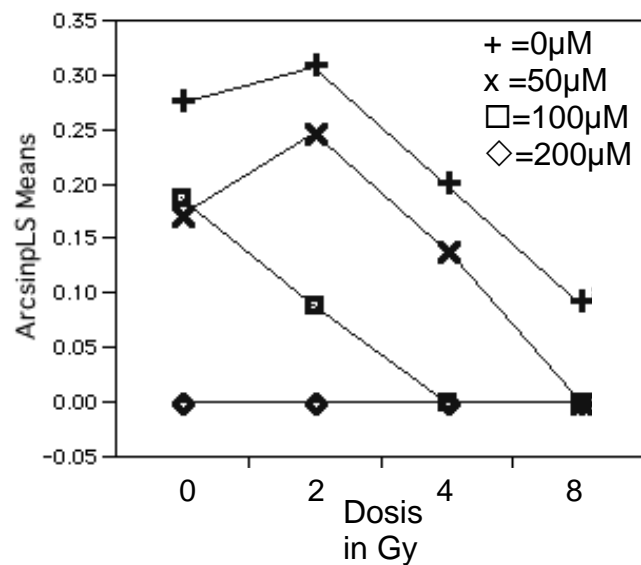
Kontaktinhibition ein und senkt

deren Kobiraten, zum anderen können überlebende Zellen in den

Hochdosisgruppen, die nach Bestrahlungsende an Tag 4 in der

Zellkulturflasche proliferiert sind, nach dem Aussäen in die Kobiwells an Tag 20

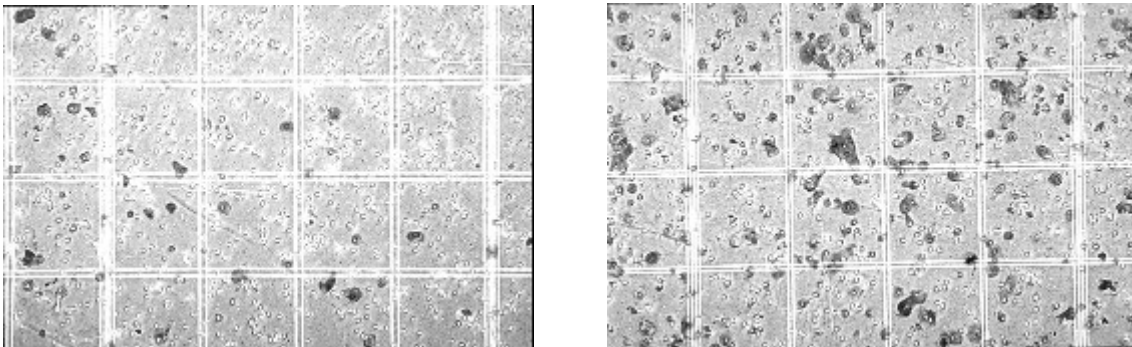
zu verfälschten überhöhten Werten führen.



### 3.4 Ergebnisse Migrationen

Während der vierstündigen Inkubationszeit migrieren unter den gewählten Versuchsbedingungen an Tag 4 nach Beginn der Behandlung (bzw. an Tag 6 nach der letzten Passage) im Mittel ca. 60 haSMCs der unbehandelten Kontrollgruppe pro  $\text{mm}^2$  Membranfläche. Die Zellen heften sich an die Unterseite der Membran und breiten sich dort aus, nachdem sie die  $8\mu\text{m}$  Pore durchwandert haben. Als Differenzierungshilfe sind die Zellen nach Fixierung zusätzlich zur Coomassie-Färbung noch nach Giemsa gefärbt worden um die Zellkerne deutlicher hervorzuheben.

**Abbildung 28: Migrierte Zellen mit Porenmembran auf dem Zählraster der Fuchs-Rosenthal Kammer**



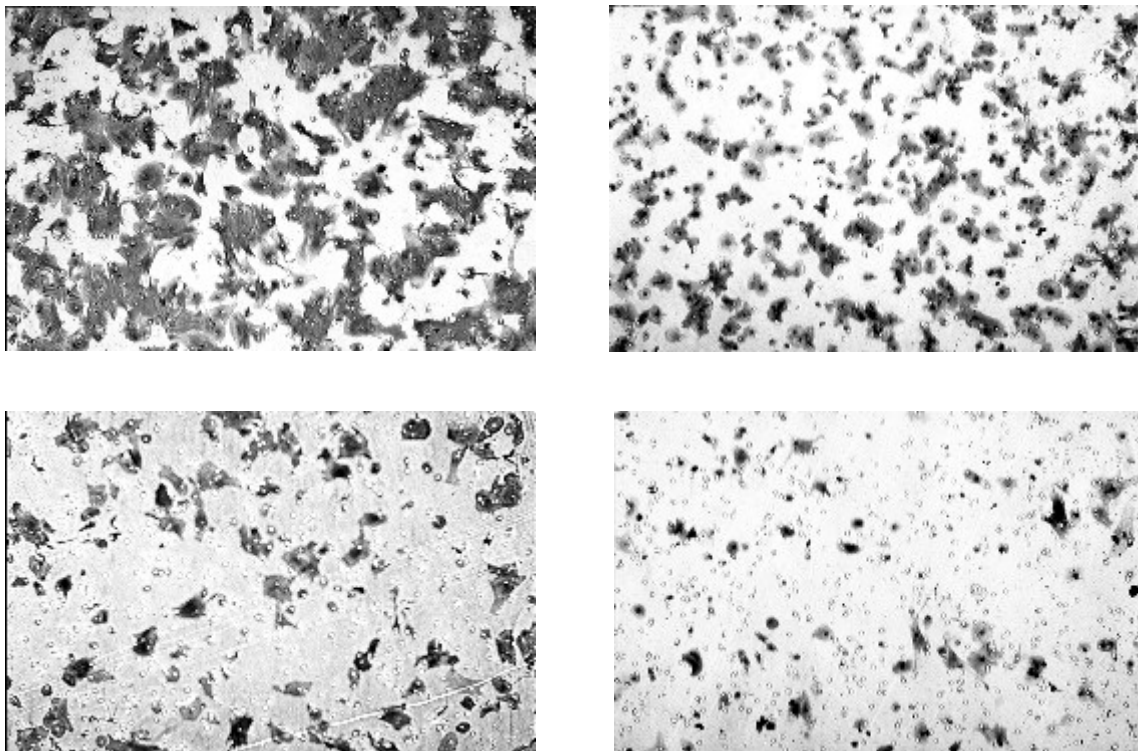
*Die Fotos zeigen je einen Ausschnitt der Porenmembran mit migrierten Zellen, die auf einer Fuchs-Rosenthal Kammer liegt. Ein abgebildetes Quadrat hat eine Kantenlänge von  $62,5\mu\text{m}$ , sodass 16 Quadrate die Fläche von  $1\text{ mm}^2$  einnehmen.*

Jede angefärbte Zelle in dem zuvor mit einem Q-Tip ausgeriebenen Areal wird als migrierte Zelle gezählt, da mikroskopisch nicht differenzierbar ist, auf welcher Seite der Membran sich eine Zelle befindet und angenommen wird, dass die Porenmembranoberseite vollständig durch das Q-Tip von Zellen gereinigt worden ist. Bei der Auswertung werden auch angefärbte Zellen berücksichtigt, die sich noch in den Poren befinden, d.h. einerseits durch den Q-Tip nicht entfernt werden können, sich aber andererseits auch noch nicht an

der Membranaussenseite ausgebreitet haben. Großflächig ausgebreitete Zytoplasmafragmente ohne nachweisbaren Zellkern erschweren gerade bei wenig migrierenden Zellen oft die eindeutige Zuordnung.

Analog zur statistischen Auswertung der übrigen Experimente werden auch bei den Ergebnissen der Migrationsversuche die Werte zur Stabilisierung der Varianzen transformiert (hier:  $\log_{10}$ -Transformation), danach die Mittelwerte gebildet und die Teststatistik angewendet (hier: Tukey-Kramer-Test mit Festsetzung von  $\alpha$  auf 5% Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art) und die durch Rücktransformation erhaltenen (geometrischen Mittel-) Werte zur graphischen Darstellung gebracht.

**Abbildung 29: Migrierte Zellen der verschiedenen Bestrahlungsgruppen unter PDGF-Stimulation**



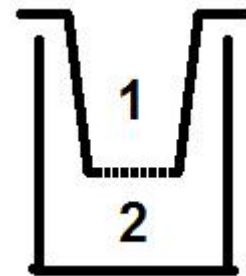
*Die Fotos zeigen Ausschnitte der Porenmembranen mit angefärbten, migrierten Zellen. Links oben ist die Kontrolle abgebildet, rechts oben die mit 2Gy behandelten Zellen, links unten die mit 4Gy bestrahlten Zellen und rechts unten die 8Gy-Gruppe. Jedes Bild ist mit derselben Vergrößerung aufgenommen*

worden. Deutlich erkennt man die dosisabhängige Reduktion der migrierten Zellen und die unterschiedliche Ausbreitung unter der Membran.

Die Anreicherung des Mediumanteils mit PDGF (=platelet derived growth factor) in einer Konzentration von 40ng/ml im unteren Kompartiment der Versuchsanordnung, in dessen Richtung die Zellen die Membran migrieren sollen, steigert die Zahl der Zellen, die die Poren passieren, um ca 100%.

### **Abbildung 30: Schema des Migrationsassays**

Die rechts stehende Zeichnung verdeutlicht die Anordnung der Kompartimente und die Lage der zu durchwandernden Membran. Das Kompartiment „1“ wird mit der Zellsuspension befüllt und das Kompartiment „2“ mit Medium und ggf. mit PDGF angereichert.

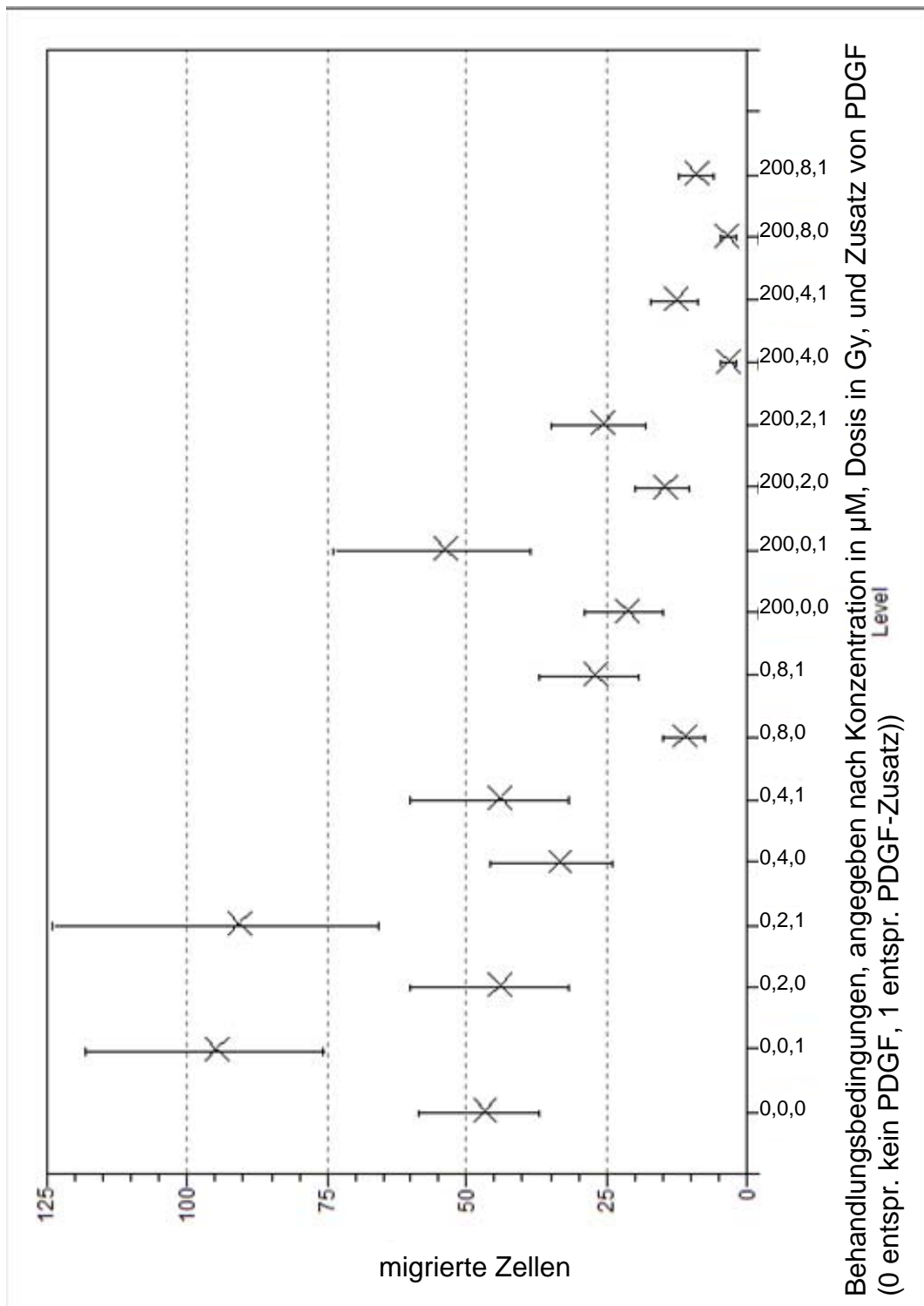


Unabhängig von Behandlungsqualität (also der Bestrahlung und/oder vom Zusatz des Medikamentes) oder Behandlungsquantität (Konzentration bzw. Dosis) migrieren also ca. doppelt so viele Zellen die Porenengstellen, wenn über der Membran ein PDGF-Konzentrationsanstieg in Richtung auf das jenseits der Membran liegende Kompartiment („Komp. 2“ in Abb. 3) besteht (Anzahl der im geometrischen Mittel migrierten Kontroll-Zellen in der PDGF-stimulierten Gruppe= ca. 95).

Die Migrationsversuche, die im Rahmen des Ansatzes 1 mit low-dose MFS behandelten Zellen durchgeführt wurden, liefern lediglich Kontrollzellzahlen von ca. 40 migrierten Zellen pro mm<sup>2</sup>. Jedoch zeigt sich hierbei ebenso, dass PDGF als Migrationsstimulanz die Anzahl der migrierenden Zellen verdoppelt.

Die Mittelwerte der durchgeführten Messreihen liefern für die mit 10µM MFS behandelten Zellen einen leichten (, statistisch jedoch nicht signifikanten) Anstieg der ausgewanderten Zellen sowohl in der PDGF-stimulierten als auch in der nicht stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle und erniedrigte Werte für 25µM und 50µM, die sich ebenfalls aber nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden.

**Abbildung 31: Ergebnisübersicht der Migrationsversuche**



In Abbildung 30 sind die verschiedenen Untersuchungsbedingungen (auf der X-Achse) und die jeweiligen durch die Porenmembran migrierten Zellen in absoluten Zahlen (auf der Y-Achse) wiedergegeben. Der entsprechende

Mittelwert ist durch ein „X“ gekennzeichnet, die Standardabweichungen sind durch die von den Mittelwerten ausgehenden, parallel zur Y-Achse verlaufenden Linien angegeben. Die Mittelwerte der Untersuchungsbedingungen, die sich lediglich durch die Zugabe von PDGF unterscheiden, sind aus Übersichtsgründen mit einer gestrichelten Linie verbunden.

**Tabelle 5: Übersicht: Statistik der Migrationsversuche**

Untersuchungs- bedingung	Mittelwerte
<b>0,0,1 A</b>	<b>94.49</b>
<b>0,2,1 A B</b>	<b>90.41</b>
<b>200,0,1 A B C</b>	<b>53.71</b>
0,0,0 B C	46.74
0,2,0 B C D	43.90
<b>0,4,1 B C D</b>	<b>43.82</b>
0,4,0 C D	33.40
<b>0,8,1 C D E</b>	<b>26.88</b>
<b>200,2,1 C D E</b>	<b>25.47</b>
200,0,0 D E F	21.18
200,2,0 E F G	14.59
<b>200,4,1 E F G</b>	<b>12.58</b>
0,8,0 F G	10.90
<b>200,8,1 G</b>	<b>8.97</b>
200,8,0 H	3.36
200,4,0 H	3.33

In der Tabelle sind in der linken Spalte die einzelnen Untersuchungsbedingungen aufgelistet, rechts stehen die geometrischen Mittelwerte. Untersuchungsbedingungen, die nicht durch den gleichen Buchstaben mit einander verbunden sind, unterscheiden sich signifikant. Die mit PDGF behandelten Zellen sind zusätzlich in fettgedruckten Schriftzeichen markiert.

Betrachtet man zunächst nur die Zellzahlen der bestrahlten, nicht aber mit MFS-angereichertem Medium exponierten Zellen, so fällt auf, dass lediglich die höchste gewählte Strahlendosis von 8Gy in der Untergruppe ohne PDGF-Zusatz das Migrationsverhalten der Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant hemmt. Bei der Untergruppe mit PDGF-Zusatz sind zwar die 4Gy- und die 8Gy-Gruppen von der Kontrolle verschieden, jedoch nicht untereinander. Bei den mit 200µM MFS behandelten Zellen sind die zusätzlich mit 2Gy bestrahlten Gruppen von der 200,0,0-Gruppe nicht signifikant verschieden, hingegen aber die zusätzlich mit 4Gy und 8Gy bestrahlten Zellen. Diese

Beobachtung ist hierbei unabhängig von dem Einsatz von PDGF als Migrationsstimulanz.

Interessanterweise vermag der alleinige Zusatz von 200 $\mu$ M MFS in der PDGF-stimulierten Untergruppe das Migrationsverhalten der Zellen nicht statistisch signifikant zu hemmen, obwohl diese Konzentration das Wachstumsverhalten vollständig supprimiert (s. Proliferationskinetiken und Koloniebildungsassays). Diese Feststellung ist aber auch auf die große Streubreite der Werte zurückzuführen – immerhin ist die Differenz für die Mittelwerte von 95 in der Kontrolle und 54 bei der 200,0,1-Gruppe deutlich. Für die nicht mit PDGF-stimulierten Zellen ist der Unterschied zwischen der Kontrolle und der 200 $\mu$ M MFS-Gruppe signifikant. Dies gilt auch für alle anderen Wertepaare, die sich nur in der Vorbehandlung mit MFS unterscheiden.

Für die nicht mit PDGF-stimulierten und mit 4Gy bestrahlten Zellen hat die Vorbehandlung mit 200 $\mu$ M-MFS den größten hemmenden Effekt auf das Zell-Wanderungsverhalten, bei den Untergruppen ohne PDGF sind es die 2Gy und die 4Gy-Fractionen.

Für die intensivst behandelten Kombinationen (Level 200,4,0 oder 200,8,0) kann angenommen werden, dass die Fähigkeit zur Migration ohne PDGF-Zusatz praktisch erloschen ist.

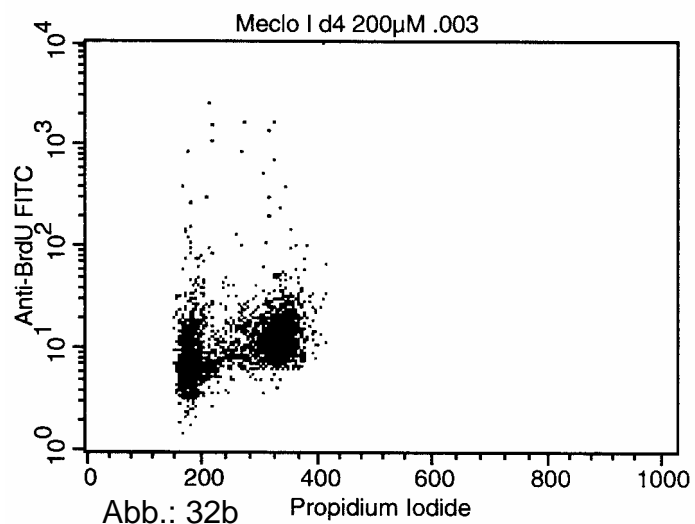
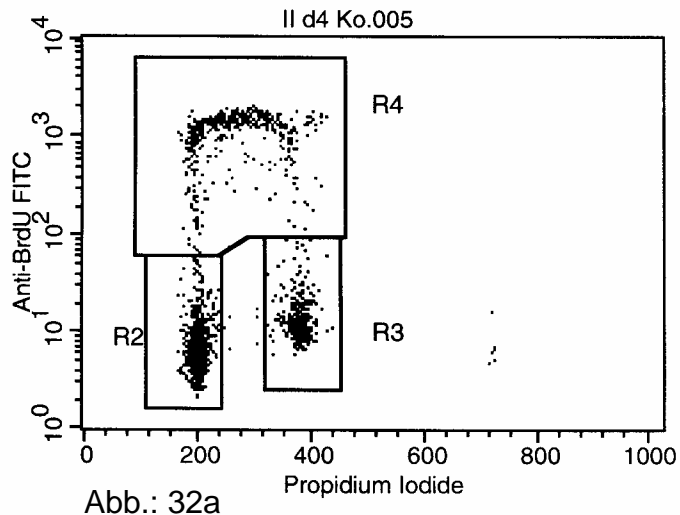
Aufgrund der einzeitig festgesetzten Messung an Tag 4 werden die Zellen nicht auf Erholungseffekte post radiatio untersucht.

## 3.5. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

### 3.5.1. Punktwolken-Diagramme

#### Abbildung 32a-c: FACS-Diagramme

Die Abbildungen zeigen drei FACS-Diagramme als Punktwolke. Es sind die Ergebnisse einer Kontrolle (Abb. 1a), einer 200 $\mu$ M Probe (Abb. 1b) und einer 8Gy, 200 $\mu$ M Probe (Abb. 1c) dargestellt. Die Zellkerne sind anhand ihres Fluoreszenzmusters, das sie nach Markierung mit Propidium-Iodid (Abszisse) und einem gegen einen Anti-BrdU Antikörper gerichteten Antikörper (Ordinate) erhalten, in den Diagrammen aufgetragen. Die Punkte im Kästchen „R2“ im ersten Diagramm entsprechen Zellkernen der G<sub>1</sub>-Phase, die Kerne im „R4“-Sektor werden der S-Phase zugeordnet und der mit „R3“ beschriftete Rahmen umschließt Nuklei in der G<sub>2</sub>/M-Phase.



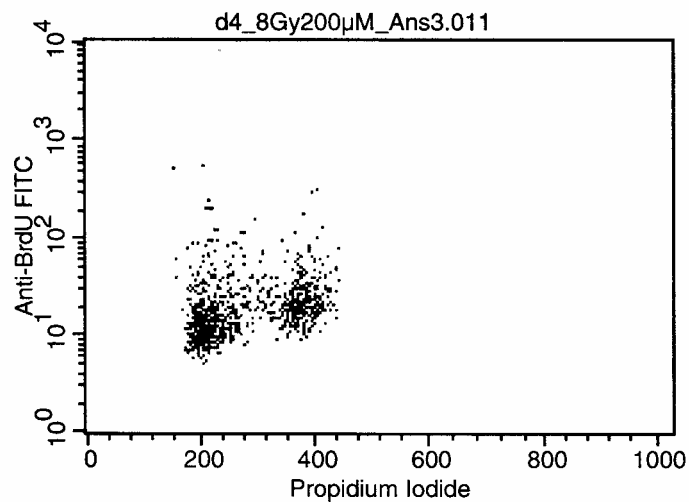
Es lässt sich anhand der Punktwolken eine deutliche Anreicherung in der G<sub>2</sub>/M-Phase in den dargestellten behandelten Zellproben erkennen. Die



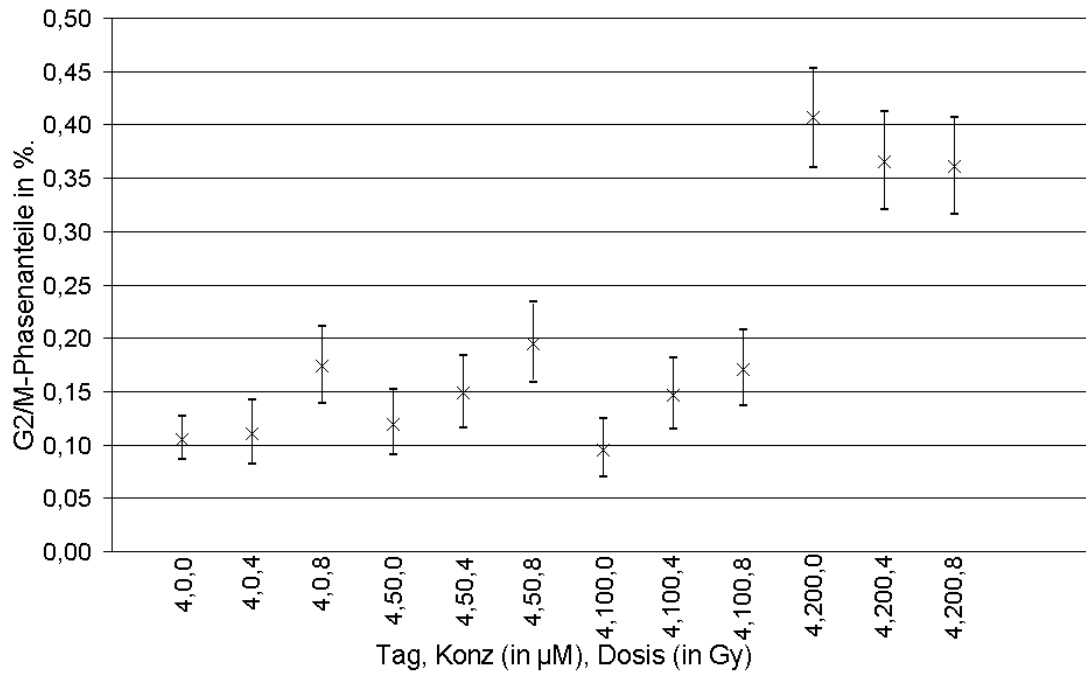
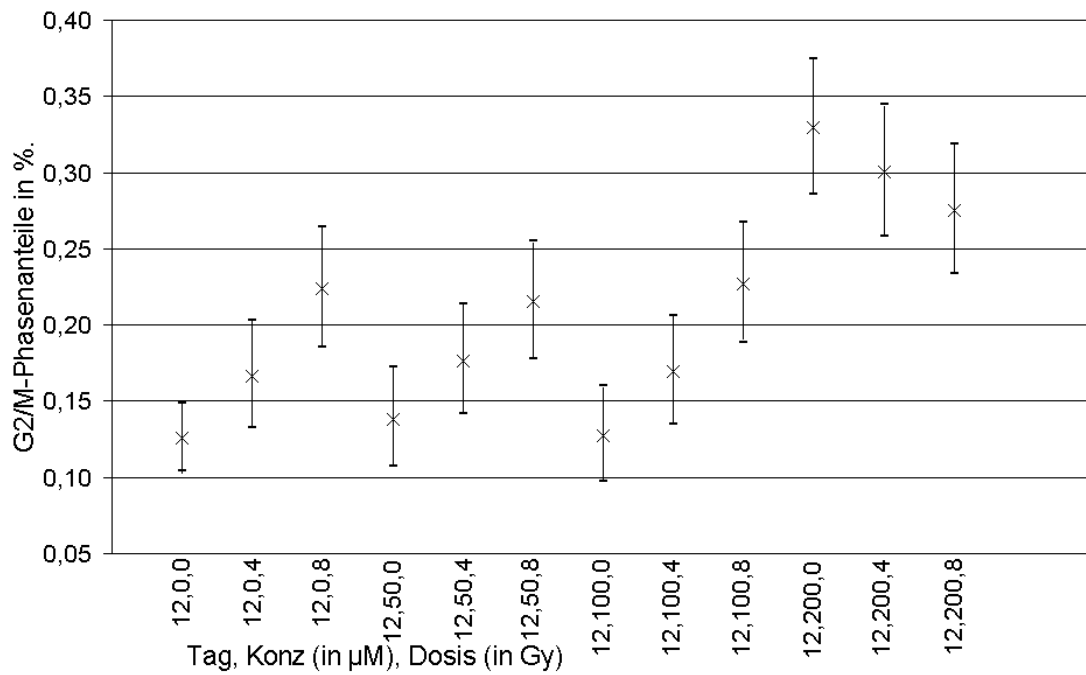
Punktwolken werden dabei weniger dicht, breiter und verschwommener. Ein S-Phasen-Anteil ist bei der mit 8Gy und 200 $\mu$ M MFS behandelten Probe an Tag 4 kaum

ausmachbar. Auch der G<sub>1</sub>-Phasenanteil ist bei diesen Proben stark reduziert.

Entsprechend der statistischen Auswertung der übrigen Experimente werden auch bei den



Ergebnissen der FACS-Analysen die Werte zur Stabilisierung der Varianzen transformiert (hier: arcsin-Transformation), danach die Mittelwerte gebildet und die Teststatistik angewendet (hier: Tukey-Kramer-Test mit Festsetzung von  $\alpha$  auf 5% Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art) und die durch Rücktransformation erhaltenen (geometrischen Mittel-) Werte zur graphischen Darstellung gebracht.

3.5.2. G<sub>2</sub>/M-Phase**Abbildung 33: G<sub>2</sub>/M-Phasenverteilung an Tag 4****Abbildung 34: G<sub>2</sub>/M-Phasenverteilung an Tag 12**

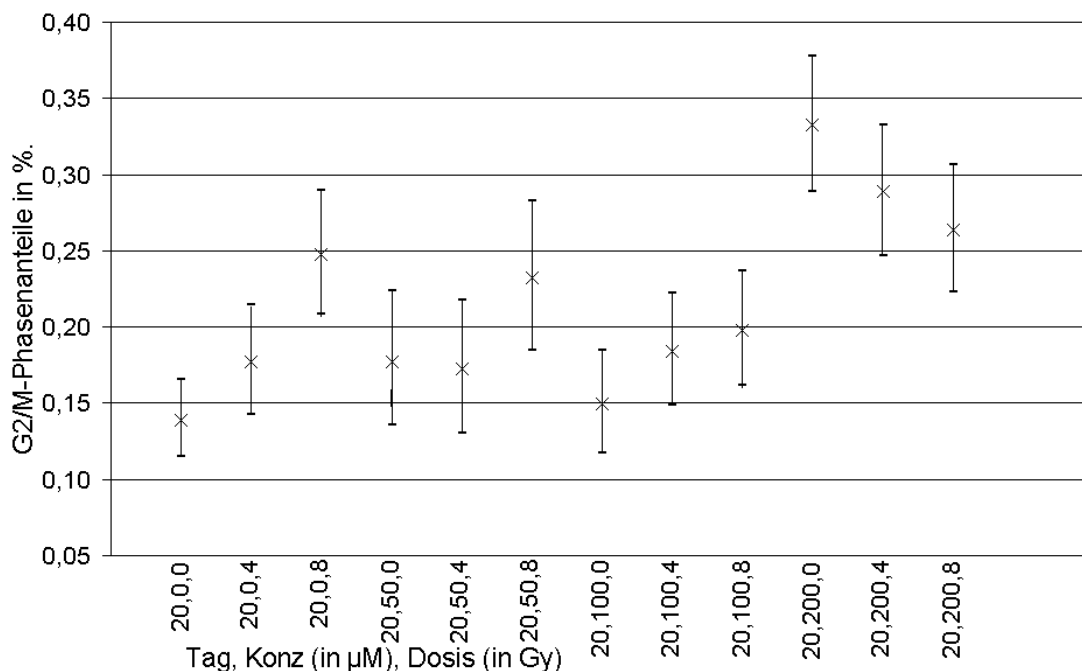
**Abbildung 35: G<sub>2</sub>/M-Phasenverteilung an Tag 20**

Abb. 33-35: In den Graphiken sind die prozentualen Verteilungen der einzelnen Versuchsbedingungen an je einem Behandlungstag zur Darstellung gebracht worden. Die geometrischen Mittelwerte sind dabei durch ein „X“ gekennzeichnet, die 95%-Konfidenzintervalle sind durch die von den Mittelwerten ausgehenden senkrechten Linien markiert.

Die einzelnen Anstiege oder Abfälle innerhalb einer bestimmten Behandlung bzw. Behandlungskombination während des Beobachtungszeitraumes erreichen keine statistische Relevanz.

Die Experimente mit low-dose Konzentrationen an MFS (10µM, 25µM und 50µM) ergeben einen sehr geringen Anstieg der Kontrollzellenfraktion in der G<sub>2</sub>/M-Phase, dem die behandelten Zellen folgen. Die gemessenen Unterschiede der einzelnen low-dose-Gruppen zur Kontrolle erweisen sich dabei als nicht signifikant.

Eine nahezu konstante G<sub>2</sub>/M-Phasendistribution im Verlauf der Zeit zeigen die unbehandelten Zellen des zweiten Ansatzes, der die Hoch-Konzentrationsfraktion der MFS-Behandlungen miteinschließt (i.e. 100µM und

200 $\mu$ M). Von nahezu identischen Werten zwischen Kontrolle und 100 $\mu$ M-Gruppe an Tag 4 spaltet sich die 100 $\mu$ M-Gruppe auf und erreicht an Tag 20 einen über 50% höheren Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase (vgl. Abbildungen 33-35). Diese Differenz liefert allerdings im Tukey-Kramer Test wegen der größeren Wertestreuung einen nicht signifikanten Unterschied.

Ein Phasenblock im Übergang zur Mitose-Phase macht sich allerdings sehr deutlich bei der 200 $\mu$ M-Gruppe bemerkbar. Hier nimmt der prozentuale Anteil an Zellen innerhalb dieser Gruppe in der G<sub>2</sub>/M-Phase zwar zu Tag 20 hin (in nicht signifikanter Weise) ab, mit einer Abnahme von 40% auf 33% an Tag 20 ist die Fraktion dann aber immer noch fast 2,5 mal größer als diejenige der Kontrolle an Tag 20.

Auch eine hohe Strahlenexposition scheint glatte humane aortale Muskelzellen vermehrt in der G<sub>2</sub>/M-Phase zu arretieren und somit die Zellzykluspassage zu verhindern, was sich in einem Anstieg des Prozentsatzes der (nicht synchronisierten) Zellen in dieser Phase äußert. Dieser Anteil ist dabei umso größer, je höher die eingesetzte Dosis gewählt wird. Im Vergleich zur 4Gy-Gruppe erreicht allerdings nur die 8Gy-Gruppe an den Tagen 12 und 20 einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Auch bei den Kombinationsbehandlungen mit MFS kann eine Zusatzbestrahlung von 4Gy den G<sub>2</sub>/M-Phasenanteil im Vergleich zur MFS-Einzelbehandlung nicht nennenswert erhöhen. Je höher die einzelnen MFS-Konzentrationen in den Behandlungsgruppen sind, umso geringer ist der Kombinationseffekt in Hinblick auf die Phasenarretierung. Für die Kombinationen mit 200 $\mu$ M MFS erhält man sogar durchgängig niedrigere Mittelwerte für den G<sub>2</sub>/M-Phasenanteil, wenn zusätzlich bestrahlt wurde (s.u.).

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass der G<sub>2</sub>/M-Anteil der bestrahlten Zellen von Tag 4 bis Tag 20 leicht, aber kontinuierlich ansteigt, wohingegen bei der Proliferationskinetik steigende Wachstumszahlen und bei den Koloniebildungsassays eine gegen Tag 20 zunehmende klonogene Aktivität auf

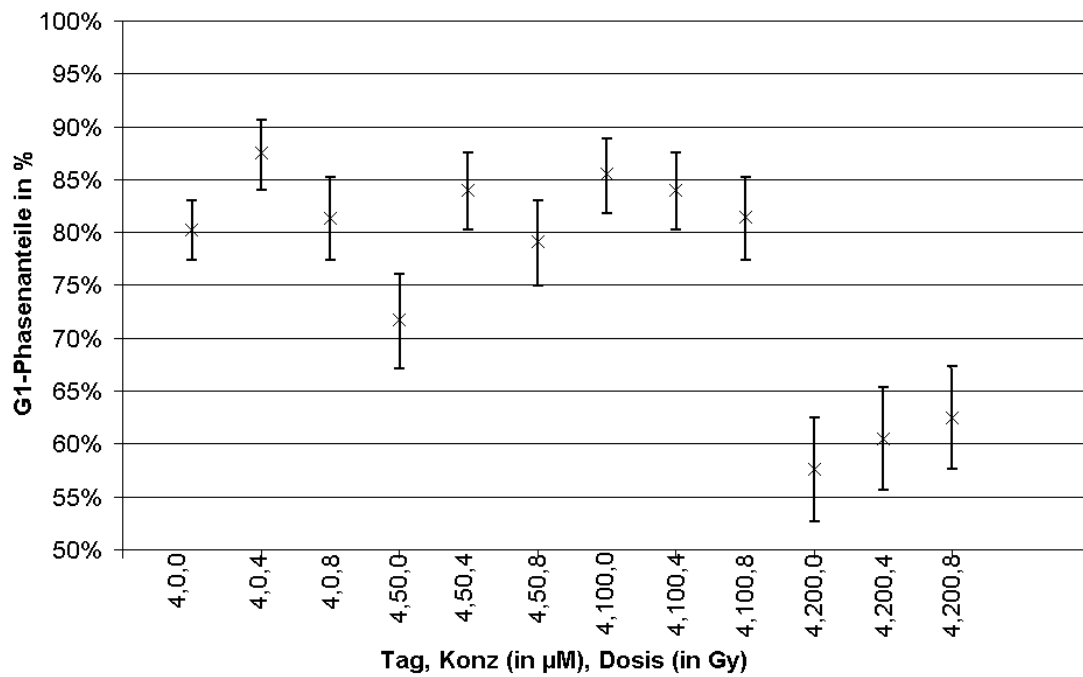
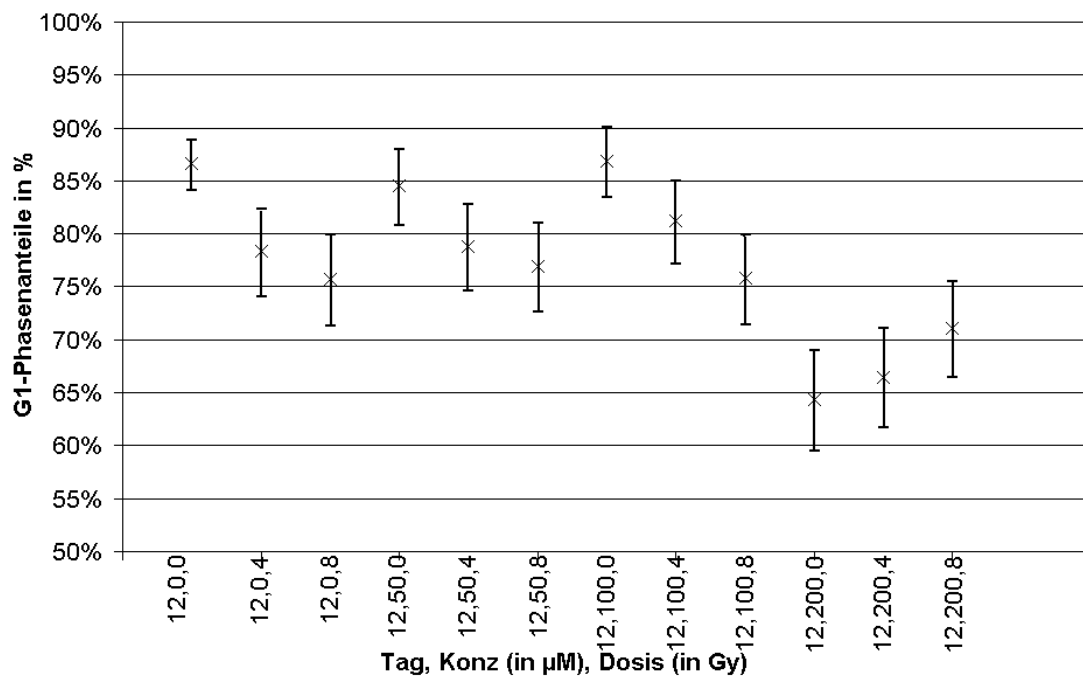
Erholungsphänomene bzw. wiedereinsetzende und steigende Proliferation nach Beendigung der Bestrahlung an Tag 4 schließen lassen.

Diese scheinbar nur schwer miteinander zu vereinbarende Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass zwar der Teil der durch die Strahlung arretierten Zellen weitgehend konstant bleibt, eine kleine Fraktion strahlenresistenterer Zellen allerdings nach der Exposition ihre Proliferation steigern kann und somit steigende PK- und KoBI-Werte liefert, jedoch gegenüber den arretierten Zellen bei der Zellzyklus-Analyse nicht ins Gewicht fällt.

Die Kombinationsbehandlungen von Strahlung und 200µM MFS liegen prozentual jeweils deutlich niedriger als diejenigen der korrespondierenden MFS-Einzelbehandlungen. Möglicherweise ist diese Beobachtung darauf zurückzuführen, dass diese aggressive Behandlung die Zellzyklusprogression augenblicklich inhibiert, ohne dass die Zellen bis zu dem „check-point“ des G<sub>2</sub>/M-Phasen-Übergangs voranschreiten können.

### 3.5.3. G<sub>1</sub>-Phase

Ebenso wie in der G<sub>2</sub>/M-Phase laufen auch die Werte der Niedrig-Konzentrationsbehandlungen von Tag 4 bis 20 sehr dicht zusammen und gleichsinnig mit der Kontrolle. Die statistische Analyse ergibt für diese Gruppe (10µM, 25µM und 50µM) in Bezug zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

**Abbildung 36: G<sub>1</sub>-Phasenverteilung an Tag 4****Abbildung 37: G<sub>1</sub>-Phasenverteilung an Tag 12**

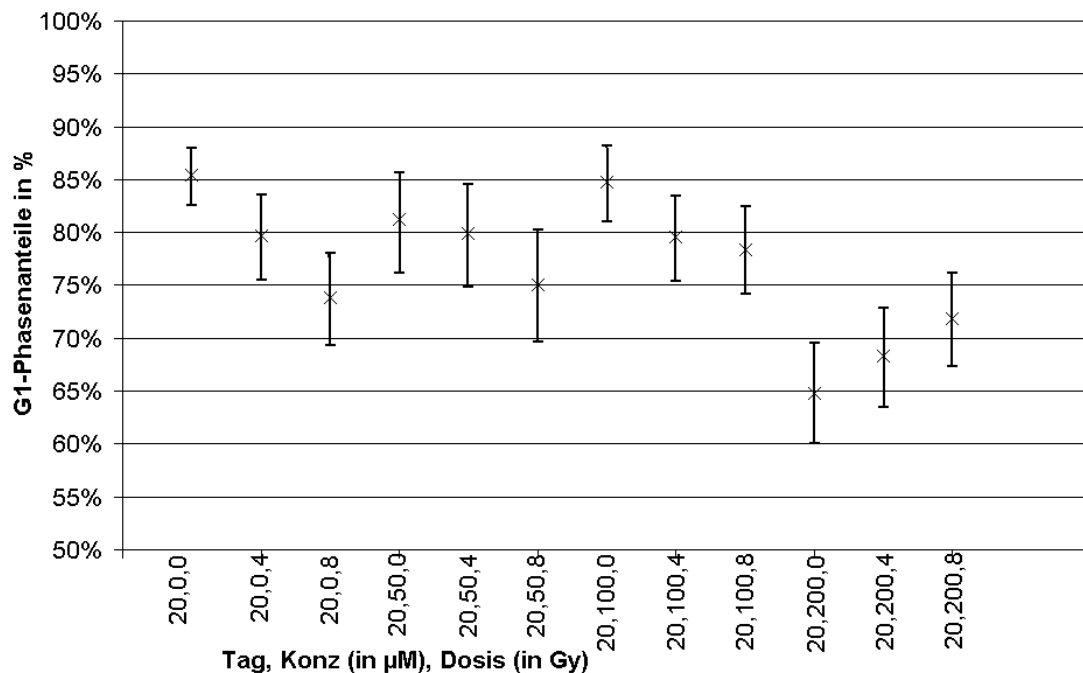
**Abbildung 38: G<sub>1</sub>-Phasenverteilung an Tag 20**

Abb. 36-38: In den Graphiken sind die prozentualen Verteilungen der einzelnen Versuchsbedingungen an je einem Behandlungstag zur Darstellung gebracht worden. Die geometrischen Mittelwerte sind dabei durch ein „X“ gekennzeichnet, die 95%-Konfidenzintervalle sind durch die von den Mittelwerten ausgehenden senkrechten Linien markiert.

In Bezug zur G<sub>2</sub>/M-Phasenverteilung ergibt sich für die Behandlungen mit hohen MFS-Konzentrationen, der bestrahlten Zellen und deren Kombinationen ein nahezu invertiertes Bild in der G<sub>1</sub>-Phase, da die S-Phasenanteile prozentual wenig ins Gewicht fallen.

Die unbehandelten Zellen verweilen relativ konstant während der drei Messtage im Zeitraum von 20 Tagen zwischen 80% und 87% in der G<sub>1</sub>-Phase. Die Phasenanteile der 100µM Gruppe, die an Tag 4 und 12 nahezu denen der Kontrolle entsprechen, fallen zu Tag 20 hin leicht ab. Der Unterschied erweist sich allerdings nicht als statistisch signifikant.

Deutlich hebt sich im Gegensatz dazu die mit 200µM behandelte Zellgruppe ab. Nur etwa 58% der Zellen in den Messproben befinden sich an Tag 4 in der G<sub>1</sub>-Phase. Dieser Anteil steigt zwar gegen Tag 20 noch leicht auf 64% an,

insgesamt befinden sich aber um ein Drittel weniger Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase als bei der Kontrolle. Bezogen auf die Einzelbehandlungen mit MFS an den einzelnen Messtagen lässt sich festhalten, dass zwar die 50µM-Proben durchgängig niedriger liegen als die Kontroll- und die 100µM-Werte, sich jedoch nur die mit 200µM MFS behandelten Zellen in (statistisch) relevantem Maße in ihrer G<sub>1</sub>-Phasendistribution von der Kontrolle unterscheiden.

Auch die bestrahlten Einzelbehandlungen mit 4Gy und 8Gy sind an späteren Messtagen zu niedrigeren Werten verschoben als die Kontrolle. Einen „Ausreißer“ bildet der Wert der 4Gy-Fraktion an Tag 4, dessen Mittelwert denjenigen der Kontrolle übersteigt. Sowohl die 4Gy- als auch die 8Gy-Gruppe fallen zu Tag 20 hin weiter mit ihrem G<sub>1</sub>-Phasenanteil ab, sodass sie Werte von 80% (bei 4Gy) bzw. 74% (8Gy) erreichen. Ähnlich wie bei der MFS-Behandlung zeigt jedoch nur die am höchsten eingesetzte Strahlendosis (8Gy) einen statistisch relevanten Unterschied zur Kontrolle.

Die prozentualen Mittelwerte der G<sub>1</sub>-Phasenverteilung der Kombinationsbehandlungen von 4Gy bzw. 8Gy mit 100µM unterscheiden sich kaum von denen der jeweiligen Einzelbestrahlungen. Die Werte alternieren um diejenigen der 4Gy und 8Gy-Gruppen. Die Kombinationen mit 4Gy bzw. 8Gy und 200µM MFS hingegen grenzen sich wieder deutlicher ab. Sie ergeben durchgängig niedrigere G<sub>1</sub>-Anteile als die korrespondierenden Einzelbestrahlungen. Von Tag 4 bis Tag 20 nehmen interessanterweise die Differenzen zwischen den bestrahlten Zellgruppen und den zusätzlich bestrahlten 200µM-Gruppen ab, da sowohl der G<sub>1</sub>-Phasenanteil der bestrahlten Gruppen abnimmt als auch der G<sub>1</sub>-Phasenanteil der 200µM-MFS+<sup>90</sup>Y-Gruppen zunimmt. Dies zeigt zum einen, dass die Kombinationsbehandlungen zu Beginn am deutlichsten die Zellen aus der postmitotischen Wachstumsphase verdrängen (was durch die nur bis Tag 4 applizierte Strahlung erklärbar ist), zum anderen aber auch, dass eine Reduktion des G<sub>1</sub>-Phasenanteils der bis Tag 4 bestrahlten Zellen gegen Ende des Beobachtungszeitraums auftritt. An Tag 20 ist die Differenz bei den 4Gy, 200µM und den 8Gy, 200µM-Proben zur Kontrolle im Tukey-Kramer Test statistisch signifikant, wohingegen der Unterschied



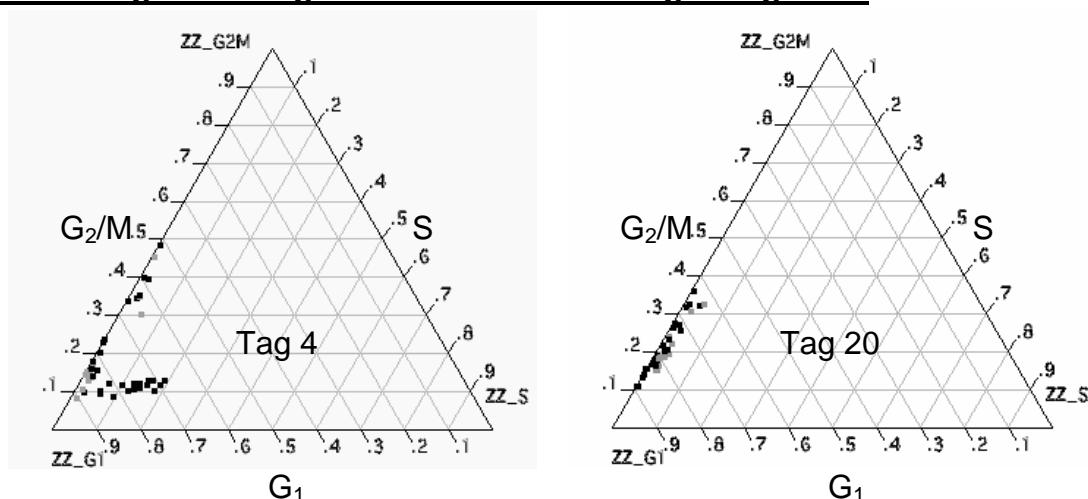
zwischen der 4Gy und der 4Gy,200 $\mu$ M-Gruppe bzw. der 8Gy und der 8Gy,200 $\mu$ M-Gruppe dieses Kriterium nicht erfüllt.

### 3.5.4. S-Phase

Die Differenzen in der S-Phase sind für die low-dose-MFS-Behandlungen in Bezug zur Kontrolle nicht signifikant.

Der Wertebereich aller Messwerte der S-Phasendistribution in der high-dose-MFS-Gruppe, den bestrahlten Zellen und den Kombinationsbehandlungen liegt nur zwischen 0,25 und 5%. Sie weisen also minimale interindividuelle Unterschiede auf und ändern sich eher in Abhängigkeit von der Zeit als von der Behandlungsart. Möglicherweise ist der „Medium-Effekt“ für die geringen S-Phasenwerte mitverantwortlich. Um das Protokoll aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit älteren Versuchsdesigns anzupassen sind Medienwechsel in Intervallen von 4 Tagen durchgeführt worden. Möglicherweise hat eine Nährstoffdeprivation des Mediums an den Versuchstagen 4, 12 und 20 mit dazu geführt, dass die Messwerte der S-Phasen gering ausgefallen sind. Außerdem bewirkt die eingesetzte Kontaktinhibition bei schneller proliferierenden Zellen zusätzlich neben dem erhöhten Nährstoffverbrauch eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. des S-Phasenanteils.

#### **Abbildung 39: Trianguläres Phasenverteilungs-Diagramm**



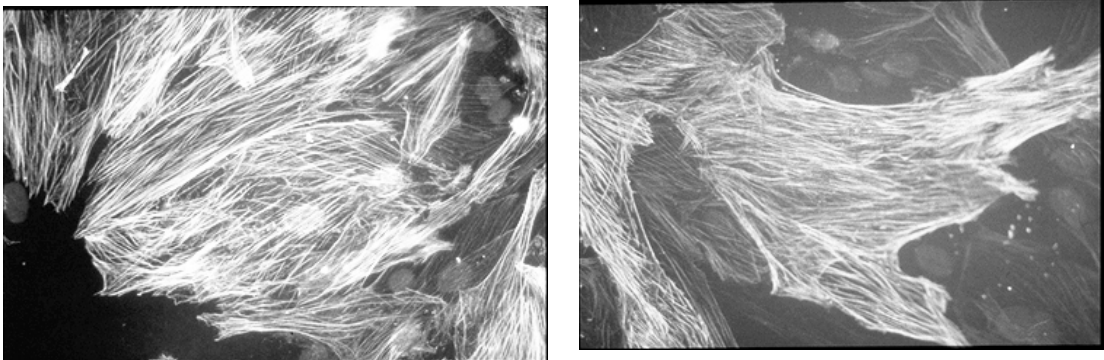
Das trianguläre Flächendiagramm links zeigt die Messwerteverteilung als Punktwolke an Tag 4, das Diagramm auf der rechten Seite diejenige an Tag 20. Insgesamt sind die Werte relativ eng gestreut. Auffällig ist die allgemeine starke Abnahme des S-Phasenanteils an Tag 20.

### 3.6. Morphologie

Mit den unbehandelten und den mit MFS inkubierten glatten humanen aortalen Muskelzellen sind Immunfluoreszenz-Färbungen an Tag 4 durchgeführt worden. Dabei sind zum einen Primär-Antikörper verwendet worden, die sich gegen das für glatte Muskelzellen typische zytoplasmatische Mikrofilament  $\alpha$ -Actin richten und des Weiteren anti-Vimentin-Antikörper. Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten und ist als Teil des zytoskelettalen Apparates für mesenchymale Zellen typisch.

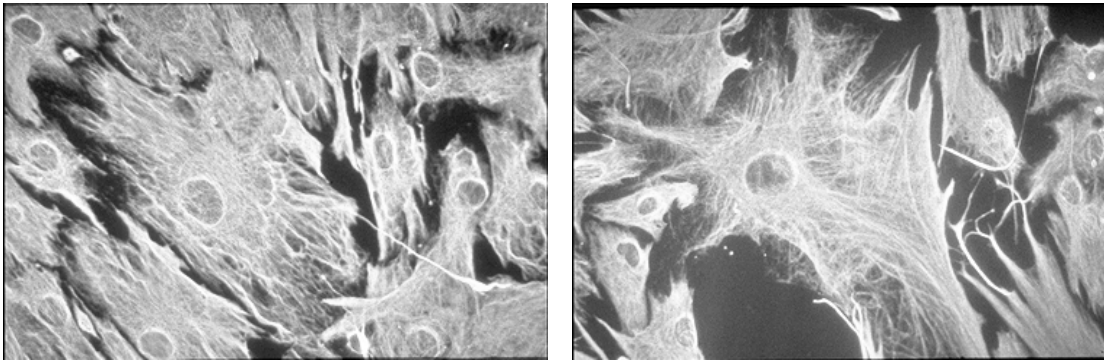
Durch das erfolgreiche immunfluoreszenztechnische Anfärben der unbehandelten Zellen ist der Nachweis erbracht, dass es sich bei den Zellen, mit denen die Experimente durchgeführt worden sind, auch tatsächlich um glatte Muskelzellen handelt. Ferner sind die mit MFS behandelten Zellen ebenfalls angefärbt worden um eventuell vorhandene zyto-morphologische Veränderungen unter einer MFS-Behandlung identifizieren zu können.

**Abbildung 40: Immunfluoreszenz-Bilder der anti- $\alpha$ -Actin-Färbung**



*Die Fotos zeigen Immunfluoreszenz Aufnahmen der anti- $\alpha$ -Actin-Färbung. Links ist ein Bild der Kontrolle und rechts ein Bild der mit 200 $\mu$ M MFS behandelten Zellen wiedergegeben. Es lässt sich unter der breiten morphologischen Variabilität der Zellen keine einheitliche Veränderung ausmachen, die die Kontrolle von den mit 200 $\mu$ M behandelten Zellen unterscheidet lässt.*

### **Abbildung 41: Immunfluoreszenz-Bilder der anti-Vimentin-Färbung**



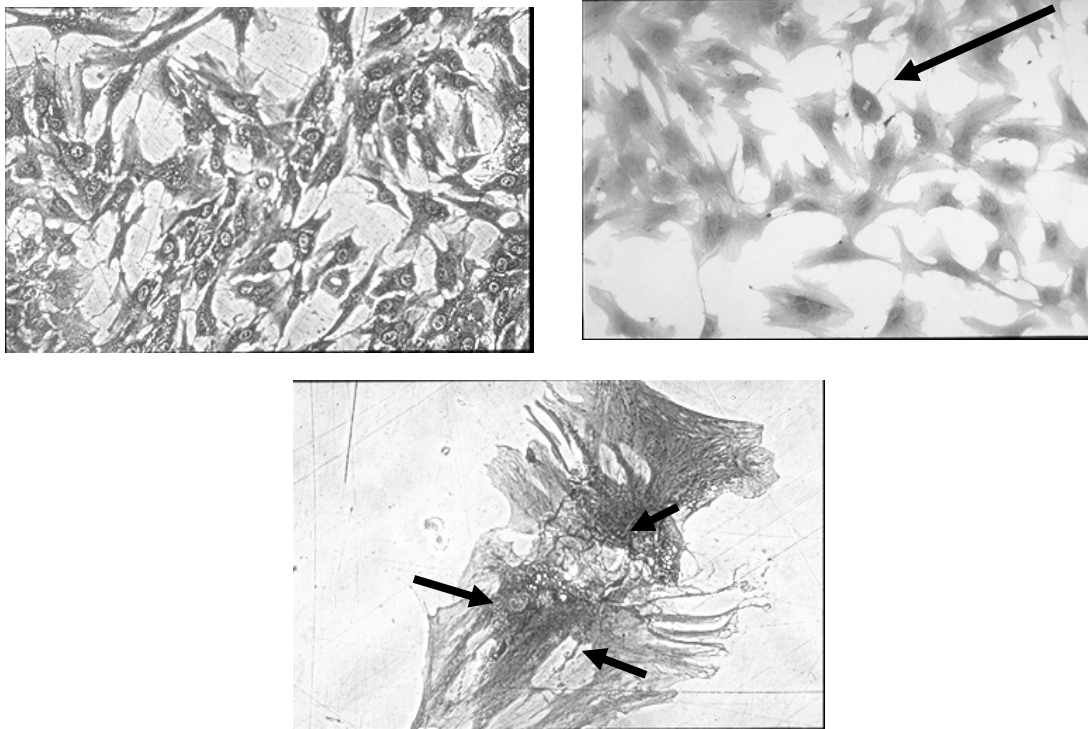
*Abbildung 41 stellt die mit anti-Vimentin-Primärantikörpern durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen dar. Die Aufnahme links zeigt die Kontrolle zu den rechts abgebildeten, mit 200μM MFS behandelten Zellen. Man erkennt rechts u.a. deutlich die sich in die Peripherie ausstreckenden Zellausläufer. Aufgrund der geringeren Zelldichte kann sich die zentral liegende Zelle weit ausbreiten. Einheitliche Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung bestehen nicht.*

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten konnte ebenfalls keine definitive morphologische Unterscheidung zwischen den mit 2Gy und 4Gy bestrahlten und unbestrahlten Zellen in der phasenkontrastmikroskopischen Beurteilung gemacht werden. Insgesamt kann die Morphologie einer Kultur von SMCs sehr heterogen sein. Vereinzelt oder dünn ausgesät liegende Zellen breiten sich großflächig aus mit einer Vielzahl von ausgefranst erscheinenden zytoplasmatischen Ausläufern. Auch die Kernmorphologie ist in Bezug auf die Zahl der Kerne (ein- oder selten zweikernig), Lage des Nukleus oder der Prominenz des Nukleolus nicht einheitlich. Vereinzelt lässt sich (eventuell bei den mit 8Gy bestrahlten Zellen häufiger) eine perinukleäre Zone ausmachen, die in der Coomassie-Färbung als Aufhellung imponiert. Auch das ausgefranste Aussehen der Zellen mit den bizarr konfigurierten Zellgrenzen scheint bei den mit 8Gy bestrahlten Zellen häufiger vorzukommen. Mit zunehmender Zelldichte richten sich die Zellkonglomerate zu parallelen Bündeln aus und nehmen ihre spindelige Form an. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz kommt es zur Ausbildung des typischen „hill-and-valley“ Musters, bei denen sich Bereiche

dichter und überkreuzender Zelllagen mit Arealen streng geordneter und weniger gedrängten Zellen abwechseln <sup>[66]</sup>.

Nährstoffmangel infolge verbrauchten Mediums lässt sich in diesem Stadium gut an der akzentuierten Zeichnung der Zellgrenzen ausmachen.

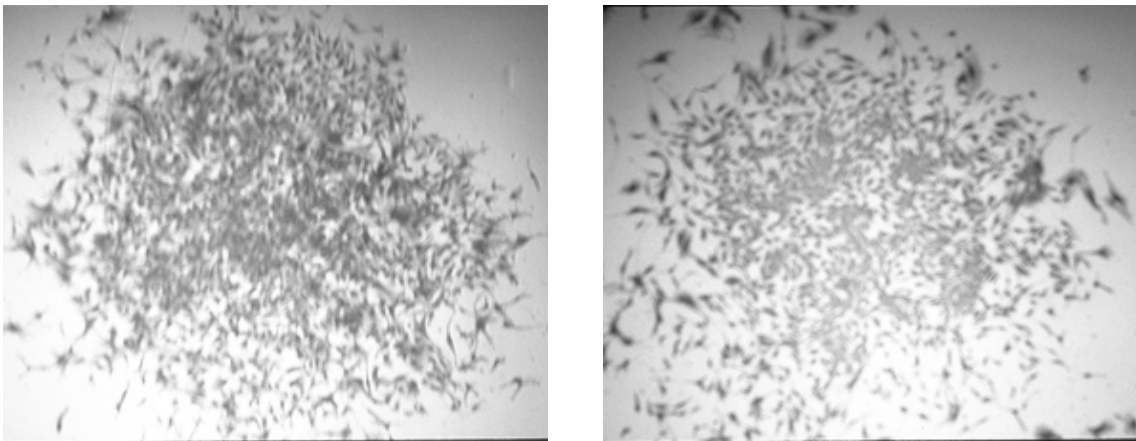
#### **Abbildung 42: Ausschnitte aus Kolonien von bestrahlten SMCs**



*Das linke obere Bild gibt einen Ausschnitt aus der Peripherie einer Kolonie der Kontrolle wieder, das rechte obere Bild aus einer Kolonie von mit 4Gy bestrahlten SMCs und das Foto in der unteren Reihe mit 8Gy bestrahlte Zellen. Der Pfeil im rechten oberen Bild deutet auf eine sich teilende Zelle, die stärker angefärbt und abgerundet ist und in der Mitte eine Aufhellung zeigt. Die Pfeile im unteren Bild sind auf Zellkerne gerichtet. Es handelt sich dabei um zwei Tochterzellen, von denen diejenige im unteren Bildabschnitt zwei Kerne aufweist und diejenige im oberen Bildabschnitt einen Nukleus. Die Mutterzelle konnte sich in den 10 Tagen Inkubationszeit also nur einmal teilen. Durch die unter dem Phasenkontrastmikroskop gewonnene Aufnahme lassen sich die schollig-blasigen Elemente der Zelle und die zerfranst wirkenden Zellausläufer besonders gut hervorheben. Nicht bestrahlte Zellen weisen, wenn auch in deutlich geringerer Ausprägung, gleiche Merkmale auf.*

Analog der Bedingungen in Zellkultur stellt sich die Zellmorphologie einer aus SMCs bestehenden Kolonie dar: Im Zentrum der Kolonie, in dem die Zellen dicht und konfluent liegen, zeigen sich die SMCs spindelförmig und teilweise streng parallel geordnet. Da ihre Dichte zur Peripherie hin ausdünt, erscheinen sie dort ungerichtet und maximal ausgebreitet:

**Abbildung 43: SMC-Kolonien**



*Dargestellt sind unter dem Lichtmikroskop aufgenommene Zellkolonien an Tag 12. Links ist eine Kolonie der Kontrolle und rechts eine Kolonie der 4Gy Gruppe abgebildet (der zu diesem Zeitpunkt höchsten Dosis, bei der nennenswerte klonogene Aktivität vorhanden ist (d.h. >1Kolonie/well)).*

Abbildung 43 stellt die Morphologie bestrahlter und unbestrahlter SMC-Kolonien gegenüber. Die klonogene Aktivität der hier gezeigten 4Gy Gruppe beträgt zu diesem Zeitpunkt gerade einmal 28% derjenigen der Kontrolle. Trotzdem unterscheiden sich die Kolonien (wenn sie gebildet werden) nur wenig. Die bestrahlte Kolonie weist zentral etwas weniger dicht gedrängte Einzelzellen auf als die Kontrolle. Außerdem befinden sich in der Peripherie dieser Kolonie, (insbesondere am oberen und rechten Bildrand) Zellen verstreut, die deutlich weiter ausgebreitet sind als die der übrigen. Die Flächenausmaße der beiden dargestellten Kolonien sind praktisch gleich groß, die Zellzahlen schätzungsweise in der 4Gy Kolonie etwas geringer.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Evaluation einer Therapie mit MFS zur Restenoseprophylaxe

In der vorliegenden in-vitro Studie ist der inhibitorische Effekt von Meclofenaminsäure (MFS) auf das Wachstumsverhalten, das Migrationsverhalten, den Zellzyklus und die klonogene Aktivität von humanen aortalen glatten Muskelzellen untersucht worden. Dabei sind zur Abschätzung der Wirkung dieses Anthranilsäurederivates unterschiedliche Konzentrationen des Medikamentes im Nährmedium von 10 $\mu$ M bis 200 $\mu$ M über einen Expositionszeitraum von je 20 Tagen gewählt worden.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass MFS unter Zellkulturbedingungen das Wachstum FCS-stimulierter haSMCs ab einer Mediumkonzentration von mehr als 100 $\mu$ M signifikant hemmt und es bei einer Konzentration von 200 $\mu$ M MFS zu einem vollständigen Sistieren des Wachstumsverhaltens der glatten Gefäßmuskelzellen kommt.

Es schließt sich folglich bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser in-vitro-Experimente die Frage an, ob bzw. inwiefern nun Aussagen über die klinisch-therapeutische Anwendung von MFS in Bezug auf die Restenoseprophylaxe möglich sind.

#### 4.1.1. Bisheriger klinischer Einsatz von MFS

Das Anthranilsäurederivat Meclofenaminsäure (Synonyme: Meclofen, Meclomen®) gehört wie zum Beispiel Mefenaminsäure, Tolfenaminsäure oder Flufenaminsäure als ein sogenanntes „Fenamat“ der Gruppe der peripheren nicht-steroidalen antiphlogistischen Analgetika (NSAID) an. Indikationen für die Verordnung von Meclofenaminsäure sind:

- akute und chronische rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis
- leichte bis mittelschwere Schmerzen
- primäre Dysmenorrhoe
- schwerer menstrueller Blutverlust
- Experimentell: Behandlung bei Sonnenbrand, Migräneprophylaxe und bei Spannungskopfschmerz <sup>[49]</sup>.

#### 4.1.2. Pharmakokinetik, Nebenwirkungen und therapeutische Breite von MFS - Berücksichtigungen für eine medikamentöse Restenoseprophylaxe

Um aus den gewonnenen Daten *in vitro* Vermutungen über vergleichbare Effekte von MFS an haSMCs *in vivo* treffen zu können, ist es zunächst sinnvoll der Frage nachzugehen, wie man die Konzentration des Medikamentes, die *in vitro* Effekte zeigt, am entsprechenden Wirkort bzw. im Serum erreichen kann. Des Weiteren schließt sich die Frage an, ob und über welchen Zeitraum eine solche Serumkonzentration von MFS aufrechterhalten werden kann, ohne dass der therapeutische Nutzen der Behandlung durch eintretende Nebenwirkungen oder toxische Medikamentenwirkungen limitiert wird.

Meclofenaminsäure ist eine gering wasserlösliche Substanz, deren pKa-Wert 3,76 beträgt. Die Löslichkeit des Natrium-Salzes von MFS (Na-Meclofenamat) beträgt mindestens 15 mg/mL. Der saure Charakter der Substanz erklärt dessen Akkumulation in Entzündungsgebieten. Es ist davon auszugehen, dass die Stelle der Gefäßwand, an der eine PTA durchgeführt wird, ebenfalls einen relativ niedrigen pH-Wert aufweist. Zum einen stellt die Atherosklerose an der zu erweiternden Gefäßstenose einen inflammatorischen Prozess dar, zum anderen wird durch die Hypoxie, die durch die Kompression der Gefäßwandschichten (und ggf. der vasa vasorum) im Rahmen der Dilatation auftritt, ebenfalls ein lokales azidotisches Milieu hervorgerufen.

MFS wird rasch und nahezu vollständig resorbiert. Die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max,pl}$ ) wird 0,5 bis 2 Stunden nach oraler Applikation erreicht <sup>[49]</sup>. Die Eliminationshalbwertszeit ( $T_{1/2,pl}$ ) wird für eine Therapie bei wiederholter oraler Dosierung mit 0,8 bis 2,1 Stunden angegeben. Es besteht kein Anhalt für eine Akkumulation von MFS im Plasma während einer achtstündlich wiederholten oralen Dosierung <sup>[75]</sup>.

Koup et al. <sup>[75]</sup> fanden in einer kleinen Studie zur Pharmakokinetik von MFS bei wiederholter, achtstündlicher oraler Gabe von 100mg Meclofenaminsäure maximale durchschnittliche Plasmakonzentrationen von  $C_{\max,pl} = 4,8 \mu\text{g/ml}$ . Es wird aufgrund der eintretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (s. Tabelle 6) empfohlen eine tägliche orale Dosis von 400mg nicht weit zu übersteigen. Da die maximalen Plasmakonzentrationen und das Ausmaß der Absorption in Dosisbereichen von 25mg bis 400mg proportional zur applizierten Menge an MFS sind <sup>[49]</sup>, ergibt sich für eine therapeutisch vertretbare maximale orale Dosierung mit MFS bei 8 stündlicher Gabe von 150mg (dies entspricht also 450mg/d) eine maximale Plasmakonzentration von  $7,2 \mu\text{g/ml}$ , was  $22,6 \mu\text{mol/l}$  entspricht (Molekulargewicht MFS= 318.1).

**Tabelle 6: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Meclofenaminsäure**

Organsysteme	Symptome
Gastro-Intestinal-Trakt	Diarrhoe und GIT-Hypermotilität, Nausea (mit und ohne Erbrechen), abdominale Schmerzen, Flatulenz, Stomatitis, peptische Ulzerationen.
Kardiovaskuläres System	Ödeme
ZNS	Kopfschmerzen, Schwindel
Haut	Ausschlag, Urtikaria, Juckreiz
Ohr	Tinnitus

*Tabelle 7: Dargestellt sind die Nebenwirkungen von Meclofenaminsäure, die mit einer Inzidenz von >3% auftreten <sup>[77]</sup>.*



MFS wird ausgedehnt metabolisiert. Mindestens zehn Abbau-Metabolite sind bekannt, von denen einer, „Metabolit I“ (der 3-hydroxymethyl Metabolit von MFS) eine Hemmung der Cyclooxygenase mit einer Aktivität von ca. 20% der MFS-Aktivität hemmt. Trotz der längeren Eliminationshalbwertszeit des Metaboliten I von 15 Stunden ist dessen Akkumulation bei repetitiver Gabe in Intervallen von 8 Stunden mit großer Wahrscheinlichkeit ohne klinische Relevanz <sup>[49, 75, 76]</sup>.

#### 4.1.3. Applikationsmöglichkeiten - systemisch oder lokal?

##### 4.1.3.1. Eignung von MFS zur systemischen Low-Dose-Langzeittherapie oder als hochdosierte „Kurzchemotherapie“ ?

Aus den in den Experimenten gewonnenen Daten geht hervor, dass das Wachstum der haSMCs ab einer Konzentration von 100µM MFS im Nährmedium über einen Zeitraum von 20 Tagen signifikant gehemmt werden kann. Eine Konzentration von 200µM supprimiert das Wachstum vollständig und nachhaltig über den gesamten beobachteten Expositionszeitraum. Vor dem Hintergrund der Pharmakokinetik und der empfohlenen oral applizierbaren Dosen für eine Langzeittherapie von MFS könnte eine maximale Plasmakonzentration von knapp 25µM erzielt werden (s. 4.1.2.). Dabei muss berücksichtigt werden, dass wegen der kurzen Halbwertszeit des Medikamentes im Blut die maximale Plasmakonzentration nach jeder Dosisgabe nur für einen geringen Zeitraum erreicht wird und nicht ohne weiteres mit der konstanten Nährmediumkonzentration in Bezug auf ihre Wirkung gleich gesetzt werden kann. Auch muss eine entsprechende Plasmakonzentration nicht bedeuten, dass diese Medikamentenkonzentration auch an der Stelle der Gefäßwand erreicht wird, in der sich die glatten haSMCs befinden. Ungeachtet dessen ist bei weitem noch nicht abzusehen, welches Ausmaß einer Proliferationshemmung der SMCs tatsächlich zu einer Inhibition der Ausbildung einer restenotischen Läsion führt.

Diese Überlegungen lassen eine erfolgreiche medikamentöse Behandlung der vaskulären Restenose im Sinne einer systemischen Langzeittherapie mit MFS fraglich erscheinen. Viele Autoren glauben, dass die enttäuschenden Ergebnisse der PRESTO-Studie <sup>[48]</sup>, die die Eignung einer systemischen Restenoseprophylaxe mit Tranilast untersucht hat, auf diese mangelnden Berücksichtigungen zurückzuführen sind. Die vielversprechenden Versuche an Tiermodellen sowie kleinere klinische Studien, die der Presto-Studie vorausgegangen sind, haben in der Tat deutlich höhere Dosen des Medikamentes verwendet.

Schoeber et al. <sup>[50]</sup> haben in ihren Arbeiten den Einfluss von MFS auf haSMCs untersucht, wobei sie bei einem Beobachtungszeitraum von 20 Tagen den Expositionszeitraum von MFS nur für die ersten 4 Tage wählten. Im Vergleich zur simulierten Dauertherapie zeigen sich dabei zum Beispiel für die mit 200µM behandelten Zellen deutliche Erholungseffekte sowohl bei der klonogenen Aktivität als auch bei den absoluten Zellzahlen der Proliferationskinetik. Der Anteil der absoluten Zellzahlen der 200µM Gruppe ist aber nach 20 Tagen in Bezug auf die Kontroll-Gruppe trotzdem noch sehr gering, sodass angenommen werden kann, dass die Langzeit-Therapie (für den beobachteten Zeitraum von 3 Wochen) nicht wesentlich effektiver als die Kurzzeittherapie von 4 Tagen ist. Sollten diese Effekte auf eine COX-Hemmung zurückzuführen sein, so ließe sich dies (ebenso wie die Diskrepanz zwischen Eliminationshalbwertszeit und Wirkungsdauer) durch die irreversible Inhibition des Enzyms COX erklären.

Zwar entwickelt sich die klinisch manifeste vaskuläre Restenose über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten, die prozessinitiierenden und das spätere Ausmaß der Stenose determinierenden Reaktionen laufen aber vermutlich in den ersten 14 bis 21 Tagen ab (siehe auch 1.3.3.). Daher mag es möglich sein durch initiale aggressive Suppression des ersten „bursts“ der Phasen der restenotischen Formation das Langzeitergebnis ebenfalls positiv zu beeinflussen. Setzt man also eine kurze Behandlungsdauer voraus, so könnten eventuell die applizierten Dosen ohne Auftreten weiterer unerwünschter Medikamentenwirkungen in den für die Restenoseprophylaxe relevant

erscheinenden Bereich erhöht werden. Eine Begleittherapie zum Beispiel mit Protonenpumpenhemmern zur Abschwächung des gastrointestinalen Schleimhautschadens wäre dabei überdenkenswert.

#### **4.1.3.2. Lokale Medikamenten-Applikation – local drug delivery und drug-eluting Stents**

Bis heute existiert noch keine effiziente systemische medikamentöse Therapie zur Prophylaxe der vaskulären Restenose. Trotz der äußerst vielversprechenden Ergebnisse vieler untersuchter Substanzen in vitro und in kleineren Studien an Tieren und trotz der Entwicklung schlüssiger Konzepte in Hinblick auf den Eingriff dieser Medikamente in den pathophysiologischen Ablauf dieses Krankheitsbildes konnte bisher kein systemisch verabreichtes Pharmakon beim Menschen die Restenoserate signifikant senken.

Da angenommen wird, dass diese enttäuschenden Resultate maßgeblich auf die unzureichend hohen Konzentrationen der eingesetzten Stoffe an der benötigten Stelle zurückzuführen sind, wurden in der letzten Zeit vermehrt Anstrengungen unternommen Medikamente direkt an der katheterinterventionell geschädigten Stelle zu applizieren. Somit kann die betreffende Substanz zum richtigen Zeitpunkt (also zum Zeitpunkt der Intervention) an die richtigen Stelle in ausreichender Dosis bei gleichzeitig minimaler systemischer Toxizität gebracht werden.

#### **4.1.3.3. Lokale Medikamenten-Applikation**

##### *Extra- und perivaskuläre Medikamentengabe*

Perivaskuläre Medikamentenapplikationen haben, obwohl sie das tierexperimentelle Entwicklungsstadium bisher nicht überschritten haben, interessante Einblicke in den Mechanismus der Medikamentendistribution geben können<sup>[78]</sup>. Für die PTCA wäre diese Art der Verabreichung über einen intrapericardialen Zugang zumindest klinisch denkbar.

### *Katheterbasierte Medikamentenapplikation*

Im Rahmen einer perkutanen transluminalen Angioplastie wird über den gelegten Katheter Kontrastmittel injiziert, der Dilatationsballon und ggf. der Stent positioniert. Es liegt daher nahe, dass auch verschiedene Katheterdesigns zur lokalen Medikamenteninstillation konzipiert worden sind, (wie Doppel-Ballons, poröse oder mikroporöse Katheter<sup>[79]</sup>) ohne dass sie sich im klinischen Einsatz als besonders erfolgreich gezeigt hätten. Die angegebene Effizienz der lokalen Applikation (Retentionswerte) ist mit 0,001% bis 0,1% nach 24h<sup>[80]</sup> und 1-8% nach 14 Stunden<sup>[81]</sup> vergleichsweise sehr gering. Neben prozeduralen Modifikationen (Reduktion des Gefäßtraumas) könnte die Entwicklung von Medikamentenvehikeln, die eine bessere Gewebspenetration und -retention gewährleisten, bzw. Medikamenteneigenschaften selbst (Lipophilie, Größe, intrazelluläre Bindung) dieses Applikationsverfahren verbessern.

### *Medikamente-eluierende Stents*

Eine persistierende lokale Retention und eine kontrollierte und suffiziente Freisetzung eines Medikamentes ist am besten mittels einer Vorrichtung, die sich dauerhaft am Ort der Gefäßdilatation befindet, möglich. Da Stents heute in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle im Rahmen katheterinterventioneller Eingriffe implantiert werden und sie einen am Ort der ehemaligen Intervention verbleibenden Gegenstand darstellt, sind in der jüngsten Vergangenheit Stents entwickelt worden, die mit Medikamenten beschichtet sind und somit gleichzeitig eine biologische und mechanische Restenoseprophylaxe bilden. Seit längerem ist bekannt, dass das Metall der Stentstreben in der Gefäßwand eine Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion unterhält, die die Restenoseentwicklung begünstigen kann. Daraufhin sind (mit äusserst variablen Ergebnissen) sog. „Passivbeschichtungen“<sup>[82]</sup> aus inerten und körperverswandten Materialien entwickelt worden (Kohlenstoff, Gold, Phosphorylcholin) um die Biokompatibilität der Stents zu erhöhen<sup>[83]</sup>.

In letzter Zeit haben Stents mit „Aktivbeschichtungen“, d.h. mit die Neointimabildung unterdrückenden Substanzen beschichtete Stents, sehr ermutigende Ergebnisse in kleineren klinischen Studien gezeigt <sup>[84]</sup>, die vereinzelt Restenoseraten im einstelligen Prozentbereich aufweisen. Die verwendeten Medikamente sind dabei:

- Paclitaxel (Chemotherapeutikum in der Krebstherapie)
- Actinomycin D (Chemotherapeutikum in der Krebstherapie)
- Sirolimus, Tacrolimus, Everolimus (immunsuppressive Makrolide zur Abstoßungsprophylaxe nach Organtransplantation, Entzündungshemmer)
- Dexamethason (entzündungshemmendes und antiproliferatives Kortikosteroid)

Interessanterweise kann die Freisetzungskinetik des Medikamentes durch Wahl verschiedener abdeckender Diffusionssperren aus Polymeren den speziellen pharmakokinetischen und –dynamischen Eigenschaften der Substanz angepasst werden, sodass eine kalkulierte Freisetzung auch des weniger lipophilen Medikamentes Meclofenaminsäure über einen Zeitraum von <15 Tagen bis >28 Tage gewährleistet sein könnte <sup>[85,86]</sup>.

#### 4.1.4. Subzelluläre Wirkungsweisen von Anthranilsäurederivaten – Bedeutung für die Restenoseetherapie

##### 4.1.4.1. Die Wirkungsmechanismen von Tranilast

Unter den Anthranilsäurederivaten ist Tranilast mit Abstand diejenige Substanz, die in Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung für die Restenoseetherapie am intensivsten bezüglich ihres molekularen Wirkmechanismus untersucht worden ist.

Bevor die Potenz von Tranilast im Zusammenhang mit der Prävention vaskuloproliferativer Prozesse erkannt wurde, galt es wegen seiner membranstabilisierenden Wirkung auf Mastzellen als Antiallergikum und erwies sich als potenter Inhibitor der Freisetzung von chemischen Mediatoren, Cytokinen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten <sup>[67]</sup>. Da dieses

Anthranilsäurederivat ferner eine supprimierende Wirkung auf die Kollagensynthese in Granulationsgewebe hat, ist es auch zur Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben zum Einsatz gekommen<sup>[40]</sup>. Seine Fähigkeiten, die Proliferation, Migration und Bindegewebssynthese glatter Gefäßmuskelzellen zu unterdrücken, haben es schließlich zu einem für die Restenose-therapie interessanten Pharmakon werden lassen<sup>[42]</sup>.

Wegen seiner außerordentlich vielfältig erscheinenden Wirkungsweisen ist Tranilast oft als „multi-action drug“ bezeichnet worden. Die subzellulären und molekularen Mechanismen von Tranilast sind im Detail noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass es wegen seines breiten Spektrums an Effekten an einem (oder mehreren) zentralen Knotenpunkt(en) zellulärer Aktivität ansetzt. Somit werden Wirkungen auf Rezeptor- und Postrezeptor-Ebene (Inhibition von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Serin-Threonin-Rezeptor-Kinasen<sup>[68]</sup>) ebenso wie genregulatorische Eigenschaften dieser Substanz postuliert.

Unter anderem konnten für Tranilast folgende Effekte aufgezeigt werden:

Ward et al.<sup>[68]</sup> zeigten an einem Ratten-Tiermodell, dass Tranilast effektiv die Expression von transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und dessen Rezeptoren auf transkriptionaler Ebene hemmt.

Des Weiteren ließ sich an kultivierten humanen koronaren glatten Muskelzellen ein PDGF-BB Rezeptor-Block und Inhibition einiger PDGF-BB-vermittelter Effekte beobachten<sup>[69]</sup>.

Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Tranilast dosisabhängig Angiotensin-II-Effekte an humanen und Hasen- Arterien antagonisiert<sup>[70]</sup>.

Andere Untersuchungen ergaben außerdem, dass Tranilast die Freisetzung von TGF- $\beta$ , IL-1 und PGE<sub>2</sub> aus humanen Makrophagen inhibiert.<sup>[71]</sup>

Ergebnisse von Nie et al.<sup>[72]</sup> lassen vermuten, dass Tranilast die PDGF-induzierte DNA-Synthese durch Blockierung des PDGF-vermittelten Ca<sup>++</sup>-Einstroms hemmt.

Weitere Forschungen fanden einen induktiven Effekt von Tranilast auf die Tumorsuppressorgene p53 und p21 <sup>[73]</sup>.

Jüngste Forschungsergebnisse von Ward et al., die sich mit der Bedeutung von Tranilast in Hinblick auf die Aktivierung des TGF- $\beta$  Systems beschäftigen, heben die zentrale Bedeutung von TGF- $\beta$  in der Pathogenese der Restenose nach PTA und der In-Stent-Restenose hervor <sup>[74]</sup> (siehe auch 1.3.3). Es wird dabei deutlich, dass TGF- $\beta$  vielen der oben genannten Effekte von Tranilastwirkungen vor- oder nachgeschaltet ist. Über das TGF- $\beta$  System als ein möglicher Knotenpunkt der Restenoseentwicklung könnte somit zum Beispiel die Wirkung von Tranilast auf p21, Angiotensin-II, PDGF oder FGF erklärt werden <sup>[74]</sup>.

#### **4.1.4.2. Mechanismen und Effekte der Wirkung von Meclofenaminsäure**

Unter den Nicht-Steroidalen Anti-Inflammatorischen Medikamenten (NSAIDs) gehört Meclofenaminsäure zur Gruppe der Anthranilsäure-Derivate (s.a. 1.5. und 4.1.1.). Ihr bisheriger klinischer Einsatz beruhte daher auf den entzündungshemmenden und analgetischen Eigenschaften dieser Substanz. Es ist bekannt, dass MFS in den Arachidonsäurestoffwechsel eingreift und somit die Bildung von Eicosanoiden (i.e. Prostacycline, Prostaglandine, Thromboxane, Leucotriene) beeinflusst <sup>[76]</sup>, einer äußerst vielfältigen und heterogenen Substanzgruppe (mit untereinander oft sogar antagonistischen Wirkungen), die als „lokale Hormone“ eine Stellung zwischen klassischen Hormonen und Transmittersubstanzen einnehmen.

Meclofenaminsäure ist ein Inhibitor der Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und COX-2 <sup>[87]</sup> (sie entsprechen Teilfunktionen der Prostaglandin-H-Synthasen 1 und 2 . s. Abb.). Die Inhibition ist irreversibler Natur, was die Diskrepanz zwischen der relativ kurzen Halbwertszeit (s. 4.1.2.) und der langen Wirkdauer erklärt und eventuell ebenfalls die geringen Unterschiede in einer simulierten Kurz- und Langzeit-therapie (s. 4.1.3.1.). Die IC<sub>50</sub>-Werte für die COX-1- und COX-2-Inhibition sind 1,5 $\mu$ M bzw. 9,7  $\mu$ M. MFS besitzt dabei eine 15-fache Selektivität für die COX-2 <sup>[88]</sup>. Das Fenamat antagonisiert die Gewebeantwort auf bestimmte

Prostaglandine (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), insbesondere PGE<sub>2</sub> mit sehr hoher Potenz, und zeigt ebenfalls einen direkten inhibitorischen Effekt an PGE –Rezeptoren [89]. Aber MFS unterscheidet sich von andern NSAIDs außerdem dadurch, dass es neben dem COX-Pfad auch den Lipoxygenase-Weg (LOX) der Eicosanoidsynthesen hemmt:

**Abbildung 44: Schema eines Auszugs des Arachidonsäure-Stoffwechsels**

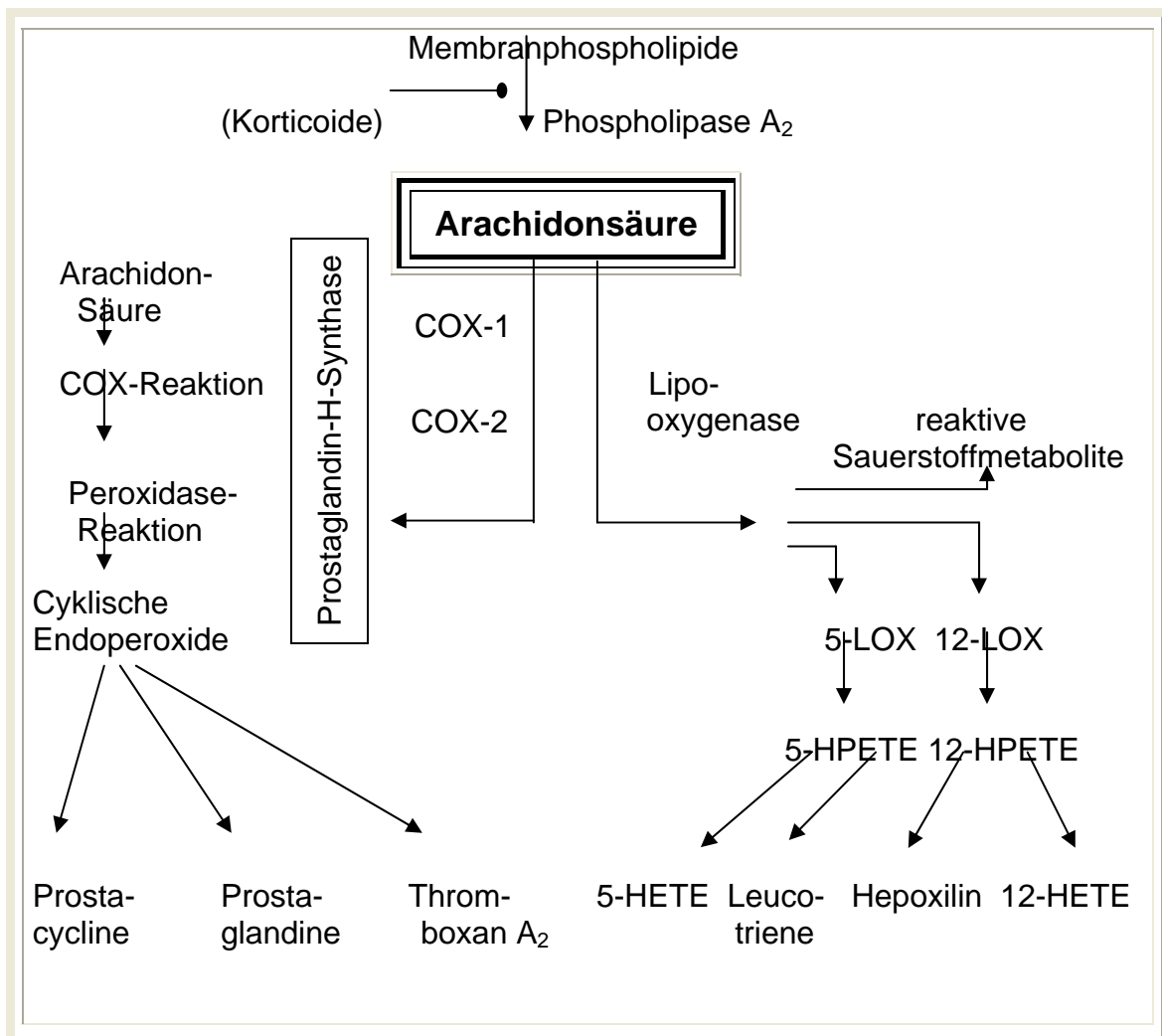


Abbildung 44 : Wichtige Stationen des Arachidonsäurestoffwechsels  
Arachidonsäure, eine Eicosatetraensäure (20C-Atome, 4-fach ungesättigt –C5, C8, C11, C14))

COX = Cyclooxygenase

LOX = Lipoxygenase

5-/12-HETE = 5-/12-Hydroxy-eicosa-tetraen-säure

5-/12-HPETE = 5-/12-Hydro-peroxy-eicosa-tetraen-säure



Sowohl die 5-LOX als auch die 12-LOX-Aktivitäten werden von MFS gehemmt<sup>[90]</sup>. Das Anthranilsäurederivat beeinflusst die Gewebsreaktionen auf Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) und D<sub>4</sub>, supprimiert die Entstehung von 5-HETE (IC<sub>50</sub>= 46,8µM) und LTB<sub>4</sub> und interferiert mit Leukotrienrezeptoren und möglicherweise post-rezeptor Mechanismen<sup>[90,91]</sup>.

Schoeber et al.<sup>[50]</sup> zeigen darüber hinaus, dass MFS in einer Dosis von 200µM (über einen Zeitraum von 4 Tagen) die Menge der exprimierten Proteine p44 und p42 senkt. Diese Proteine sind MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinases), intrazelluläre Enzyme, die eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Signalen dienen, welche die Zellproliferation steuern.

Die Wirkung von Eicosanoiden ist sehr vielfältig. Sie wirken in geringsten Mengen auf den Blutdruck (PG), auf die Kontraktion glatter Muskulatur (PGE, PGF), auf die Herzfrequenz und das Schmerzempfinden.

Als Medikamente zur Restenoseprophylaxe werden in den Arachidonsäurestoffwechsel eingreifende Substanzen wie MFS interessant, weil bekannt ist, dass manche Eicosanoide zytoprotektive Effekte (PGE-Analoga) haben, die Thrombozytenaggregation beeinflussen (TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (=Prostazyklin)), Leukozytenfunktionen (Lipoxine) regulieren, allergische und entzündliche Reaktionen (PG, LT) vermitteln und auf den programmierten Zelltod (=Apoptose) und die Zellproliferation wirken.

#### **4.1.4.3. Cyclooxygenasen und Restenose**

Die Synthesen von Eicosanoiden sind, wie die meisten Stoffwechselprozesse, Kaskaden von enzymvermittelten und –gesteuerten Reaktionen. Die Hemmung der Enzyme beeinflusst daher die Synthese und damit die Wirkung der Eicosanoide. Da die Restenose einen primär inflammatorischen Wundheilungsprozess darstellt (s. 1.3.), interessieren unter den bekannten Wirkungen von Meclofenaminsäure insbesondere diejenigen, welche die Enzyme hemmen, die Entzündungen, bzw. Wundheilungsprozesse und Zellproliferation vermitteln. Deshalb sind im Folgenden die Cyclooxygenasen gesondert hervorgehoben. Insbesondere die COX-2, für die MFS im Vergleich

zu COX-1 eine 15-fach höhere Selektivität besitzt, wird, im Gegensatz zu COX-1, durch Zytokine in Entzündungsgebieten als sog. „proinflammatorisches Notfallenzym“ induziert. Außerdem spielt COX-2 auch bei der Wundheilung eine Rolle (bei bestehenden Magengeschwüren ist die Gabe von selektiven COX-2 Inhibitoren kontraindiziert, weil diese dann verzögert abheilen<sup>[92]</sup>). Andererseits ist die COX-2 Induktion aber auch mit Zelldifferenzierungen (im Knochenmark) als auch mit neoplastischen Transformationen (also proliferativen Prozessen) assoziiert und wird darüber hinaus in atherosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert<sup>[93]</sup>.

Cyclooxygenase-Metaboliten regulieren die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen und die Interaktionen zwischen dem Gefäß und zirkulierenden Komponenten. Sie beeinflussen die Kontraktilität der SMCs, deren Wachstum und ihre Cholesterolaufnahme<sup>[94]</sup>. Des Weiteren regulieren Prostaglandine, die durch die COX gebildet werden, die Expression von Genen, die an Zellwachstum, Migration und Apoptose der SMCs beteiligt sind. Es konnte dabei gezeigt werden, dass  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptors induzieren<sup>[95]</sup>. Papafili et al.<sup>[96]</sup> konnten nachweisen, dass Patienten mit einem Allel für eine niedrigere Promotoraktivität des COX-2 Gens nach Bypass-Op eine signifikant geringere Konzentration an C-reaktivem Protein aufwiesen, einem Entzündungsmarker, der bei der Risikoabschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen hilfreich ist.

Insgesamt sind die (teils antagonistischen) Wirkungen der Eicosanoide aber so komplex, dass eine Suppression der Ausbildung der Neointima durch alleinige Blockade der COX unwahrscheinlich ist. So gibt es Anhaltspunkte, dass durch COX-2 Inhibition das Gleichgewicht von  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  zugunsten des thrombogenen  $\text{TXA}_2$  verschoben wird und COX-2-Inhibitoren kardiovaskuläre Ereignisse sogar fördern könnten<sup>[97]</sup>. Auch die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen, die z.B. für die Migration der SMCs in die Intima essentiell sind, wird durch  $\text{PGD}_2$  hemmend und durch  $\text{PGE}_2$  fördernd beeinflusst<sup>[93]</sup>. Aus den Betrachtungen und Experimenten geht allerdings hervor, dass MFS, als eine in den Arachidonsäurestoffwechsel eingreifende Substanz an einem

zentralen Regulationspunkt inflammatorischer und proliferativer Mechanismen eingreift und dosisabhängig die Proliferation und Migration FCS-stimulierter haSMCs in vitro zu hemmen vermag.

## 4.2. Ionisierende Strahlung zur Prävention der Restenose

### 4.2.1. Die Effekte ionisierender Strahlung auf glatte Muskelzellen in vitro

Seit längerem ist bekannt, dass ionisierende Strahlung erfolgreich zur Therapie maligner sowie benigner proliferativer Prozesse angewendet werden kann und Entzündungsreaktionen eindämmt (s. a. 1.6.). In der jüngeren Vergangenheit ist man daher dazu übergegangen diese Erkenntnis zur Rezidivprophylaxe vaskulärer Reokklusionen einzusetzen. Trotz eingehender und umfangreicher in vitro- und Tierversuche und einer Reihe laufender und bereits abgeschlossener klinischer Studien ist der exakte Mechanismus, durch den die gezeigten ermutigenden Resultate erzielt werden konnten, noch nicht vollständig geklärt. Dies mag sich als ein Unsicherheitsfaktor in den Versuchsplanungen sowie Studiendesigns und den großen Spannweiten der zu berücksichtigenden Parameter und Einflussfaktoren (Nuklidwahl, Art und Dauer der Bestrahlung etc.) niedergeschlagen haben.

Die Experimente in Zellkultur unter definierten Laborbedingungen bilden dabei den ersten Schritt zur Exploration der Effekte ionisierender Strahlung auf Gefäßwandbestandteile.

#### 4.2.1.1. Zellzahlinhibition, klonogene Aktivität

Wiskirchen et al. <sup>[98]</sup> kultivierten humane aortale glatte Muskelzellen (19. Passage) für 30 Tage und inkubierten diese in den ersten 5 Tagen mit verschiedenen Dosen des kombinierten  $\beta$ - $\gamma$ -Emmiters 188-Rhenium. Bis auf das gewählte Radionuklid und dem Bestrahlungs- und Medienwechsel-intervall (5 vs. 4 Tage) entsprechen die Versuchsbedingungen der Proliferationskinetik denjenigen dieser Arbeit. Die Kontroll-Zellzahlen an Tag 20 pro 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschenboden sind mit denen dieser Experimente ebenfalls gut vergleichbar (1.987.000 vs. 1.822.875 Zellen). Die 4Gy und die 8Gy-Gruppe zeigt eine signifikant niedrigere Zellzahl im Vergleich zu der Kontrolle ab dem ersten Beobachtungstag. Des Weiteren stehen die fehlende Plateaubildung der 4 Gy-Gruppe bzw. die kontinuierlich zunehmenden Zellzahlen der 8Gy-Gruppe im Einklang mit den von uns gefundenen Ergebnissen. Trotzdem erreicht die 4Gy-Gruppe aufgrund eines sprunghaften Zellzahlanstiegs zwischen Tag 10 und 20 an Tag 30 immerhin ca. 45% der Kontrollzellzahlen, wohingegen in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten lediglich ca. 22% der 4Gy-Gruppe an Tag 20 zu verzeichnen sind. Die Dimensionen der Zellzahlen der 8Gy-Gruppe treffen wiederum diejenigen unserer Beobachtungen. Analog zu unseren Ergebnissen steht auch die Aussage, dass die Erholungseffekte (gemessen anhand der Tag-Zu-Tag-Wachstumsraten) im letzten Beobachtungsintervall für die mittleren gewählten Strahlendosen (2-6Gy) am stärksten ausgeprägt sind. Die Zellen niedrigerer Bestrahlungsdosen unterliegen gegen Ende der Kinetik der Kontaktinhibition, die Zellen der Hochdosisgruppen sind dauerhaft inhibiert. Die von Wiskirchen et al. ebenfalls durchgeführten Koloniebildungsassays sind bezüglich der relativen Kolonienzahlen und deren Entwicklung im Verlauf des Beobachtungszeitraums ebenfalls vergleichbar. Auch hier steigen die Kolonienzahlen der 4Gy-Gruppe aufgrund der einsetzenden Erholung nach Bestrahlungsende auf ca 30% der maximalen klonogenen Aktivität dieser Zellen an, wohingegen die 8Gy-Gruppe im einstelligen Prozentbereich verweilt.

Der Einfluss von  $\beta$ -Strahlung auf glatte Gefäßmuskelzellen in vitro ist ebenfalls von Fareh et al. [105] untersucht worden. Die Arbeitsgruppe kultivierte glatte SMCs vom Schwein und verwendete  $^{32}\text{P}$ -markierte Oligonukleotide als Strahlungsquelle in einem Dosisintervall zwischen 0,4 und 10Gy. In Vorversuchen konnte kein Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit zwischen humanen und porcinen SMCs gefunden werden.

Aus ihren Ergebnissen ist zu entnehmen, dass eine Dosisapplikation von 4Gy die Proliferationsrate der SMCs auf ca. 16-18% senkt. Dies korreliert wiederum sehr gut mit unseren Beobachtungen, bei denen die 4Gy-Gruppe in der Proliferationskinetik während des Beobachtungszeitraums Werte zwischen 12% und 22% annimmt (d4:18%, d8:12%, d12:14% d16:19% und d20:22%). Auch die von ihnen untersuchte 8Gy-Gruppe, die mit einer Proliferation von ca. 10% den Dosis-Antortkurven zu entnehmen ist, trifft unsere Beobachtungen relativ genau (die 8Gy Gruppe zeigt zwischen Tag 8 und Tag 20 ein Proliferationserhalten, das lediglich zwischen 9,6% und 12,5% der Kontrolle schwankt). Die 2Gy-Gruppe unserer Versuchsreihen ist aufgrund ihres massiven Erholungseffektes lediglich an Tag 8 (27,2% der Kontrolle) mit den Daten von Fareh et al. vergleichbar.

In in-vitro-Versuchen von Rosen et al [99] wurden 10% serum-stimulierte glatte Muskelzellen aus der Tunica media der Aorta der Ratte verwendet und mit der  $\gamma$ -Strahlung von  $^{137}\text{Cs}$  bestrahlt ( $1,15 \text{ Gy}/\text{min}$ ). Dies entspricht Dosisleistungen, wie sie eher für IVBTs typisch sind ( $1\text{-}5\text{Gy}/\text{min}$ ).

Die Anzahl teilungsfähiger Zellen, die sie aus der klonogenen Aktivität der Zellen ableiteten, ist für 8Gy mit einer Fraktion von  $10^{-2}$  aus den von ihnen veröffentlichten Daten zu entnehmen, d. h., dass ca. eine von 100 koloniebildungsfähigen Zellen nach Bestrahlung ihre klonogene Aktivität behält. Dies entspräche bei den Versuchsbedingungen der Koloniebildungsassays, deren Ergebnisse dieser Arbeit zugrunde liegen einer Zahl von ca. 0,73 Kolonien (auf 500 ausgesäte Zellen). Die Anzahl der klonogenen Zellen steigt in der 8Gy-Gruppe unserer Experimente von 0% an Tag 4 auf 11% an Tag 20 an. Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass die in unseren Versuchen

applizierte Dosis in 4 Tagen verabreicht wurde. Die geringere Dosisleistung mag dabei dazu führen, dass subletale Strahlenschäden leichter repariert werden können.

In den Untersuchungen von Rosen et al. wird ferner deutlich, dass Zellen steigenden Alters (i.e. nach längerer Subkultivierungszeit und steigender Anzahl von Passagen) nicht zuletzt wegen ihres abnehmenden Proliferationsverhaltens auch zunehmend niedrigere Radiosensitivitäten aufzeigen. Durch die strenge Beibehaltung des Aufarbeitungsalgorithmus für die Zellen und die ausschließliche Verwendung der Passagen 18 und 19 ist dieses Problem umgangen worden.

Fischer-Dzoga et al. (1984) <sup>[100]</sup> untersuchten die Effekte ionisierender Strahlen auf Zellen der Gefäßwand sowohl anhand trypsinierter und resuspendierter Einzelkulturen als auch an explantierten zusammenhängenden Gewebstücken der unterschiedlichen vaskulären Zellarten. Sie konnten anhand der Experimente mit den Einzelzellkulturen aus der Aorta von Hasen zeigen, dass Bestrahlungen von 250 rad (= 2,5Gy) 250 kV Röntgenstrahlung in einer Dosisleistung von 1,04 Gy/min nach 7 Tagen die Zahlen der adventitiellen Zellen auf 33% senken, diejenigen der aus der Media stammenden Zellen auf 16% und die intimalen Zellen auf unter 1% der jeweiligen Kontrollen. Sie demonstrierten damit unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten der einzelnen Zellarten der Gefäßwand. Sollten die adventitiellen Zellen am radioresistentesten sein und sollte die Rolle der Adventitia eine bisher unterschätzte Rolle in der Ausbildung der Restenose eingenommen haben, so wären auch vor dem Hintergrund, dass Dosiskalkulationen momentan vornehmlich für eine Gewebstiefe von 1mm in der Gefäßwand vorgenommen werden und die Dosis nach peripher hin (in Richtung der Adventitia) massiv abnimmt, eine neue, zu höheren Dosen verschobene Dosisberechnung nötig (s. Diskussion 4.2.3.). Die im Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren relativ hohen Strahlenempfindlichkeiten führen Fischer-Dzoga et al. auf die Verwendung von Zellen unterschiedlicher Spezies, auf die Abstammung der Zellen aus unterschiedlichen anatomischen Stellen sowie auf das individuelle Versuchsdesign zurück, welches aufgrund des

geringen zeitlichen Abstands zwischen Zellisolierung und Bestrahlung zu dem gesetzten Strahlenschaden das Trauma der Explantation bzw. die Vereinzelnung der Zellen noch hinzuaddiert. Somit wird bereits beim Einsatz von 2,5 Gy ein komplettes Abflachen der Wachstumskurve berichtet sowie eine lineare Abnahme der Zellzahlparameter mit steigender Dosis bis 1,5 Gy. Vergleichbare Kulturen in der stationären Phase wiesen hingegen eine höhere Radioresistenz auf.

Gajdusek et al. <sup>[101]</sup> verwendeten <sup>137</sup>Cs  $\gamma$ -Strahlung von 1.25 bis 20 Gy (0,8Gy/min) und applizierten diese Dosen bei (seit 5 Tagen) 10% serum-stimulierten aortalen SMCs der Ratte. Gemessen anhand von KoBis von 100 Zellen Zellgröße, die erst ausgesät und bereits 24 h danach bestrahlt worden sind, ist die Überlebensrate 0,5% bei 15Gy und 1% bei ca. 13Gy.

In diesem Modell wird das proliferationsstimulierende Serum erst simultan mit der Bestrahlung zum Nährmedium gegeben. Eine gesteigerte Radioresistenz könnte somit dadurch erklärt werden, dass die Zellen zum Bestrahlungszeitpunkt noch nicht maximal stimuliert waren, sondern sich noch in der Umstellungsphase („lag-Phase“) befunden haben. Dieses Modell kommt wahrscheinlich dem Prozedere der Bestrahlung nach Angioplastie näher als die Bestrahlung maximal FCS-stimulierter (und damit radiosensitiverer) SMCs, da das vaskuläre Trauma und damit der proliferationsstimulierende Reiz während der Intervention ja auch erst unmittelbar vor der Applikation der Strahlung gesetzt wird.

Mayberg et al. <sup>[102]</sup> führten in vivo und in vitro Experimente zur strahleninduzierten Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen durch. Bei den in vivo Experimenten bestrahlten sie in variablen Intervallen vor oder nach experimentellen Verletzungen der A. carotis von Ratten die Arterien mit 1-10 Gy <sup>137</sup>Cs (8 Gy/min) und bestimmten 20 Tage danach die Durchschnittsfläche der Carotiden. In den in vitro Versuchen wurden aortale SMCs der Ratte, die sich in der stationären (also wenig proliferierenden) Phase befanden und in Intervallen von 0-4Tagen nach Bestrahlung (mit 5 Gy) mit

Serum proliferationsstimuliert worden sind, über einen Zeitraum von 6 Tagen hinsichtlich ihres einsetzenden Wachstumsverhaltens beobachtet.

Sowohl die Beobachtungen *in vivo* wie auch *in vitro* verdeutlichen, dass der hemmende Effekt der Strahlung maximal ist, wenn diese in engem zeitlichen Zusammenhang mit der arteriellen Verletzung (*in vivo*), bzw. mit der wachstumsstimulierenden Serumzugabe zum Medium (*in vitro*) steht. Je höher die eingesetzte Dosis *in vivo* umso geringer fiel die NIH aus. Am effektivsten schien der Einsatz der Strahlung 20 Minuten nach (10Gy) und 24h vor (1Gy) Behandlung zu sein. *In vitro* wird die klonogene Aktivität der Zellen dann am meisten durch 5Gy  $\gamma$ -Strahlung inhibiert, wenn diese in unmittelbarem Zusammenhang mit der einsetzenden Serumstimulation gestanden hat (5Gy  $\rightarrow$  Hemmung der KoBi Rate um 88%). Bestrahlung vor Einsetzen des Proliferationsreizes (i.e. der Serumzugabe) hatte die geringste inhibitorische Wirkung.

Brenner et al. (1996) <sup>[103]</sup> führten *in vitro* Experimente in Form von Zell-Überlebenskurven von Endothel- und glatten Muskelzellen und einem *in vitro* Modell von humanen SMCs durch, bei dem sie die Repopulierungskinetik eines (in Abhängigkeit von der eingesetzten Bestrahlung (0-20Gy Röntgenstrahlung)) mechanisch von Zellen befreiten Streifens in einer Kulturschale mit SMCs untersuchten. Zusammen mit klinischen Daten über die Entstehungszeiträume vaskulärer Restenosen entwarfen sie ein theoretisches Modell über die Strahlenwirkung auf Gefäße *in vivo*.

Ebenso wie Rosen et al. <sup>[99]</sup> verzeichnen sie nach einer Bestrahlung von 8Gy eine Überlebensfraktion von  $10^{-2}$ . Des Weiteren vermochten Dosen größer als 4Gy die experimentelle *in vitro* Wunde nicht bis zur vollen Konfluenz in dem Beobachtungszeitraum von 20 Tagen zu füllen.

Durch Extrapolation zeigten sie die Möglichkeit auf, dass zum Beispiel eine Bestrahlung von 12 Gy die Ausbildung einer Restenose von 4 auf 22 Monate hinauszögern könnte, ohne sie jedoch wirklich aufzuhalten. Nach ihren Berechnungen wären dazu 12 Teilungen pro überlebender SMC notwendig. Da eine Dosis von größer als 20Gy, die erforderlich wäre um alle SMCs in der Gefäßwand zu töten, zu viele Nebenwirkungen hätte, würden geringere Dosen



lediglich die Zahl der zur Repopulierung fähigen Zellen senken und damit den Restenoseprozess hemmen. Voraussetzung dafür ist, dass die Zellen nach Bestrahlung ihre Teilungsfähigkeit uneingeschränkt beibehalten können und der Stimulationsreiz zur Vermehrung aufrechterhalten bleibt.

Die Datenlage über Langzeitergebnisse nach therapeutischem Einsatz von Strahlung zur Restenoseprophylaxe ist gering. Trotzdem liegt es nahe, dass, wenn man den Restenoseprozess als einen inflammatorisch-reparativen Prozess betrachtet, dieser in Abhängigkeit von der Stärke der lokalen Reaktion, der Reendothelialisierung etc. nach einer bestimmten Zeit zum Erliegen kommt (das Maximum des klinischen Auftretens vaskulärer Restenosen beträgt 4-6 Monate, das Maximum der proliferativen Reaktion findet in den ersten 3-4 Wochen statt). Des Weiteren ist es unwahrscheinlich, dass subletal geschädigte SMCs als nicht-maligne Säugetierzellen eine uneingeschränkte Vermehrungskapazität besitzen (sog. „Hayflick-Limit“ an Zellteilungen).

In einer Veröffentlichung jüngeren Datums bestimmen Brenner et al. (2001) <sup>[104]</sup> die klonogenen Überlebensfraktionen humaner SMCs *in vitro* nach Bestrahlung mit einer  $\gamma$ -Quelle. Bei einer verwendeten Dosisleistung von 67Gy/h beträgt die Überlebensfraktion nach Applikation von 8Gy wiederum  $10^{-2}$ .

Unter der Berücksichtigung der Repopulationskinetik für unbestrahlte Zellen und der Überlebensfraktion von  $2,1 \cdot 10^{-4}$  bei mit 13 Gy  $\gamma$ -Strahlen exponierten Zellen *in vitro*, kalkulieren sie für das bestrahlte Patientengut eine zeitliche Verzögerung der Restenosebildung von 6 Monaten auf 36 Monate nach Angioplastie. Nach ihren Angaben stimmen diese Berechnungen gut mit den klinischen Daten der SCRIPPS Studie überein, die 36 Monate nach Applikation von 13 Gy  $\gamma$ -Strahlung im Rahmen einer koronaren Intervention im Vergleich zu den 6-Monats Resultaten einen deutlichen Effektivitätsverlust verzeichnen soll. Ergebnisse anderer präklinischer Studien lassen hingegen vermuten, dass eine Strahlungsapplikation, die lediglich die erste Welle der Entzündungsantwort supprimiert, einen durchaus vorteilhaften Langzeiteffekt aufweisen könnte <sup>[103]</sup>.

#### 4.2.1.2. Migration und ionisierende Strahlung

##### Der Mechanismus der Migration

Migrierende und sich aktiv bewegende Zellen zeigen an ihrer Vorderseite actinreiche Ausstülpungen (Lammelopodien), in denen Aktinfilamente einem rapiden Umsatz unterliegen. Relativ stabile Aktin-Myosin-Komplexe finden sich sowohl an der Rückseite und der Mitte der Zellen als auch in neugebildeten Protrusionen. Myosin II bildet diskrete Bündel von bipolaren Minifilamenten in den Lamellopodien, die in Größe und Dichte in Richtung der Zellkörpergrenze hin zunehmen und zusammen mit Aktin in diesen Grenzbündeln kolokalisiert sind. Daher wird von Myosin II angenommen, dass es eine größere Rolle in der Regulation von sowohl Zellgestalt als auch Richtung und Geschwindigkeit von Zellmigration spielt. Der Mechanismus der Zellmigration unterliegt einer Kontraktion von Bündeln aus Mikrofilamenten, die in einer sarkomer-artigen Weise angeordnet sind und dem myosin-getriebenen Transport von Zellkörperkomponenten entlang eines einheitlich polymerisierten Aktingerüsts. Während der Migration entwickelt die Zelle zum Beispiel bei diesem gerichteten Bewegungsprozess eine in Richtung der steigenden PDGF-Konzentration polarisierte Gestalt mit Aufbau und Anpolymerisation zytoskeletaler Elemente an der Front und Abbau bzw. Depolymerisation des Zytoskeletts an der Heckregion <sup>[108]</sup>.

##### Migration und Proliferation

Nicht nur Zellvermehrung spielt in der Pathophysiologie der Restenose eine bedeutende Rolle, sondern ebenfalls die Fähigkeit von Zellen in andere Gefäßwandschichten auszuwandern. Ob die SMCs der tunica media (oder ggf. die postulierten Myofibroblasten der Adventitia) dabei erst in der Media proliferieren und danach auswandern oder direkt in Richtung auf die Intima wandern und erst dann dort die Neointima ausbilden, ist nicht abschließend geklärt (s.a 1.3.3.1.). Ebenso ist die Beziehung zwischen Migration und Proliferation in SMCs unklar. Die Initiation beider Prozesse wird allerdings gemeinsam primär von einer Anzahl regulatorischer Polypeptide vermittelt wie z.B. PDGF. Die sich anschließenden Signalwege sind ebenfalls teilweise identisch. So führt der Ras/MAP-Kinase Signalweg nicht nur zur

transkriptionalen Kontrolle der Zell-Proliferation und –differenzierung, sondern beeinflusst auch direkt die Zellmigration <sup>[108]</sup>.

Ferner ist der Zellzyklus, den jede proliferierende Zelle durchwandert, ebenso wie die Migrationsfähigkeit, an eine hohe Organisation des Zytoskeletts und Zell-Zell- sowie Zell-ECM-Interaktionen gekoppelt. (Vor der Mitose rollen sich zum Beispiel adhären-wachsende Zellen auf (eine Leistung des Zytoskeletts) und verlieren die Adhäsionskontakte zu ihren Nachbarzellen; ferner sind die Mikrotubuli der Zellteilungsspindel Filamente des Cytoplasmas). Während des Voranschreitens im Zellzyklus ist die Zunahme des Zellvolumens mit einem Anstieg der Zellviskosität und damit einer Abnahme der Beweglichkeit verbunden. Ob damit ein proliferationsinhibierender G<sub>2</sub>/M-Phasenblock, wie wir ihn in unseren Versuchen beobachten konnten, auch indirekt die Migrationsminderung der bestrahlten Zellen erklären kann, ist ungewiss. Außerdem ist die PDGF-induzierte Migration maximal in der G<sub>1</sub>-Phase; des Weiteren zeigte sich, dass sich 65-75% migrierender, nicht zyklussynchronisierter Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase befinden. Auch dies stützt die von Fukui et al. <sup>[108]</sup> vertretene These, dass Zellzyklus und Migration zusammenhängen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression von p21, welches eine Zellzyklusarretierung hervorruft, die SMC-Migration hemmt (s.a. 4.2.1.3.).

### **Migration nach Bestrahlung in vitro**

Die Aussagen, die aufgrund von in-vitro-Experimenten über den Einfluss ionisierender Strahlung auf das Migrationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen getroffen worden sind, divergieren sehr. Dies lässt sich möglicherweise am besten damit erklären, dass sich die Versuchsanordnungen, mit denen die gerichtete Motilität der SMCs untersucht worden ist, ebenfalls sehr von einander unterscheiden.

Die von Thorgeirsson et al. <sup>[109]</sup> verwendete Methode basiert auf der sich an eine Aussaat von SMC-Kolonien bekannten Oberflächenausmaßes unter Agarosegel anschließenden Migration dieser Zellen. Kulturmedium und Agarosegel waren mit einer FCS-Konzentration von 10% versehen; der Beobachtungszeitraum betrug 3-6 Tage.

Eine Stimulation mit Blutseren, die Plättchenfaktoren enthalten, führte zu einer wesentlich größeren Steigerung der Migrationsfähigkeit als die Zugabe von Serum mit wenig Plättchenfaktoren.

Es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Migrationsverhaltens zwischen den 12 Stunden nach Aussaat mit 1500 cGy bestrahlten Kolonien und den Kontrollen, wohingegen das Wachstumsverhalten (gemessen anhand der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin) der bestrahlten Zellen quasi zum Erliegen kam.

Die Zugabe von Cytochalasin B, Theophyllin und dbc-ADP führte zu einem dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die gerichtete Motilität der SMCs. Für Endothelzellen konnte bezüglich der Kombination von AMP und Theophyllin ein synergistisch-inhibitorischer Effekt beobachtet werden.

Die Migrationskinetik ist eine ganz andere als diejenige, die dieser Arbeit zugrunde liegt, und da keine Konzentrationsgradienten gemessen wurden, liegt der Schwerpunkt der Stimulation bzw. Hemmung eher auf Chemokinesis als auf Chemotaxis.

Einen anderen Versuchsaufbau zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Zellen stellt die Verwendung der sog. Boyden-Kammer dar, wie sie von Fareh et al. <sup>[105]</sup> zur Untersuchung von (mit  $^{32}\text{P}$ -beladenen Oligonukleotiden) bestrahlten SMCs eingesetzt worden ist. Vergleichbar mit dem von uns gewählten Migrationsassay können Zellen durch eine mit Poren (8 $\mu\text{m}$  Durchmesser) durchsetzte Polykarbonatmembran zwischen zwei Kompartimenten migrieren. Eine Applikation von 0,4Gy vermochte die Anzahl der migrierten Zellen bereits auf 43% der Kontrolle senken. Des Weiteren konnte eine Halbierung der migratorischen Aktivität der SMCs bei einer Dosissteigerung von 0,4Gy auf 1Gy gezeigt werden. Sie beschreiben damit eine Inhibition der migratorischen Potenz in Dosisbereichen bei  $\beta$ -Dosen, die geringer sind als jene, welche die proliferativen Eigenschaften der SMCs signifikant negativ beeinflussen. Diese Beobachtungen lassen sich ebenfalls mit den von uns gefundenen Ergebnissen schwer zur Deckung bringen. Wir führten die Migrationsversuche an Tag 4 unmittelbar im Anschluss an die Entfernung des Radioisotops aus dem Nährmedium durch. Zu diesem Zeitpunkt

schwanken die Zellzahlen der Proliferationskinetik der bestrahlten Gruppen zwischen 16 und 18% der Kontrolle, die klonogene Aktivität ist an Tag 4 (wenn auch teilweise reversibel) auf 0% (8Gy) bzw. 4% (4Gy) und 24% (2Gy) supprimiert. Die von uns beobachtete dosisabhängige Inhibition der migratorischen Aktivität, die im Mittel für 2Gy mit 77,1%, für 4Gy mit 38,5% und für 8Gy mit 23,2% der Kontrolle (in der mit PDGF-stimulierten Gruppe) angegeben werden kann, weist darauf hin, dass das gerichtete Bewegungsverhalten der haSMCs zwar (in den von uns gewählten Versuchsbedingungen) einem hemmenden Einfluß durch  $\beta$ -Strahlung unterliegt, dieser jedoch weitaus geringer ausfällt als die inhibitorischen Effekte der Strahlung auf das Wachstumsverhalten der glatten Muskelzellen.

Eine weitere Möglichkeit die Migrationseigenschaften glatter Muskelzellen in vitro zu untersuchen, welche den Bedingungen nach einem vaskulären Trauma möglicherweise noch etwas näher kommt (jedoch schwerer zu quantifizieren ist), besteht in der Setzung einer experimentellen „in-vitro Wunde“, bei der mittels eines Spatels oder Messers ein definiertes Areal in einer Monolayer-Kultur oder in einem Gewebstück entfernt wird und man das Einwandern der Zellen von den Rändern dieser „Wunde“ beobachtet. Gotlieb et al. <sup>[110]</sup> untersuchten mit dieser Anordnung 20% FCS-stimulierte SMCs und ECs aus der Schweine-Aorta und bestrahlten sie dazu eine Stunde vor der experimentellen „Verletzung“ mit 1500 cGy  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Strahlung (in 16 Minuten, was einer Dosisleistung von 56,25 Gy/h entspricht). Die Proliferation am Rande der Wunde unbehandelter Kulturen blieb bei den bestrahlten Gruppen aus und die Zahl migrierter SMCs war nach 44 Stunden in der bestrahlten Fraktion signifikant niedriger. Im Gegensatz zu den ECs, die in einem geschlossenen Zellverband wanderten, migrierten die SMCs einzeln und ähnelten damit dem Migrationsverhalten von Fibroblasten.

Fischer-Dzoga et al. (1990) <sup>[111]</sup> verwendeten Explantate aus der Media von Hasen oder Ratten, welche nach 8-wöchiger Kultivierung spontan wachstumshemmende Gewebsverbände in vitro mit einer komplexen Extrazellulärmatrix entwickelten. Eine experimentelle Wunde wurde durch Abschabung eines Streifens definierter Breite in der Kultur erreicht. Die

Bestrahlung erfolgte mit 15 bis 30Gy 250kV Röntgenstrahlung in einer Applikationsrate von 104cGy/min. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Bestrahlungen mit 15 Gy die migratorische Antwort auf den experimentellen Verletzungsreiz *erhöhen* und der Einsatz von 30Gy leicht inhibitorisch auf die gerichtete Zellbeweglichkeit wirkt. Bezüglich der Proliferation lässt sich festhalten, dass Dosen von 15 oder 30 Gy den Anteil tritium-markierten Thymidineinbaus (ein Proliferations-Assay) von 57% auf 6% bzw. 4% reduzierten. Die vollständige Wiederbesiedelung der experimentell erzeugten, zellfreien Lücke, die in der Kontrollgruppe durch eingewanderte *und* dort proliferierte Zellen zustande gekommen war, ist in der bestrahlten Untergruppe einzig und allein den imigrierten SMCs zuzuschreiben, die so auch eine „Defektheilung“ *in vitro* erreichten.

#### 4.2.1.3. Zellzyklus und ionisierende Strahlung

Schon seit den 60er Jahren des 20 Jahrhunderts ist bekannt, dass die Radiosensitivität von Zellen mit der Zellzyklusphase variiert <sup>[106]</sup>. Das bedeutet einerseits, dass Zellen, die sich bei einsetzender Bestrahlung in empfindlichen Phasen (z.B. späte G<sub>2</sub> oder Mitose-Phase) befinden, schneller und bei geringeren Dosen getötet werden und andererseits, dass durch Strahlung geschädigte Zellen im Zellzyklus bis zu den empfindlichen Phasenabschnitten voranschreiten und dort verweilen bzw. sich synchronisieren (sog. Phasenblock).

In unseren Versuchen steigt der Anteil der sich in der G<sub>2</sub>M-Phase befindenden Zellen mit steigender Dosis an (s.a. 1.6.2.2.).

Wiskirchen et al. <sup>[98]</sup> verzeichnen ebenfalls eine Verschiebung des G<sub>2</sub>/M-Phasen-Anteils der bestrahlten Zellen. Der Phasenblock äußert sich dabei für die 8Gy-Gruppe in einer Verdopplung des prozentualen Phasenanteils von 12 auf 24% an Tag 22, was kongruent mit unseren Beobachtungen an Tag 20 für diese Behandlungsbedingung ist.

Fareh et al. <sup>[105]</sup> berichten über ihre Versuche mit proliferierenden SMCs in Zellkultur, dass  $\beta$ -Strahlung nur einen G<sub>1</sub>-, jedoch keinen signifikanten G<sub>2</sub>-Block (post radiatio) induziert. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen

sein, dass die Zellen vor Bestrahlung mediumdepriviert waren und somit alle in der G<sub>1</sub>-Phase synchronisiert bestrahlt wurden.

Mayberg et al. <sup>[102]</sup> beschreiben in ihren Arbeiten an kultivierten und bestrahlten SMCs einen reversiblen Anstieg der zyklusregulierenden Proteine Tp53 (=p53) und Cdkn1a (=p21). Eine p52-Akkumulation ist (u.a.) mit einem G<sub>1</sub>- und einem G<sub>2</sub>-Phasenblock assoziiert und p21 induziert (u.a.) einen G<sub>1</sub>-Arrest sowie den Eintritt in die S-Phase.

Die Teilungsverzögerungen, die sich nach Bestrahlung an Säugetierzellen beobachten lassen, können als Komponenten einen G<sub>1</sub>-Arrest sowie S-Phasenverzögerungen und G<sub>2</sub>-Blöcke aufzeigen <sup>[107]</sup>. Aus Versuchen an zyklussynchronisierten Zellen kann dabei als „biologisch sinnvolle Faustregel“ abgeleitet werden, dass die nach Bestrahlung zu erwartende Teilungsverzögerung umso größer ist, je weiter die Zelle bereits in ihrem Zyklus in Richtung auf die nächste Zellteilung vorangeschritten ist. Für die Phasenblockbildung nicht-synchronisierter Zellen bzw. die Zyklusprogression nach Bestrahlung lässt sich folgendes festhalten:

- Eine Verzögerung der S-Phase findet sich typischerweise nach Strahlungseinwirkung relativ hoher Dosen (>5Gy).
- Eine G<sub>2</sub>-Phasenarretierung findet sich nahezu in jeder eukaryonten Zelle und tritt nach Applikation hoher sowie niedriger Dosen (auch <1Gy) auf.
- Ein G<sub>1</sub>-Arrest wird nicht in allen Zelllinien nach Bestrahlung gefunden (es besteht eine Abhängigkeit zum p53-Status der Zell-Linie).
- Während des G<sub>2</sub>-Phase Blocks nach der Exposition genotoxischer Agentien scheinen die beschädigten Zellen DNA zu reparieren.

#### 4.2.2. Die Radiobiologie endovaskulärer Bestrahlung – Beobachtungen aus Tiermodellen

Ebenso wie die Tatsache, dass Tierversuche nur bedingt die medizinischen Gegebenheiten der klinischen Praxis widerspiegeln können, geben Laborversuche an glatten Muskelzellen *in vitro* nur schematisiert und idealisiert

die Bedingungen wieder, die an einer *in vivo* bestrahlten Gefäßwand vorzufinden sind. Unser derzeitiges Verständnis von den Prozessen, welche eine endovaskuläre Bestrahlung nach Angioplastie in einem atherosklerotischen Gefäß hervorruft, basiert hauptsächlich auf tierexperimentellen Untersuchungen [s.a. 1.3.]. Die am häufigsten dabei eingesetzten Spezies sind Schweine, Kaninchen und Ratten. Die Modellhaftigkeit, deren mangelndes Bewusstsein oft zu unerwarteten Ergebnissen in klinischen Studien führt, wird zum Beispiel anhand des Schweinmodells deutlich<sup>[112]</sup>:

- Manche Beobachtungen im Tiermodell könnten auf die (sich vom Menschen unterscheidende) immunologisch-allergische Disposition dieses speziellen Tiermodells zurückzuführen sein.
- Das Tiermodell der balloninduzierten Gefäßwandverletzung (des eventuell hypercholesterämischen Tieres) ist nicht der Angioplastie an der Stelle des zugrunde liegenden atherosklerotischen Prozesses beim Menschen gleichzusetzen.
- Das primäre Versagen radioaktiver Stents in klinischen Studien hängt mit dem „Rand-Effekt“ zusammen und nicht mit gesteigerter NIH, wie sie im Schweine-Tiermodell beobachtet werden konnte.
- Tiere weisen ein vom Menschen differierendes zeitliches Muster bezüglich Heilungsprozessen auf, das mit ihrer unterschiedlichen Lebenserwartung zusammenhängen mag. Allgemein benötigen menschliche Koronararterien ca. 6 Monate um nach Verletzung auszuheilen, wohingegen Iliakalarterien vom Schwein und Hasen nur ca. einen Monat benötigen.
- Möglich ist auch, dass begleitende Anti-plättchentherapie beim Schwein (bei gleichen Plasmaspiegeln) weniger effektiv die Thromboseentstehung verhindern kann als beim Menschen.
- Das vorherrschende pathophysiologische Element scheint beim Menschen bei der ISR eher die myofibroblastisch-zelluläre Proliferation zu sein, beim Schwein eher thrombose-getriggerte NIH.

Unterschiede, die naheliegenderweise auch zwischen den einzelnen Tierarten selbst bestehen, haben dazu geführt, dass der Mechanismus der



Strahlenwirkung bei der Restenose noch nicht abschließend geklärt ist. Ebenso herrscht daher noch keine definitive Einigung über das eigentliche Zielgewebe (bzw. die Referenztiefe der Dosisangaben) oder die Langzeitwirkungen einer Therapie (dosisabhängige reversible Inhibition bzw. Verzögerung vs. Inaktivierung und Prävention der Restenose) sowie über das Dosisfenster, das bei einem tolerablen Level an Komplikationen therapeutisch wünschenswerte Effekte zeigt.

Zusammenfassend können aus den präklinischen Studien folgende Beobachtungen über vaskuläre Strahlenwirkungen nach PTA festgehalten werden <sup>[113-116]</sup>.

- Es wird mehrheitlich (bei Einsatz von Dosen >7Gy) eine verminderte Zellproliferation in den Gefäßwandschichten, eine verzögerte Re-endothelialisierung und eine Suppression der Neo-Intimaausbildung beschrieben.
- Der Einsatz von Strahlung führt in einigen Versuchen zu einem positiven Remodeling der Gefäßwand durch Hemmung der Fibrosierung der Adventitia (s.a. 1.3.4.).
- Vereinzelt wird ebenfalls eine Hemmung der Ausbildung von vasa-vasorum als mitbeteiligter Mechanismus diskutiert <sup>[117]</sup>.
- Über strahleninduzierte Apoptose in der Gefäßwand liegen konträre Meinungen vor.

Gefäßbestrahlungen bringen möglicherweise auch einige Komplikationen mit sich:

- Späte thrombotische Gefäßokklusionen <sup>[122,124]</sup>.
- Einhergehend mit der Verhinderung der Ausbildung einer Neointima inhibiert die Strahlung den Abheilungsprozess durch verzögerte Re-Endothelialisation der Angioplastie-Stelle und der Stent-Streben und führt somit zu einer verlängerten Exposition thrombogener Oberflächen für Plättchen und Fibrin. Angepasste, i.e. prolongierte Anti-Plättchen-Therapie (6-12 Monate) senkt das Auftreten später Thrombosen auf Kontroll-Niveau.

- Beachtung sollte auch die Tatsache finden, dass radioaktive Strahlung, v.a. in sehr hohen Dosen, die Ausbildung von Aneurysmata oder Pseudoaneurysmata begünstigen kann.
- Sowohl bei der Verwendung radioaktiver Stents als auch bei der katheterbasierten Radiotherapie konnten nach einiger Zeit Stenosen am proximalen und distalen Ende der ehemals bestrahlten Angioplastiestelle beobachtet werden. <sup>[129]</sup> Diese „paradoxen Einengungen“ werden als Rand-Effekt („edge-effect, oder „candy-wrapper“-effect) bezeichnet.
- Intravaskuläre Ultraschall-Untersuchungen 6 Monate nach Bestrahlung haben vor kurzer Zeit Stent-Gefäßwand Separationen identifizieren können. Die klinische Bedeutung dieser Beobachtungen ist noch unklar.

**Tabelle 7: Präklinische Studien mit endovaskulärer  $\beta$ -Strahlung**

<u>Arbeitsgruppe</u>	<u>Model</u>	<u>Isotop</u>	<u>Dosis / Aktivität</u>	<u>Resultat</u>
Waksman et al. (1995) <sup>[114]</sup>	Schwein	<sup>90</sup> Sr/Y IVBT	7-56Gy	abnehmende NIH von 7-56Gy 14Tage p.i.
Verin et al. (1995) <sup>[116]</sup>	Hase	<sup>90</sup> Y IVBT	6,12,18Gy	reduz. NIH bei 18Gy, kein Effekt bei 6 und 12Gy
Kollum et al. (2001) <sup>[117]</sup>	Schwein	<sup>90</sup> Y (und <sup>192</sup> Ir) IVBT	18Gy	reduz. NIH mit 18Gy, keine Diff. zwischen. $\beta$ und $\gamma$ nach 14 Tagen
Kaluza et al. (2001) <sup>[118]</sup>	Schwein	<sup>32</sup> P IVBT	0-36Gy	kein Effekt bei 7-9Gy; reduz. NIH bei 14-26Gy 4 Wochen p.i.
Carter et al. (1996) <sup>[119]</sup>	Schwein	<sup>32</sup> P Stent	0,14-23 $\mu$ Ci	reduz. NIH (auf 37% bei 0,14 $\mu$ Ci) in allen Gruppen
Hehrlein et al. (1996) <sup>[120]</sup>	Hase	<sup>32</sup> P Stent	4 und 13 $\mu$ Ci	red. NIH bei 13 $\mu$ Ci nach 4 und 12 Wochen

*Die Tabelle 7 listet auszugsweise einige tier-experimentelle Studien mit endovaskulärer  $\beta$ -Strahlung auf. Studien mit  $\gamma$ -Strahlern zeigen bei vergleichbarem Versuchsdesign ähnliche Ergebnisse.*

*Es findet sich somit der in der Strahlentherapie geltende Grundsatz bestätigt, dass gleiche Dosen am gleichen Ort die gleichen biologische Wirkungen erzielen – unabhängig von der Strahlenart.*

#### 4.2.3. „From bench to bedside“ – Berücksichtigungen bei der Umsetzung von Erkenntnissen aus in-vitro Experimenten und präklinischen Studien

Transponiert man das gewonnene Wissen aus Labor- und präklinischen Experimenten auf die Praktikabilität, die klinische Bedingungen fordern, so ergeben sich eine Reihe neuer Fragestellungen. Bezüglich der endovaskulären Strahlentherapie spielen dazu viele Faktoren eine Rolle wie zum Beispiel: die Sicherheit der Anwendung (bzw. der „benefit“ und die Nebenwirkungen für den Patienten), die Sicherheit für das Personal, der apparative und logistische Aufwand bzw. die Wirtschaftlichkeit der Behandlung, der Bestrahlungsmodus und die günstigste Wahl des Nuklides und seiner Eigenschaften, die Art und Beschaffenheit der zu therapierenden Läsion und Arterie etc..

##### 4.2.3.1. Die Wahl des Radionuklides

Momentan steht eine Reihe verschiedener Radio-Isotope für die EVST zur Auswahl. Prinzipiell kommen bezüglich der Strahlenqualität  $\beta$ - und/oder  $\gamma$ -Strahler zum Einsatz. Der am häufigsten verwendete  $\gamma$ -Strahler ist  $^{192}\text{Ir}$  mit einer Halbwertszeit von 74 Tagen und einer mittleren Teilchenenergie von 0,37 MeV. Die gängigsten  $\beta$ -Strahler sind in Tabelle 8 zusammengefasst:

**Tabelle 8: Beta –Isotope zur endovaskulären Strahlentherapie**

In der Restenose-Therapie verwendete $\beta$ -Isotope					
<u>Isotop</u>	$\tau_{1/2}$	<u><math>E_{\text{max.}}</math></u> <u>[MeV]</u>	<u><math>E_{\text{mittel}}</math></u> <u>[MeV]</u>	<u>Benötigte</u> <u>Aktivität</u>	<u>moment. verfügbare</u> <u>Applikationsart</u>
$^{90}\text{Sr/Y}$	28 a	2,28*	0,93	50 mCi	Katheter, nicht-zentriert
$^{90}\text{Y}$	64 h	2,28	0,93	50 mCi	segmentierter Ballon
$^{32}\text{P}$	14 d	1,71	0,69	40 mCi	helikaler Ballon
$^{32}\text{P}$	14 d	1,71	0,69	1-20 $\mu\text{Ci}$	Isosent
$^{186}\text{Re}$	90 h	1,08	0,38	300 mCi	Liquid Ballon
$^{188}\text{Re}$	17 h	2,21	0,77	100 mCi	Liquid Ballon
$^{133}\text{Xe}$	5,3 d	0,36	0,11	2-5 mCi	Gas Ballon
$^{106}\text{Rh}$	1 a	3,54	0,18	30 mCi	Gas Ballon

*In der Tabelle sind die  $\beta$ -Emitter aufgelistet, die in klinischen Pilotstudien und präklinischen Versuchen zur endovaskulären Strahlentherapie eingesetzt worden sind<sup>[121]</sup>.*

Um eine ausreichende Gewebspenetration der  $\beta$ -Strahlen gewährleisten zu können, werden Quellen hoher Energie und Aktivität eingesetzt. Bei  $\gamma$ -Strahlern sind wegen der komplizierteren Abschirmungsmaßnahmen nur Niedrig-Aktivitäts Quellen praktikabel.

Für die gängigsten Betastrahler in der IVBT ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ) ergaben Messungen eine hohe Übereinstimmung in Bezug auf die mittlere  $\beta$ -Energie und die erforderliche spezifische Aktivität, die für eine definierte Dosisleistung erforderlich ist. Trotzdem gibt es in Hinblick auf klinische und/oder prozedurale Aspekte Unterschiede, die je nach Fragestellung das eine oder andere Nuklid bevorzugen lassen.

Ein Ballonkatheter mit einem flüssigen  $\beta$ -Strahler wie z.B. aus einem Generator eluiertes  $^{188}\text{Re}$  zentriert sich selbst, liegt der Gefäßwand gleichmäßig an und bewirkt eine homogene und berechenbare Strahlenexposition am dilatierten Gefäß in akzeptabler Zeit – obwohl nicht vergessen werden darf, dass die Bestrahlungsdauer durch den vollständig unterbrochenen Blutfluss und somit durch die Ischämietoleranz des Patienten limitiert ist. Andererseits sind Sicherheitsaspekte bezüglich des Risikos einer möglichen Ballonruptur mit nachfolgender Ausschwemmung des Nuklides in die Blutbahn zu

berücksichtigen. Re-188 hat den Vorteil, dass es im Falle einer Verteilung im Systemkreislauf renal eliminiert wird, wohingegen für  $^{90}\text{Y}$  eine ossäre Akkumulation angenommen werden muss.  $^{188}\text{Re}$  ist kein reiner  $\beta$ -Strahler, sondern besitzt zusätzlich  $\gamma$ -Strahlung mit einer Energie von 155keV in einer Intensität von 15%. Auf der einen Seite führt dies zu einer (wenn auch geringen) zusätzlichen Ganzkörperbelastung des Patienten während der Exposition (für das Personal im Katheterlabor ist der Strahlungsanteil relativ unkompliziert abzuschirmen), andererseits sind über den  $\gamma$ -Anteil Kontaminations- und Dosimetrie-Kontrollen möglich <sup>[123]</sup>.

Die Verwendung von Strontium/Yttrium wiederum erlaubt die Fabrikation miniaturisierter, flexibler Festkörper-Strahlenquellen, die mit konventionellen Angioplastieballons kompatibel sind und sich hervorragend zum Hoch-Dosis-Afterloading in gewundenen Gefäßen kleinen Kalibers wie Koronararterien eignen. Eine Selbstzentrierung ist bei diesem soliden Strahler zwar nicht gewährleistet, die Gefahr einer systemisch streuenden Kontamination andererseits allerdings auch nicht gegeben.

$\beta$ -Strahler mit kurzer Halbwertszeit wie  $^{32}\text{P}$  oder  $^{90}\text{Y}$  können bevorzugt bei dauerhafter Einbringung des Nuklides mittels eines radioaktiven Stents zur Anwendung kommen, Strahler mit längerer Halbwertszeit sind wegen des zeitlich geringeren Aktivitätsabfalls bei der IVBT in der Handhabung praktikabler. Dies ist der Grund, warum in der IVBT das Isotop 90-Yttrium mit seinem Mutternuklid 90-Strontium gekoppelt eingesetzt wird.  $^{90}\text{Sr}$  besitzt eine Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 28$  Jahren, allerdings eine sehr geringe  $\beta$ -Strahlungsenergie ( $E_{\text{max}}=0,55\text{MeV}$ ), welche von der Ummantelung unter Erzeugung vernachlässigbar geringer Bremsstrahlung absorbiert wird. So wird die wünschenswert lange Halbwertszeit von 90-Strontium mit der hohen  $\beta$ -Energie von 90-Yttrium kombiniert.

**Tabelle 9: BETA- VS. GAMMA Strahlung**

$\beta^-$	$\gamma$
korpuskuläre Strahlung (Elektronen)	elektromagnetische Strahlung
Relativ hohe Energie pro Zerfall (Dosisleistung pro GBq in 1 mm Abst. für z.B. $^{90}\text{Y}$ = 161 Gy/min)	Relativ geringe Energie pro Zerfall (Dosisleistung pro GBq in 1 mm Abst. für z.B. $^{192}\text{Ir}$ = 1,85 Gy/min)
Geringe Reichweite und Gewebepenetration, limitierte Anwendung für großlumige Gefäße	Hohe Reichweite, guter Einsatz in großen (peripheren) Gefäßen (>4mm)
Weniger Exposition für Personal und umgebendes Gewebe, weniger Abschirmung erforderlich	Hohe Exposition auch für das Personal, aufwendige Abschirmung erforderlich
Kurze Verweildauer von $\beta$ -Quellen mit hoher Aktivität bei IVBT (2-4 min)	Längere Expositionszeit erforderlich (15-30 min) wegen niedrigen Dosisabfalls in der Gefäßwand
Schwierigkeit einer homogenen Dosisapplikation, Quellenzentrierung notwendig	Homogene Dosisverteilung gewährleistet

Die Tabelle stellt die klinisch relevanten Vor- und Nachteile der eingesetzten verschiedenen Strahlungsqualitäten gegenüber<sup>[122]</sup>.

#### 4.2.3.2. Die Wahl des günstigsten Dosisbereichs

Dosisfindung:

Die Angaben über applizierte Einfachdosen (i.e. nicht-fraktionierte Dosen), die in tierexperimentellen Modellen in einem Zeitraum bis zu 18 Monaten nach Bestrahlung die Restenosebildung verhindern konnten, schwanken zwischen 4,5Gy und 56Gy (bzw. 8-40Gy<sup>[125]</sup>). Die Dosen, die in klinischen Studien beim Menschen eingesetzt werden, können grob mit 15-25Gy im Abstand von 1mm in der Arterienwand angegeben werden (s.a. 4.2.4.). Empfehlungen der

American Brachytherapy Society für die Behandlung von Läsionen peripherer Arterien beziffern eine Dosis von 12-18Gy<sup>[126]</sup>. Diese breiten Dosispektren und die Diskrepanzen zwischen den tierexperimentellen und klinischen Studien sind wahrscheinlich hauptsächlich auf unterschiedliche Behandlungsmethoden zurückzuführen; zum Beispiel wurden viele Tiere von außen bestrahlt, so dass eine homogene Dosisverteilung an der Arterie vorgelegen hat. Beim Menschen werden die Strahlungsquellen meist in der Arterie plaziert, der Dosisabfall mit der Entfernung von der Quelle ist dann enorm. Daraus ergibt sich ein weiteres Problem, das die Vergleichbarkeit der effektiven Dosisangaben schwer miteinander vergleichen lässt: Die unterschiedlichen Definitionen der Bezugspunkte für die Dosis. Einige Autoren definieren die Dosis an einer 2mm von der Arterienmitte entfernten Stelle, andere definieren sie in einer Tiefe von 0,5mm oder 1mm in der Arterienwand oder im Abstand von der Quellenoberfläche. Liegt das Zielgewebe weiter in der Peripherie der Arterienwand (Adventitia), so bewirken  $\beta$ -Strahlen wegen ihrer geringeren Reichweite bzw. ihres rapiden Dosisabfalls im Gewebe dort einen geringeren Effekt als  $\gamma$ -Strahlen, wenn für beide Strahlenarten die gleiche Dosis in 0,5mm Tiefe angegeben worden ist. Ferner erhält zum Beispiel beim Einsatz ein und derselben  $\beta$ -Quelle die tunica intima als Bezugspunkt bis zu 60Gy, während an die tunica adventitia weniger als 20Gy abgegeben werden<sup>[124]</sup>.

Der Effekt gleicher Dosen von radioaktiven Stents und von Dosen der IVBT wird bei radioaktiven Stents weitaus geringer sein, da hierbei die Dosis über einen weitaus längeren Zeitraum appliziert wird (die Dosisleistung ist somit viel geringer) und somit zelluläre Reparaturmechanismen wirkungsvoll arbeiten können. Equivalent-Stent-Dosen, die den gleichen biologischen Effekt wie eine Einmalexposition hervorrufen, müssten für eine 10Gy Einfachdosis doppelt so hoch sein, für eine 20Gy-Dosis sogar dreimal höher<sup>[124]</sup>.

Es ist offensichtlich, dass diejenigen Dosen, die in unserem in vitro Model ein Sistieren der Zellproliferation bewirken, geringer sind als die in vivo

erforderliche Strahlendosis zur Langzeitprävention der Restenose: Mögliche Gründe dafür sind neben den o.g.:

- Es proliferiert nur eine kleinere Fraktion von SMCs oder in geringerer reproduktiver Aktivität als die 20% FCS-stimulierten SMCs, was die SMCs im Gefäß radioresistenter macht.
- Die Ballondilatation verursacht durch die Kompression ein lokales hypoxisches Milieu, was die Radiosensitivität der Zellen abnehmen lässt.
- Die Dosisabschätzung in vitro ist nicht exakt: Es konnte auch nach zweimaligem Waschen mit PBS noch Aktivität in den Zellkulturflaschen nachgewiesen werden, die auch noch an Tag 8 nach wiederholtem Waschen noch nicht den Werten vor Tag 0 entsprochen hat. In diesem Zusammenhang sind auch andere Effekte, z.B. infolge einer Inkorporation des Radionuklides von SMCs, nicht auszuschließen.
- Proliferierende Zellen sind radiosensitiver. In unserem Modell waren die Zellen zum Zeitpunkt der Strahlenexposition schon maximal stimuliert, in der klinischen Situation findet mit der Intervention erst die Initiation des Reizes ein, auf den die bis dahin weitgehend unstimulierten SMCs nach einer Umstellungsphase (lag-Phase) mit gesteigerter Proliferation antworten.

#### **4.2.3.3. Das effektivste Timing**

Die proliferierenden Zellen sind das Ziel des therapeutischen Einsatzes ionisierender Strahlung im Rahmen der PTA. Die Proliferation der Zellen, welche sie empfindlicher gegenüber Strahlung macht, setzt nach dem Verletzungsreiz, also nach der Intervention, ein. Empfindliche Proliferationsassays zeigen, dass dies schon innerhalb der ersten Stunde(n) nach Gefäßdilatation der Fall ist (s.a.1.3.3.1.). Somit liegt nahe, dass der Einsatz ionisierender Strahlung kurze Zeit nach der Intervention am effektivsten sein müsste. Mayberg et al. <sup>[102]</sup> konnten in Experimenten an der A. carotis der Ratte nachweisen, dass Bestrahlung 20 min nach (für 10Gy) und 24 Stunden vor (für 1Gy) PTA die vorteilhaftesten Ergebnisse bringt. Aus Untersuchungen von Waksman et al. <sup>[127]</sup> am Schweinemodell geht hervor, dass Bestrahlungen 2 Tage nach Intervention bei gleicher Dosis (7Gy) den Effekt gegenüber einer



Bestrahlung unmittelbar nach Dilatation signifikant verbessert. Bei der IVBT wird die Strahlenquelle über dieselbe Vorrichtung in das Gefäß eingeführt, über die unmittelbar zuvor die Aufdehnung erfolgte. Für die Implantation eines radioaktiven Stents gilt dies auch mit dem Unterschied, dass hierbei die Strahlung protrahiert abgegeben wird und somit länger in die beginnende proliferative Phase der Zellen fällt. Beim Einsatz externer, nicht-invasiver Bestrahlung wäre man in Bezug auf die Wahl des Bestrahlungszeitpunktes unabhängiger.

#### **4.2.3.4. Die Wahl der Applikationsart**

Viele der ersten Experimente an Tieren zum Einsatz von Strahlung bei der Restenoseetherapie sind mit externer Bestrahlung vorgenommen worden, allerdings gibt es dazu keine größeren klinischen Studien. Externe Bestrahlung hat den Vorteil der fehlenden Invasivität, sodass das Intervall zwischen Katheterintervention und Bestrahlung frei gewählt werden kann. Des Weiteren kann mittels externer Bestrahlung eine gänzlich homogene Dosisverteilung im Zielvolumen gewährleistet werden. Andererseits wird es („auch mit modernen Verfahren wie der „Intensitätsmodulierten Strahlentherapie“) kaum realisierbar sein die gewünschte Strahlung so zu applizieren, dass dabei eine ausreichende Aussparung des umliegenden Gewebes gewährleistet ist. Das gilt insbesondere für die Bestrahlung von Koronararterien<sup>[124]</sup>. In der Peripherie (zum Beispiel bei der Behandlung arterio-venöser Dialysezugänge) ist externe Bestrahlung schon eingesetzt worden<sup>[128]</sup>.

Die Intravaskuläre Brachytherapie (IVBT) umfasst eine Reihe unterschiedlich designter katheterbasierter Applikationssysteme. Sie hat sich als das erste effektive Werkzeug zur Prävention der In-Stent-Stenose etabliert. Es kommen dabei  $\beta$ - und  $\gamma$ -Nuklide in fester, flüssiger oder (weniger) gasförmiger Form zum Einsatz. Die Verweilzeiten der Nuklide im Gefäß an der Läsionsstelle betragen für  $\beta$ -Strahler ca. 2-4 Minuten und für  $\gamma$ -Strahler ca. 13-30 Minuten.

Eine weitere Möglichkeit die Nuklide möglichst nah an den Läsionsort zu bringen besteht in der Verwendung radioaktiver Stents <sup>[124, 129]</sup>. Da die radioaktiven Stents im Körper verbleiben, werden hierbei Nuklide mit kurzer Halbwertszeit eingesetzt. Die Aktivität eines radioaktiven Stents kann (in Abhängigkeit von der Halbwertszeit des Nuklides) bis zu mehreren tausendfach geringer sein als diejenige einer Quelle zur IVBT, die die Dosis innerhalb von Minuten emittieren muss. Nach dem erfolgversprechenden Einsatz radioaktiver Stents in Tierversuchen sind erste klinische Studien dazu sehr unbefriedigend verlaufen. Das Versagen der Stents wird dabei hauptsächlich auf den beobachteten „Kanteneffekt“ oder „candy-wrapper“-Effekt zurückgeführt, der sich in Stenosen an den Enden des Stents äußert. Ob die Kanteneffekte durch selbst-expandierende Stents vermieden werden können, bei denen eine Traumatisierung des Gefäßes jenseits der vom Stent emittierten, therapeutisch wirksamen Strahlung ausgeschlossen ist, werden künftige Untersuchungen zeigen.

#### **4.2.3.5. Die wirtschaftliche Effizienz einer endovaskulären Strahlentherapie**

Die eigentlichen Kosten des Krankheitsbildes der vaskulären Restenose sind nicht zuletzt deshalb so schwer zu beziffern, weil sie sich aus direkten und indirekten Kosten zusammensetzen. Direkte Kosten umfassen beispielsweise zusätzliche Patientenvorstellungen beim Arzt, zusätzliche Medikationen, nicht-invasive Untersuchungen, katheterinterventionelle Eingriffe (resp. Revaskularisationen), Hospitalisierungen im Anschluss an die Intervention oder infolge Infarzierungen oder angina pectoris. Indirekte Kosten schließen den Arbeitsausfall des Patienten o.ä. mit ein (s.a. 1.1.) <sup>[6]</sup>. Cohen et al. <sup>[130]</sup>, die sich bei ihren Berechnungen auf die GAMMA-1 Studie beziehen, errechnen durch den Einsatz intrakoronarer Brachytherapie Mehrkosten (im Vergleich zur konventionellen Therapie der Restenose) von 4100 US-Dollar. Diese Kostenangabe inkludiert die derzeitigen Materialkosten für eine Brachytherapie von 2500\$ sowie die Amortisation der initialen Kosten,

die für die Aufrüstung der Katheterlaboratorien notwendig sind (25000\$ für einen Zeitraum von 5 Jahren). Des Weiteren erbrachte die Reduktion der Restenoserate durch Brachytherapie in der GAMMA-1 Studie einen Kostenausgleich von 2300\$ im darauffolgenden Jahr. Die Autoren gehen davon aus, dass mit moderneren Praktiken und Vorgehensweisen (i.e. Vermeidung wiederholten „Stentens“ im Zeitraum der Brachytherapie, Wegfall des Routineeinsatzes endovaskulären Ultraschalls, extendierte Anti-Plättchentherapie) der Langzeit-Gewinn und–Nutzen die initialen 4100\$ pro Prozedur gänzlich kompensieren dürfte.

Die Materialkosten für einen medikamenten-eluierenden Stent belaufen sich schätzungsweise auf 2300 €. Im Gegensatz zur Brachytherapie, deren Einsatzempfehlung nur bei revaskularisations-bedürftigen In-Stent-Restenosen gegeben ist, könnten/müssten antiproliferativ beschichtete Stents alle Stentimplantationen ersetzen. Somit erstellt S. Silber<sup>[131]</sup> für Deutschland eine Kalkulation, der zufolge der Einsatz der IVBT jährlich 62,5 Mio. € und der Einsatz von DES wegen des uneingeschränkten Einsatzes Kosten von 500 Mio. € verursachen würde.

#### 4.2.4. Klinische Studien

In den vergangenen 6 Jahren hat es zur Evaluation der Effektivität des Einsatzes radioaktiver Strahlung zur Behandlung der Restenose über vierzig klinische Studien gegeben, an denen insgesamt über 6600 Patienten teilgenommen haben<sup>[132]</sup>. Die durchgeführten einzel- und multizentrischen Studien bereiten aufgrund ihres zum Teil sehr unterschiedlichen Designs einige Probleme bei der Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse. Dies ist hauptsächlich auf folgende Punkte zurückzuführen<sup>[124]</sup>:

- Differenzen in der Definition der Restenose: sowohl klinisch als auch angiographisch (s.a. 1.2.)
- Verschiedene Endpunkte: Bei Koronarinterventionen hauptsächlich sog. MACEs (major adverse cardiac effects); diese schließen Reintervention/-kanalisation, myokardiale Infarzierungen, angina pectoris, Tod des Patienten mit ein.

- Die Rekrutierung zum Teil sehr verschiedenen Patientengutes:
  - Unterschiede in Altersstruktur, Komorbiditäten und Risikofaktoren etc.
- Einschluss qualitativ und quantitativ differierender Läsionstypen:
  - In-Stent-Restenosen, De-novo-Stenosen, mehrfach-Gefäßerkrankungen, verschieden lange Restenosen unterschiedlichen Lumenkalibers und andere.
- Die Verwendung einer Vielzahl unterschiedlicher Applikationssysteme.
- Keine einheitliche Begleitmedikation, z.B. in der sich anschließenden medikamentösen Anti-Plättchentherapie.

Im Folgenden sind einige Studien aufgeführt, die mit  $\beta$ -Isotopen als verwendeten Radionukliden durchgeführt wurden <sup>[132, 133, 124, 121]</sup>. Die Studien mit <sup>192</sup>Ir als  $\gamma$ -Strahler zeigen die gleichen Ergebnisse <sup>[132]</sup>.

**Tabelle 10: Klinische Studien mit IVBT unter Verwendung von  $\beta$ -Isotopen**

Name	Design	Appl.-System	Isotop / Dosis	Resultat
Beta-Cath	744 Pat., de-novo-Läsionen	Beta-Chath, (radioaktive Kette aus Zylindern, nicht zentriert)	<sup>90</sup> Sr/Y; 18-20Gy in 2mm	Reduktion um 13% (LAS*) bei Pat mit PTA. Schlechte Ergebn. bei Pat. nach Stent-Implantation
GENEVA $\beta$ -MED	181 Pat., de-novo	Katheter, zentrierter Draht	<sup>90</sup> Y, 9,12,15, 18 Gy in 1mm	6-Monats-Resultate: 9 Gy → 28% Rest. 12Gy → 16% Rest. 15Gy → 18% Rest. 18Gy → 8% Rest.
BERT	78 Pat., de-novo-Läsionen	Beta- Cath-System	<sup>90</sup> Sr/Y; 12, 14,16 Gy in 2mm	Restenoserate (im LAS*) 24%
BRIE	149 Pat. de-novo	Beta- Cath-System	14-18Gy in 2 mm	Restenoserate (im LAS*) 33,6%
PREVENT	80 Pat., de-novo+ ISR Läsionen	radioaktiver Draht, spiral-zentrierter Ballon	<sup>32</sup> P; 16, 20, 24Gy in 1mm	Angiographische Restenosereduktion Post Rad. von 50% auf 22% (LAS*)

BETTER de-novo	83 Pat. de-novo	$\beta$ -Ballon	20 Gy	30% Restenoserate nach 6 Monaten
BETA-WRIST	50 Pat., ISR	Quellen-zentrierter Ballon	$^{90}\text{Y}$ , 20,6 Gy in 1mm	34% Restenose (LAS*) nach 6 Monaten. Ergebnisse ähnlich der $\gamma$ -WRIST
START	244 Pat. mit ISR	Beta-Chath	$^{90}\text{Sr/Y}$ ; 18-23Gy in 2mm	Restenose-Reduktion in der bestrahlten Gruppe von 45,2% auf 28%.(LAS*) Keine späten Thrombosen
INHIBIT	166 Pat., ISR	Guidant-System, zentrierter Ballon	$^{32}\text{P}$ ; 20Gy in 1mm	Reduktion der Restenose von 52% (Kontrolle) auf 26% (LAS)
BRITE	27 Pat., ISR	Ballon	$^{32}\text{P}$ ; 20Gy in 1mm	7,7% (LAS*) Restenoseraten

Die Tabelle gibt klinische Studien wieder, bei denen  $^{90}\text{Sr/Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$  oder  $^{32}\text{P}$  zur Therapie der vaskulären Restenose eingesetzt worden ist.

- \*LAS= längstes analysiertes Segment (der Arterie). Aufgrund des auch bei der IVBT auftretenden Randeffekts kann es zu Restenosen im Gefäß kommen, obwohl die ursprüngliche Läsionsstelle frei ist. Daher bezieht sich hier die Restenoserate auf das ganze Gefäß.

- die Patientenangaben beziehen sich auf diejenigen, die IVBT erhalten haben. Diejenigen, die der Kontrollgruppe zugerechnet worden sind, sind nicht mitaufgeführt.

**Tabelle 11: Klinische Studien mit radioaktiven Stents**

Name	Design	Appl.-System	Isotop/ Dosis	Resultat
IRIS 1A	32 Pat.	Stent, 0,5-1 $\mu$ Ci	<sup>32</sup> P; 5Gy in 1mm	Kombiniertes Resultat für IRIS 1A und IRIS 1B: Restenose in 40% der Fälle
IRIS 1B	25 Pat.	Stent, 0,75- 1,5 $\mu$ Ci	<sup>32</sup> P; 8- 11Gy in 1mm	
MILAN	122 Pat.	Stent, 0,75- 12 $\mu$ Ci	<sup>32</sup> P; 6- 90Gy in 1mm	>40% Restenose inf. Randeffekt. Trotz Inhibition neointimaler Hyperplasie bei Stents > 3 $\mu$ Ci

*Tabelle 12 listet klinische Studien mit <sup>32</sup>P-beschichteten Stents zur Restenoseprävention auf [121,124].*

Die bis Ende des Jahres 2002 veröffentlichten 41 Studien zur IVBT teilen sich in 14 placebokontrollierte, randomisierte und 27 offene Studien: 22 bei in-Stent-Restenose, zehn bei De-novo-Stenosen (oder Restenosen ohne Stent) als striktes Einschlusskriterium und neun mit allen Stenosearten.

Insgesamt lagen die Restenoseraten im längsten analysierten Koronarsegment in den Kontrollgruppen zwischen 45% und 100% und in den Brachytherapiegruppen zwischen 7,7% und 53,5% [132].

Bei De-novo-Stenosen ist in Anbetracht der Effektivität der antiproliferativ beschichteten Stents jetzt nicht mehr mit einer wichtigen Rolle der intrakoronaren Brachytherapie zu rechnen. Im Gegensatz hierzu stellt die intrakoronare Brachytherapie momentan bei In-Stent-Restenosen die einzige evidenzbasierte interventionelle Therapieform dar.

## 4.3. Die kombinierte Radio-Chemotherapie als mögliche Restenoseprophylaxe

4.3.1. Mechanismen einer kombinierten Radio-Chemotherapie  
Seit längerer Zeit macht man sich bereits in der Onkologie die Tatsache therapeutisch zunutze, dass eine Strahlenapplikation in zeitlicher Korrelation (simultan, konsekutiv, alternierend) mit der Verabreichung bestimmter Medikamente, die meist selbst zytotoxische Eigenschaften besitzen, die Wirkung der Strahlen verstärkt (sog. Radio-Sensibilisierung, Radio-Sensitizing) (s.a. 1.6.3.).

Radiosensibilisierung kann man dabei im engeren Sinne so verstehen, dass die bei der Kombination entstehende Verstärkung des Strahleneffekts nicht (allein) aus der direkten Zellabtötung durch das Zytostatikum resultiert. Dabei können (abgesehen vom eigenen zytotoxischen Effekt der chemotherapeutischen Substanz) andere wesentliche Effekte der Chemotherapeutika mit den Strahleneffekten interagieren. Das betrifft zum Beispiel die Inhibition der Reparatur des subletalen Strahlenschadens<sup>[134]</sup>.

Mechanismen, die der Interaktion zwischen Strahlung und Chemotherapeutikum zugrunde liegen können, sind beispielweise:

- direkte, zusätzliche Zellabtötung durch Chemotherapie
- Modifikation des Steilheitsgrades der Zellüberlebenskurve nach Bestrahlung
- Hemmung der Reparatur des subletalen Strahlenschadens;  
Hemmung der DNA- Reparatur
- Hemmung der Repopulierung
- Akkumulation von Zellen in strahlenempfindlichen Zellzyklusphasen

Als sehr strahlenempfindlich gelten die kurzen G<sub>2</sub>- und M-Phasen. Es existieren experimentelle Hinweise darauf, dass in der G<sub>2</sub>-Phase mit Näherrücken an die Mitose die Fähigkeit der Zellen den Strahlenschaden zu reparieren, abnimmt. Für Taxol konnte z.B. auch eine Verzögerung in G<sub>2</sub>-Phase nachgewiesen werden. Beobachtungen, die die Vermutung stützen, dass bestimmte Agentien

gleiche zelluläre Angriffspunkte besitzen wie sie bei Strahlenschäden beschrieben werden, lassen diese Medikamente interessante Kombinationspartner werden.

Ob in der Kombinationsbehandlung eine kontinuierliche Applikation der Chemotherapie oder eine Gabe als Bolus vorteilhafter ist, ist Gegenstand momentaner Diskussion <sup>[134]</sup>.

#### 4.3.2. kRChT und Restenose

Natürlich sollen die medikamentöse Behandlung und die Radioaktivität auf das selbe Zielvolumen der Gefäßwand wirken. Bezüglich des Wirkorts gilt somit „Idiotopie“.

Prinzipiell sind bei einer kombinierten Radio-Chemotherapie (kRChT) im Hinblick auf das Zeitschema verschiedene Therapiemodi als Behandlungsoptionen denkbar:

##### **Simultane (idiotope) kombinierte Radio-Chemotherapie:**

- Dies entspricht der Therapieform, die bei den durchgeführten in-vitro Experimenten simuliert worden ist. Gleichzeitig mit Bestrahlungsbeginn setzt dabei die Applikation des Medikamentes ein. Überträgt man das Modell auf in-vivo Bedingungen, d.h. versucht man die Experimente in ein klinisches Behandlungsszenario umzusetzen, so entspräche dieses Vorgehen der Implantation eines radioaktiven Stents bei unmittelbar postinterventionellem Einsatz der systemischen (d.h. oral applizierten) Meclofenaminsäurebehandlung (bis 25µM). Unter Berücksichtigung des in diesem speziellen Falle eingesetzten  $\beta^-$ -Strahlers mit der Halbwertszeit von  $T_{1/2}=64$  Stunden würde die Chemotherapie die Strahlungsdauer des Stents bei Weitem überdauern. Als eine weitere Form der simultanen kRChT wäre ein medikamenten-eluierender Stent denkbar, der zusätzlich radioaktiv beschichtet ist (sog. „Hybrid-Stent“). Inwieweit die Entwicklung eines solchen Stents, der



auch lokale Gewebkonzentrationen von 200µM MFS erreichen kann, allerdings technisch realisierbar ist, bleibt abzuwarten.

### **Sequentielle (idiotope) kombinierte Radio-Chemotherapie:**

➤ Auf der anderen Seite ist es natürlich auch denkbar die Bestrahlung und die Pharmako-chemo-therapie hintereinanderschalten. Dabei ergeben sich mehrere Möglichkeiten verschiedener Kombinationen – auch in Bezug auf den Zeitpunkt der PTA, sofern diese nicht akut als Notfall vorgenommen werden muss. Es ist zum Beispiel möglich die medikamentöse Behandlung nach der Bestrahlung zu beginnen, wie es bei Einsatz einer Endovaskulären Brachytherapie (EVBT) statt der Verwendung eines radioaktiven Stents denkbar wäre. Ebenfalls könnte die Implantation eines Medikamenten-eluierenden Stents nach erfolgreicher EVBT diskutiert werden. In diesem Fall konsolidiert also die „Chemotherapie“ mit MFS die Effekte der Radiotherapie. Auf der anderen Seite besteht die weitere Möglichkeit die medikamentöse Therapie der perkutanen Intervention zeitlich vorgeschaltet zu beginnen, vor dem Hintergrund, dass die Zellen im interessierenden Zielvolumen präinterventionell für die während des Eingriffs applizierte Radioaktivität vorsensibilisiert werden. Es ist dabei aber zu beachten, dass die glatten Gefäßmuskelzellen der tunica media des betreffenden Arterienteilstücks noch nicht den durch die Intervention hervorgerufenen Proliferationsreizen unterliegen und es wäre somit denkbar, dass sie weniger empfänglich für die Medikamentenwirkung sind. Hinzu kommt, dass möglicherweise erst die fokale Traumatisierung der Arterienwand bei deren Aufdehnung dazu führt, dass das Medikament aus dem Blutstrom den glatten Media-Muskelzellen in ausreichendem Maße zugänglich ist.

Sindermann et al. <sup>[135]</sup> demonstrieren in einem rein pharmakologischen Konzept die synergistischen antiproliferativen Effekte einer Kombinationsbehandlung von Cyclosporin A (83-415nM) und Paclitaxel (10-20nM) auf SMCs in vitro. Es zeigt sich dabei für die Kombination ein hoch-supra-additiver Effekt mit

signifikantem Rückgang der Zellzahl. Außerdem wird ein Arrest am G<sub>2</sub>/M-Übergang im Zellzyklus beschrieben. Die Autoren erwägen bei der klinischen Umsetzung der Beobachtungen ebenfalls eine Kombination aus systemischer Applikation und lokaler Medikamentenfreisetzung.

Aus einem case-report kann entnommen werden, dass Hyperthermie als ein physikalischer Einflussfaktor bzw. Kombinationspartner die Strahlenwirkung bei der Anwendung der endovaskulären Brachytherapie verstärken kann <sup>[136]</sup>. So konnte externe Ultraschall-Hyperthermie erfolgreich bei einem Patienten mit restensierter vena cephalica nach PTA und endovaskulärer Bestrahlung mittels <sup>192</sup>Iridium (12Gy, Hoch-Dosisleistung afterloading) angewandt werden.

Eine tierexperimentelle Bestätigung für den erfolgreichen Einsatz eines radiosensibilisierenden Medikaments im Rahmen einer Bestrahlung nach Gefäßverletzung liefern Fortunato et al. <sup>[137]</sup>, die mittels Gen-Therapie bei Hasen ein Enzym (Cytosin-Desaminase) in die Arteria carotis communis einbrachten, welches ein danach (1h vor bis 4 h nach Bestrahlung) appliziertes nicht-toxisches Agens (5-Fluorocytosin) in ein radiosensibilisierendes Medikament (5-Fluorouracil) umwandelt. Es ergaben sich bezüglich der SMC-Proliferation deutliche Vorteile einer Kombinationsbehandlung verglichen mit den Ergebnissen, die eine alleinige Bestrahlung (5Gy, externe Applikation) erbrachte.

#### 4.3.3. Überlegungen zur Bedeutung von MFS als Radiosensitizer

Frühere Untersuchungen <sup>[50]</sup> sowie die Ergebnisse der aktuellen Experimente dieser Arbeit ergeben, dass Meclofenaminsäure konzentrationsabhängig einen G<sub>2</sub>/M-Phasen-Block in den entsprechend behandelten Zellen hervorruft. Eine Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, die besonders radiosensitiv ist, macht MFS zu einem interessanten Agens bezüglich der Untersuchung auf Radiosensitivität (s. a. 4.3.1.). Des Weiteren ist MFS als ein anti-inflammatorisches Medikament bekannt, das in den Arachidonsäurestoffwechsel eingreift und unter anderem

als Cyclooxygenase-Inhibitor (mit COX-II Präferenz) und Leukotrien-Antagonist ein sehr potenter Inhibitor des Prostaglandin- und Leukotriensyntheseweges ist (s.a. 4.1.4.2.).

Einige Untersuchungen jüngerer Datums decken die Eigenschaft selektiver COX-II Inhibitoren in vitro und in vivo auf, den Strahleneffekt auf Tumorzellen zu verstärken <sup>[138-141]</sup>. Die beiden am besten auf Strahlenempfindlichkeitserhöhung untersuchten COX-II Inhibitoren sind SC-236 und NS-398 und für eine Reihe anderer COX-II Inhibitoren wie Sulindac, Indomethacin und Ibuprofen sind selbst proliferationshemmende Wirkungen auf Tumorzellen beschrieben. Die Mechanismen, die dazu führen, dass diese Medikamente die Strahleneffekte verstärken, sind noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Raju et al. <sup>[138]</sup> untersuchten eine Fibrosarcomzelllinie in vitro und verwendeten SC-236-Konzentrationen von 10µM und 50µM. Koloniebildungs-Assays ergaben daraufhin eine signifikant erhöhte Tumor-Zell-Strahlensensitivität (Steigerung um den Faktor 1.5). Sie beobachteten dabei, dass der verwendete COX-II Inhibitor, obwohl er selbst Apoptose induziert (bzw. PGE<sub>2</sub> als COX-II Produkt den Zelltod durch Apoptose hemmt), keinen Einfluss auf eine eventuelle strahleninduzierte Apoptose besitzt. Es konnte ferner ein G<sub>2</sub>/M-Phasenblock nachgewiesen werden und ein Anstieg der für die Passage der checkpoints am G<sub>2</sub>/M-Übergang notwendigen Cykline A und B. Ein weiterer Erklärungsversuch kann darin bestehen, dass (erwartungsgemäß) auch das zelluläre Level an PGE<sub>2</sub> sank. Da PGE<sub>2</sub> sowie andere PG auch als Radioprotektiva fungieren können, kann auch über diesen Weg die erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Zellen erklärt werden.

Andere in vitro Untersuchungen <sup>[139]</sup> ergaben, dass der Sensitizing-Effekt von Ibuprofen unter aziden Bedingungen ansteigt (möglicherweise aufgrund der besseren Löslichkeit wegen des geringen pKa-Wertes von Ibuprofen). Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund interessant, dass für die SMCs in der Gefäßwand nach PTA ebenfalls ein saures Milieu angenommen werden muss. Zum einen infolge der bei der Intervention durch Kompression auftretenden Hypoxie und ferner später im Rahmen der entzündlichen Reaktion.

In vivo Versuche mit SC-236 an Hinterbein-Sarkomen von Mäusen ergaben, dass der COX-Inhibitor (Dosis:  $6 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ) den TCD<sub>50</sub>-Wert (Bestrahlungsdosis, die 50% Heilungsrate bewirkt) von 39,2Gy auf 20,9Gy senkt, was also einem Sensitizing- bzw Verstärkungs-Faktor von 1,87 entspricht <sup>[141]</sup>. Dies deckt sich gut mit den Sensitizing-Werten von NS-398 auf COX-II-exprimierende Tumorzellen, die (konzentrationsabhängig von 150 $\mu\text{M}$ -400 $\mu\text{M}$ ) zwischen 1,2 und 1,9 bzw. 1,8 liegen <sup>[140]</sup>. Neben der bereits beschriebenen Abnahme des PGE<sub>2</sub>-Levels und dem fehlenden Effekt von SC-236 auf strahleninduzierte Apoptose entdeckten Kishi et al. <sup>[141]</sup> als wahrscheinlichen Teilmechanismus für die radiosensibilisierenden Eigenschaften des Medikaments die hemmende Wirkung des COX-Inhibitors auf die Neoangiogenese. Bemerkenswerterweise wird für die Reduktion der Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie nach endovaskulärer Bestrahlung außer einem antiproliferativen Effekt auch ein anti-angiogenetischer Mechanismus diskutiert <sup>[117]</sup>, was ebenfalls Anlass zur Erforschung von NSAID-Effekten in Kombination mit ionisierender Strahlung auf die vaskuläre Restenose in vivo geben könnte.

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass sicherlich deutliche Unterschiede zwischen malignen Prozessen und neointimalen Hyperplasien existieren (das gleiche gilt für proliferierende glatte Muskelzellen und Kulturen von Karzinom-Zelllinien). Allerdings teilen sich diese Phänomene auch essentielle Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer molekularen Signalwege, ihrer Entstehung und Progression <sup>[142, 143]</sup>.

Im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung ist Meclofenaminsäure aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung untersucht worden. Experimente an Affen, deren Speiseröhre und Blase mit 20Gy bestrahlt worden waren, ergaben eine effektive Reduzierung bzw. Prävention der strahleninduzierten Zystitis bzw. Oesophagitis unter oraler MFS-Gabe ( $5\text{-}20 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ) <sup>[144]</sup>.

In einer kleinen klinischen Studie, in der lediglich 25 Patienten eingeschlossen waren, wurde ein potentiell radioprotektiver Effekt nach einer oralen Verabreichung von MFS auf Rektum, Blase und Ösophagus untersucht <sup>[145]</sup>. Die initialen Nebenwirkungen der Bestrahlung haben dabei unter MFS-Gabe zugenommen (und möglicherweise mit typischen Nebenwirkungen von MFS

wie Nausea interferiert). 12 Monate nach Bestrahlung gaben die mit MFS behandelten Patienten allerdings mehrheitlich weniger Nebenwirkungen bezüglich des Gastrointestinaltraktes und der Harnblase an.

Tierversuche an UV-bestrahlten Nacktmäusen ergaben 10 Monate nach Bestrahlungsbeginn und oraler MFS-Behandlung eine um ein Drittel geringere Tumorzahl in den MFS-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle <sup>[146]</sup>.

Den inhibitorischen Effekt auf Tumor-bildung und Wachstum führen Ambrus et al. auf folgende Ursachen zurück: Verminderte lokale Immunsuppression (durch Inhibition des strahleninduzierten PGE<sub>2</sub> in der Haut und anderer immunsuppressiver Agentien), auf Verminderung der Entzündungsreaktion (durch Inhibition der Leukotrien und Prostaglandin Synthese und ihrem „tumor-promotor –Effekt“) oder auf Kombination der beiden.

Ob man aufgrund dieser Beobachtungen sogar von radio-protectiven Effekten von MFS <sup>[145]</sup> ausgehen kann, ist nicht bewiesen. Die Verminderung der Nebenwirkungen akuter Strahlenbelastung ist sehr wahrscheinlich auf die entzündungshemmenden Eigenschaften von MFS und nicht auf aktiven Zellschutz zurückzuführen. Die Erklärungsversuche zur hemmenden Wirkung auf die strahleninduzierte Tumorbildung (bzw. das –wachstum <sup>[146]</sup>) decken sich ebenfalls mit den Erkenntnissen bezüglich der MFS-Wirkung auf strahleninduzierte Tumorschäden <sup>[138]</sup>.

Bei der allgemeinen Beschreibung des *quantitativen* Effekts einer Kombinationsbehandlung mit Strahlen und zytostatischen bzw. proliferationsinhibierenden Substanzen können antagonistische, subadditive, additive und überadditive Kombinationswirkungen voneinander abgegrenzt werden. Dazu werden Dosis-Effekt-Kurven der beiden Modalitäten (i.e. Dosis-Effekt-Kurve der Strahlenwirkung und Konzentrations-Effekt-Kurve des Proliferationshemmers) separat erstellt und mit dem Effekt der Kombinationsbehandlung verglichen <sup>[134]</sup>.

Für die Kombinationsbehandlungen sind an den entsprechenden Untersuchungstagen die Sensitizing-Effekte der einzelnen Versuchsbedingungen untersucht worden.

Teilweise ändert sich der Sensitizing-Effekt über den Beobachtungszeitraum hinweg. Neben mechanistischen Gründen könnten dieser Beobachtung auch prozedurale Faktoren zugrunde liegen. So ist die entsprechende Strahlendosis innerhalb der ersten vier Tage des 20-tägigen Beobachtungszeitraumes appliziert worden, wohingegen die MFS-Behandlung von Tag 0 bis Tag 20 durchgängig und konstant gewesen ist. Allein bei den Versuchen an Tag 4 (und somit bei allen Migrationsversuchen) ist die Bestrahlungsdauer sowie der Expositionszeitraum für MFS gleich. Es ist davon auszugehen, dass andere simulierte Therapiemodi wie MFS-Gabe in variablen Intervallen vor Bestrahlung oder kontinuierliche MFS-Applikation unter fraktionierter Bestrahlung auch andere Kombinationseffekte ergeben.

Wir haben den von uns eingeführten Sensitizing-Faktor so gewählt, dass er den Wert 0 annimmt, wenn ein rein additiver Effekt in der Kombinationsbehandlung vorgelegen hat. Somit lassen sich sub-additive Effekte als Minus-Werte und synergistische Ergebnisse übersichtlich als positiv-Werte darstellen. In der Literatur wird ein rein additiver Effekt häufig als 1 definiert. Der Faktor 1,5, der nach unserer Definition den Wert 0,5 annimmt, würde dann bedeuten, dass die kombinierte Radio-Chemotherapie zum Beispiel die Zellzahlen der Bestrahlungsgruppe in der Proliferationskinetik auf die Hälfte des Wertes senkt, der sich rein rechnerisch aus einer strengen Addition der prozentualen Zellzahlminderungen der MFS- und der Bestrahlungseinzelbehandlung ergeben würde.

Eine weitere, verbreitete Möglichkeit den Sensibilisierungseffekt zu beschreiben ist die Einführung des „enhancement factors“, der sich anbietet, wenn man Studien mit vielen unterschiedlichen, fein abgestuften Strahlungsdosen durchgeführt hat und der hemmende Effekt der Chemo-Einzel-therapie nicht berücksichtigt wird. Der enhancemet factor ist dabei der Quotient aus der Dosis der Einzelbestrahlung und der erforderlichen Dosis unter Kombinationsbehandlung, die den gleichen Effekt (zum Beispiel auf das Tumorwachstum) erzielen <sup>[141]</sup>.

Die Ergebnisse der Proliferationskinetik machen deutlich, dass der Kombinationseffekt umso größer ist je kleiner die Dosis gewählt wurde bzw.

dass mit steigender Dosis der Strahleneffekt dominiert. Sinn einer Kombination ist es bekanntlich, die Strahlendosis möglichst gering zu wählen bzw. durch die geeignete Wahl eines medikamentösen (oder physikalischen) Kombinationspartners die Dosis- bzw. Medikamentenmengen so abgleichen und wählen zu können, dass jede (Menge) für sich bei einem Minimum an Nebenwirkungen ein Maximum an therapeutisch wünschenswerter Effektivität zeigt. Durch die Anreicherung des Nährmediums mit 100 $\mu$ M MFS werden damit Zellzahlen gegen Ende der Kinetik der 2Gy Gruppe erreicht, die denen einer Strahlungseinzelbehandlung entsprechen, welche zwischen 4Gy und 8Gy liegt.

## 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit kann anhand von in-vitro Experimenten gezeigt werden, dass das Agens Meclofenaminsäure und die ionisierende Strahlung des Radionuklids  $^{90}\text{Yttrium}$  das Wachstums- und Migrationsverhalten von humanen aortalen glatten Muskelzellen konzentrations- und dosisabhängig inhibiert und dass deren Kombination Möglichkeiten bieten könnte in entsprechenden Verhältnissen ein optimales Wirkungsprofil bei minimierten Nebenwirkungen zu erstellen. Sich anschließende in-vivo Versuche werden zeigen, ob sich diese Komponenten oder deren Kombination zur Restenoseprävention einsetzen lassen können. Momentan ist die Anwendung radioaktiver Strahlung zur Restenoseprophylaxe in der experimentellen Phase und könnte InStent-Restenosen vorbehalten werden. Die erfolgreich erprobte Anwendung lokaler Medikamentenapplikationen könnte bei allen de-novo-Läsionen eingesetzt werden. Abgesehen von der Begleitmedikation existiert noch keine wirksame und anerkannte Kombinationstherapie.

Es ist wichtig anzumerken, dass die direkte Übertragbarkeit quantitativer Aspekte dieser in-vitro Arbeit in in-vivo-, d.h. klinische Bedingungen mit Vorbehalten zu sehen ist. Jedoch illustrieren die Experimente im Rahmen des vorliegenden Modells zumindest qualitativ die Konsequenzen einer strahlungs- und/oder medikamenten-induzierten Inhibition von glatten aortalen Muskelzellen, deren gesteigerte reproduktive, synthetisierende und migratorische Aktivität eine essentielle Funktion im Zusammenspiel der komplexen Abläufe einnimmt, welche die Ausbildung einer rezidivstenotischen Läsion nach katheter-interventioneller oder chirurgischer Gefäßrekanalisation bewirken. Somit mag ein gewonnenes besseres Verständnis von den Grundlagen der Komponenten der biologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge dieses Prozesses und seiner Beeinflussbarkeit dazu beitragen sich anschließenden Fragestellungen gezielter widmen zu können und Tierexperimente sowie klinische Studien zu Therapieevaluationen detaillierter und kontrollierter (und damit sicherer, effizienter und wirtschaftlicher) planen zu können.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ausbildung vaskulärer Rezidivstenosen stellt die „Achillesferse“ katheterinterventioneller rekanalisierender Therapien dar. Es existiert heute noch keine definitive Prophylaxe der sog. Restenose, obwohl der Einsatz der intravaskulären Brachytherapie und erste Erfahrungen mit medikamenten-eluierenden Stents ermutigende Ergebnisse zeigen. In der vorliegenden Dissertation soll die Wirkung des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Meclofenaminsäure, des  $\beta$ -Emitters  $^{90}\text{Yttrium}$  und deren Kombinationen auf humane aortale glatte Muskelzellen in vitro untersucht werden, welche eine Schlüsselstellung in der Entwicklung und Progression der Restenose einnehmen.

Die Effekte des Medikaments und des Radionuklides auf die glatten Muskelzellen werden anhand von Proliferationskinetiken, Migrations-Assays, Zellzyklusanalysen, Koloniebildungs-Assays und Immunfluoreszenz- bzw. Phasenkontrastmikroskopien evaluiert.

Meclofenaminsäure ( $0\mu\text{M}$  bis  $200\mu\text{M}$ ) und  $^{90}\text{Yttrium}$  (untersuchter Dosisbereich:  $0\text{-}8\text{Gy}$ ) hemmen konzentrationsabhängig die Zellvermehrung in der Proliferationskinetik, die klonogene Aktivität und die Migration durch eine Porenmembran. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen können bei beiden Agentien einen  $G_2/M$ -Phasenblock nachweisen. Bei Dosen bis  $8\text{Gy}$  lassen sich Erholungseffekte feststellen, der Einsatz einer Dauerbehandlung mit  $200\mu\text{M}$  MFS hemmt das Wachstum der Zellen gänzlich. Morphologisch erscheinen maximal bestrahlte Zellen verbreitert und zerfranst. Die Kombinationseffekte stellen sich mitunter für niedrigere Strahlendosen ( $2\text{Gy}$ ) und mittlere Meclofenaminsäure-Konzentrationen ( $50\text{-}100\mu\text{M}$ ) synergistisch dar. Zur systemischen Einzeltherapie scheint MFS wegen der benötigten Konzentrationen und der zu erwartenden Nebenwirkungen ungeeignet; der zu erprobende Einsatz im Rahmen lokaler Medikamentenapplikationen ist überdenkenswert. Die Schlussfolgerung, ob der Einsatz von  $^{90}\text{Yttrium}$ , der das Wachstum der glatten Muskelzellen in den ersten drei Wochen nach Bestrahlung sehr effektiv hemmt, bezüglich der Restenoseprophylaxe ebenfalls

günstige Langzeitergebnisse erwarten lässt, muss wegen der beobachteten Erholungseffekte weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

Die im Modell simulierte Kombinationstherapie aus Bestrahlung und proliferationsinhibierendem Medikament stellt eine interessante Therapieoption dar, die eine Optimierung der therapeutisch wünschenswerten Wirkungen bei Minimierung der Nebenwirkungen zulassen könnte.

# TABELLENANHANG

## PK mit MFS (10µM-50µM)

		Kontrolle	10µM	25µM	50µM
d0	Ansatz I	52.800	52.800	52.800	52.800
	Ansatz II	64.800	64.800	64.800	64.800
	Ansatz III	64.000	64.000	64.000	64.000
d4	Ansatz I	568.800	592.200	561.600	504.000
	Ansatz II	519.000	456.000	486.000	411.000
	Ansatz III	566.400	552.600	523.800	450.000
d8	Ansatz I	1.177.200	903.000	871.200	798.600
	Ansatz II	1.051.200	945.000	934.200	741.000
	Ansatz III	1.011.600	1.002.000	833.400	695.400
d12	Ansatz I	1.272.600	1.119.000	1.023.000	919.200
	Ansatz II	1.197.000	1.056.000	1.057.800	1.007.400
	Ansatz III	1.099.000	1.122.800	922.600	891.800
d16	Ansatz I	1.353.100	1.302.000	1.067.500	991.200
	Ansatz II	1.309.000	1.305.500	1.166.900	1.009.400
	Ansatz III	1.225.700	1.216.600	1.067.500	1.018.500
d20	Ansatz I	1.413.300	1.389.500	1.321.200	1.161.000
	Ansatz II	1.243.200	1.361.500	1.334.200	1.106.000
	Ansatz III	1.318.800	1.387.400	1.137.500	945.000

## Proliferationskinetik mit 2Gy und MFS

		Kontrolle	2Gy	2Gy, 50µM	2Gy, 100µM	2Gy, 200µM
d0	Ansatz I	41.068	41.068	41.068	41.068	41.068
	Ansatz II	42.132	42.132	42.132	42.132	42.132
	Ansatz III	45.600	45.600	45.600	45.600	45.600
d4	Ansatz I	413.000	73.600	74.668	69.067	29.200
	Ansatz II	357.665	79.468	78.933	66.867	31.200
	Ansatz III	372.665	58.400	68.066	62.333	31.600
d8	Ansatz I	683.200	220.800	140.267	85.333	25.867
	Ansatz II	794.132	185.333	99.733	91.733	26.400
	Ansatz III	778.335	206.933	159.467	142.800	24.800

d12	Ansatz I	958.531	470.333	253.200	123.000	28.532
	Ansatz II	984.798	463.202	267.335	112.665	32.000
	Ansatz III	921.200	520.000	277.000		30.400
d16	Ansatz I	982.200	829.335		145.000	26.400
	Ansatz II	1.082.000	794.335	475.000	130.433	31.200
	Ansatz III	1.045.000	855.000	492.000	149.333	31.600
d20	Ansatz I	1.062.133	1.060.500		172.665	30.400
	Ansatz II	1.120.000	1.026.100	745.000	187.667	28.800
	Ansatz III	1.025.969		799.367	182.335	26.400

### Proliferationskinetik mit MFS (100µM, 200µM), 4Gy und Kombinationen

		Kontrolle	100µM	200µM	4Gy 0µM	4Gy 50µM	4Gy 100µM	4Gy 200µM
d0	Ansatz I	90.133	90.133	90.133	90.133	90.133	90.133	90.133
	Ansatz II	53.867	53.867	53.867	53.867	53.867	53.867	53.867
	Ansatz III	51.200	51.200	51.200	51.200	51.200	51.200	51.200
d4	Ansatz I	884.532	496.800	50.133	118.933		106.668	44.533
	Ansatz II	816.400	494.333	59.466	169.667	158.400	159.200	47.200
	Ansatz III	584.800	383.000	34.400	124.433	131.200	78.930	36.532
d8	Ansatz I	1.588.000	944.176	60.266	199.433	215.400	188.533	46.667
	Ansatz II	1.495.200	843.333	45.333	209.000	186.000	164.000	33.800
	Ansatz III	1.333.200	710.667	56.433	142.000	124.555	155.344	38.667
d12	Ansatz I	1.824.000	1.318.333	43.200		258.123	250.133	35.622
	Ansatz II	1.709.328	1.021.133	49.332	271.200	224.500	249.668	45.600
	Ansatz III	1.668.531	1.110.269	55.465	218.335	192.000	128.665	49.566
d16	Ansatz I	1.848.400	1.299.740	53.867	375.655	302.467	286.500	49.528
	Ansatz II	1.708.467	1.156.667	49.600	327.467	288.000	267.733	35.200
	Ansatz III	1.736.454		33.216	302.333	256.733	210.667	
d20	Ansatz I	1.914.269	1.427.000	40.268	427.163	398.648	272.500	46.566
	Ansatz II	1.689.800	1.179.335	45.332	406.666	304.255	267.665	37.068
	Ansatz III	1.864.555	1.266.775	53.455	385.622	333.455	234.333	40.566



d20	32	26	41	22	25	33	19	24	33	17	25	16
	28	24	35	28	24	38	24	22	38	16	15	19
	25	23	34	18	24	34	16	20	39	21	14	22
	33	28	46	31	24	29	18	24	32	18	18	14
	23	17	41	31	23	32	23	18	35	20	25	20
	22	23	35	23	25	28	20	24	29	23	21	15

### Kobis mit 2Gy und MFS

d4	Ko			2Gy			2Gy,50µM			2Gy,100µM			2Gy,200µM		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	64	75	70	11	15	18	8	1	10	6	10	1	0	1	0
	67	56	61	24	14	17	8	10	12	4	7	9	0	1	0
	76	61	64	19	15	14	7	10	6	4	2	4	0	1	0
	68	68	61	16	17	9	7	13	11	4	5	3	0	0	0
	63	65	63	15	16	15	12	12	6	2	3	6	0	0	0
	70	54	54	16	13	12	11	12	12	3	1	6	0	0	0
d12	50	45	40	41	55	36	23	25		3	3	0	0	0	0
	52	52	51	40	52	34	26	24		4	3	3	0	0	0
	45	49	56	38	41	31	27	19		4	5	3	0	0	0
	51	51	50	45	44	30	24	25		0	2	3	0	0	0
	49	51	47	41	44	26	22	22		4	6	7	0	0	0
	55	49	49	44	48	36	25	15		3	1	1	0	0	0
d20	42	50	40	51	50	45	38	36	34	6	7	5	0	0	0
	46	42	55	48	55	63	34	31	25	3	5	4	0	0	0
	49	44	52	45	59	58	39	36	33	11	10	8	0	0	0
	48	40	51	49	59	49	44	31	27	5	10	11	0	0	0
	43	43	44	55	54	52	36	42	31	9	12	6	0	0	0
	43	40	56	53	53	42	38	40	37	8	12	4	0	0	0

### Kobis mit MFS (100µM, 200µM), 4Gy und Kombinationen

d4	Ko			100µM			200µM			4Gy			4Gy,50µM			4Gy,100µM			4Gy,200µM			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
	87	59	66	71	55	68	0	0	0	3	3	4	0	5		1	0	0	0	0	0	
	79	73	64	73	61	66	0	0	0	1	3	3	0	4		2	0	0	0	0	0	
	104	61	66	66	52	59	0	0	0	1	3	2	0	0		1	2	1	0	0	0	
	78	66	72	62	64	64	0	0	0	1	2	2	0	1		1	1	0	0	0	0	
	77	62	77	64	58	67	0	0	0	0	5	5	1	2		0	2	0	0	0	0	
	85	73	68	66	52	62	0	0	0	1	5	4	1	3		0	0	0	0	0	0	
d12	57	46	77	26	31	32	0	0	0	11	15	11	5	10	6	3	0	0	0	0	0	
	51	51	61	25	31	32	0	0	0	18	13	18	6	6	3	1	0	0	0	0	0	
	53	50	59	25	29	26	0	0	0	18	15	16	5	10	4	4	0	0	0	0	0	
	50	46	57	26	30	19	0	0	0	14	16	14	11	8	4	1	0	0	0	0	0	
	46	49	66	31	30	28	0	0	0	13	14	17	4	6	11	2	0	0	0	0	0	
	60	50	57	21	32	25	0	0	0	13	16	20	6	10	11	0	0	0	0	0	0	



**FACS mit MFS-Einzelbehandlung**

G2/M		Ko I	10µM	25µM	50Gy	Ko II	100µM	200µM
d4	I	11,79	10,51	12,76	10,3	8,15	9,6	44,34
	II	11,66	11,59	10,07	12,68	11,77	9,83	38,14
	III	11,42	9,9	12,01	12,58	8,49	9,06	33,85
d12	I	13,16	14,45	13,49	13,36	9,97	12	36,15
	II	14,92	14,24	14,85	13,66	13	15,13	29,86
	III	12,05	12,52	12,49	13,33	10,56	10,79	27,65
d20	I	17,25	17,53	15,73	16,72	12,96	13,93	33,63
	II	15,6	16,92	16,48	16,8	10,65	15,44	31,51
	III					10,71	15,17	30,67

G1		Ko I	10µM	25µM	50Gy	Ko II	100µM	200µM
d4	I	74,74	73,09	71,22	75,41	89,92	87,29	46,87
	II	72,26	69,3	71,4	67,5	80,23	83,41	56,65
	III	77,57	77,16	73,62	69,56	81,7	83,91	62,12
d12	I	81,73	80,92	82,02	82,44	88,49	86,07	55,94
	II	79,96	80,07	80,83	81,25	84,8	83,96	61,58
	III	83,3	83,83	83,82	83,03	88,13	88,28	65,46
d20	I	73,86	75,13	77,49	76,77	84,87	85,14	59,31
	II	76,8	75,72	75,1	76,57	86,96	83,04	62,5
	III					87,76	83,77	64,93

S		Ko I	10µM	25µM	50Gy	Ko II	100µM	200µM
d4	I	12,62	14,34	15,59	13,37	1,48	2,61	0,51
	II	15,58	18,75	18,05	19,02	7,14	5,82	2,34
	III	10,29	12,42	13,77	16,3	9,57	6,55	2,12
d12	I	1,16	2,03	1,88	1,56	0,51	0,23	0,68
	II	1,48	2,26	1,68	2,01	0,25	0,51	4,56
	III	1,15	1,31	1,43	0,99	0,75	0,34	2,48
d20	I	0,83	1,14	1,02	0,73	0,26	0,22	0,68
	II	1,35	1,28	1,37	1,26	0,54	0,31	3,91
	III					0,4	0,15	0,93



### FACS mit Kombinationsbehandlungen

G2/ M		Ko	4Gy	4Gy, 50µM	4Gy, 100µM	4Gy, 200µM	8Gy	8Gy, 50µM	8Gy, 100µM	8Gy, 200µM
d4	I	8,15	8,15	14,7	14,28	40,75	21,99	23,03	16,8	32,26
	II	11,77	14,93	16,66	16,01	29,62	15,64	19,86	19,7	34,61
	III	8,49	10,28	12,69	13,22	34,17	13,91	15,19	13,73	34,18
d12	I	9,97	14,87	15,17	16,6	23,37	21,29	22,99	20,29	23,87
	II	13	18,69	18,25	17,66	30,56	18,96	18,38	18,47	26,77
	III	10,56	15,48	18,48	15,86	31,15	25,96	21,86	27,77	28,68
d20	I	12,96	15,97	19,15	18,54	23,59	26,54	25,48	22,48	21,02
	II	10,65	14,82	15,01	18,22	32,02	19,47	19,78	15,69	24,88
	III	10,71	22,2		17,98	30,35	27		19,55	32,1
G1		Ko	4Gy	4Gy, 50µM	4Gy, 100µM	4Gy, 200µM	8Gy	8Gy, 50µM	8Gy, 100µM	8Gy, 200µM
d4	I	89,92	89,89	83,48	84,01	48,7	74,67	74,76	78	63,39
	II	80,23	83,16	80,97	81,45	63,05	82,01	77,73	77,15	51,35
	III	81,7	87,26	84,34	83,3	61,8	83,12	81,54	83,13	60,82
d12	I	88,49	75,64	77,4	80,21	63,06	74,28	73,18	74,91	68,13
	II	84,8	76,01	75,33	78,53	62,98	76,98	78,54	78,04	66,05
	III	88,13	79,04	78,57	81,74	61,46	72,02	74	67,87	70,12
d20	I	84,87	79,66	76,24	78,04	74,06	70,13	71,06	72,71	75,96
	II	86,96	81,86	81,73	78,42	61,52	74,82	74,84	80,09	69,81
	III	87,76	75,2		80,2	66,6	71,11		75,02	65,12
S		Ko	4Gy	4Gy, 50µM	4Gy, 100µM	4Gy, 200µM	8Gy	8Gy, 50µM	8Gy, 100µM	8Gy, 200µM
d4	I	1,48	1,48	0,47	0,36	0,64	0,27	0,42	0,63	0,55
	II	7,14	1,01	0,98	1,17	5,15	0,93	1,07	0,96	0,81
	III	9,57	1,86	1,82	2,4	2,62	2,14	2,59	2,51	2,5
d12	I	0,51	7,04	4,4	1,51	5,5	1,34	0,62	0,63	1,04
	II	0,25	3,98	3,87	2,04	2,14	2,31	2,25	1,64	2,05
	III	0,75	3,72	1,91	1,89	1,79	1,95	1,67	2,22	0,88
d20	I	0,26	2,49	3,14	2,76	0,87	0,63	0,79	1,17	0,88
	II	0,54	2,72	2,56	1,78	4,78	1,9	2,45	2	2,78
	III	0,4	2,55		1,55	2,94	1,65		1,88	1,46

**Migrationen**

mit PDGF	Ko	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M	2Gy	4Gy	8Gy	2Gy,200 $\mu$ M	4Gy,200 $\mu$ M	8Gy,200 $\mu$ M
I	144	108	68	98	70	38	34	16	12
I	150	114	74	116	56	20	30	22	10
II	102	94	52	94	34	32	24	12	16
II	114	106	64	76	40	22	28	4	8
III	96	79	42	84	44	26	18	12	4
III	105	86	34	80	30	27	22	18	8

ohne PDGF	Ko	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M	2Gy	4Gy	8Gy	2Gy,200 $\mu$ M	4Gy,200 $\mu$ M	8Gy,200 $\mu$ M
I	68	58	40	44	36	10	12	6	4
I	78	46	16	58	28	12	28	2	2
II	52	50	24	50	34	6	20	2	0
II	54	38	34	46	41	20	10	4	12
III	44	42	12	32	29	8	14	2	6
III	65	59	14	38	34	14	10	6	4

# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Topol E.J. (1998)  
Coronary –artery stents: gauging, gorging, gouging.  
N Engl J Med 339:1702-1704
- [2] Dotter C.T., Judkins M.P. (1964)  
Transluminal Treatment of arteriosclerotic obstruction : Description of a new  
technique and preliminary report of its application.  
Circ. 30: 654-670
- [3] Liu M. W., Roubin G.S., King III S.B. (1989)  
Restenosis After Coronary Angioplasty – Potential Biologic Determinants and  
Role of Intimal Hyperplasia.  
Circ. 79: 1374-1387
- [4] Dangas G., Fuster V. (1996)  
Management of restenosis after coronary intervention.  
Am Heart J. 132: 428 – 436
- [5] Bauters Ch., Isner J. M. (1997)  
The Biology of Restenosis.  
Progr in Cardiovasc Dis.: 40: 107-116
- [6] Weintraub W.S. (1996)  
Evaluating the cost of therapy for restenosis: considerations for brachytherapy.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 36: 949-958
- [7] Topol E.J., Ellis S.G. Cosgrove D.M., Bates E.R., Muller D.W., Schork  
N.J., Schork M.A., Loop F.D. (1993)  
Analysis of coronary angioplasty practice in the United States with an  
insurance-claims data base.  
Circ. 87(5): 1489-1497
- [8] Califf R.M. (1995)  
Restenosis: The cost to society  
Am Heart J 130: 680-684
- [9] Kunz R.E., Baim D.S. (1993)  
Defining coronary Restenosis. Newer clinical and angiographic paradigms.  
Circ. 88: 1310-1323
- [10] Wainwright CL., Miller AM., Wadsworth RM (2001)  
Inflammation as a Key Event in the Development of Neointima Following  
Vascular Ballon Angioplasty.  
Clin and Exp Pharm and Physiol. 28: 891 – 895

- [11] Hehrlein C., Zimmermann M., Pill J., Metz J., Kübler W. von Hodenberg E (1994)  
The Role of elastic Recoil after Ballon Angioplasty of Rabbit Arteries and its Prevention by Stent Implantation.  
Eur Heart J. 15: 277-280
- [12] Casscells W. (1992)  
Migration of Smooth Muscle and Endothelial Cells. Critical Events in Restenosis.  
Circ. 86: 723-729
- [13] Libby P., Tanaka H. (1997)  
The Molecular Bases of Restenosis.  
Prog Cardiovasc Dis. 40: 97-106
- [14] Hanke H., Strohschneider T., Oberhoff M., Betz E., Karsch K. R. (1990)  
Time Course of Smooth Muscle Cell Proliferation in the Intima and Media of Arteries Following Experimental Angioplasty.  
Circ Res. 67: 651-659
- [15] Clowes A.W., Clowes M.M. (1985)  
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle growth by heparin.  
Lab Invest. 52: 611-616
- [16] R. Ross (1993)  
The Pathogenesis of Atherosclerosis: a perspective for the 1990s.  
Nature. 326: 801 – 809
- [17] Ohara T., Nanto S., Asada S., Komamura K., Wang D. (1988)  
Ultra-structural study of proliferating and migrating smooth muscle cells at the site of PTCA as an explanation for restenosis (abstract)  
Circ. 78:(suppl): II-290
- [18] Haudenschild C.C. Grunwald J. (1985)  
Proliferative Heterogeneity of vascular smooth muscle cells and its alteration by injury.  
Exp Cell Res 157: 364-370
- [19] Ferns G.A., Raines E.W., Sprugel K.H., Motani A.S., Reidy M.A., Ross R. (1991)  
Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.  
Science 235 (5024): 1129-1132

- [20] Pomerantz K.B., Hajjar D.P. (1989)  
Eicosanoids in regulation of arterial smooth muscle cell phenotype, proliferative capacity, and cholesterol metabolism.  
Arteriosclerosis 9: 413-429
- [21] Lindner V. (2001)  
Vascular repair processes mediated by transforming growth factor- $\beta$ .  
Zeitschrift für Kardiologie 90: (suppl. 3), III/17 – III/22
- [22] Schwartz R.S., Holmes D.R. Topol E.J. (1992)  
The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms.  
J Am Coll Cardiol 20: 1284-1293
- [23] Schoenhagen P., Ziada K. M., Vince G., Nissen S. E., Tuzcu M. (2001)  
Arterial Remodeling and Coronary Artery Disease: The Concept of „Dilated“ Versus „Obstructive“ Coronary Atherosclerosis.  
J Am Coll Cardiol. 38: 297 – 306
- [24] Mintz G.S., Popma J.J., Pichard A.D., Kent K.M., Satler L.F., Wong C., Hong M.K., Kowach J.A., Leon M.B., (1996)  
Arterial Remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study.  
Circ. 94(1): 35-43
- [25] Okamoto E., Couse T., Leon H. D., Vinter-Johansen J., Goodman R. B., Scott N. A., Wilcox J. N. (2001)  
Perivascular Inflammation After Ballon Angioplasty of Porcine Coronary Arteries.  
Circ. 104: 2228-2235
- [26] Waksman R., Rodriguez J.C., Robinson K.A. et al (1997)  
Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis and vascular remodeling after ballon overstretch injury of porcine coronary arteries.  
Circ. 96: 1944-1952
- [27] Serruys P.W., de Jaegere P., Kiemeneij F. Macaya C., Rutsch W., Heyndricks W., Emmanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P. (1994)  
A comparison of ballon-expandable stent implantation with ballon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study group.  
N Engl J Med. 331: 489-495
- [28] Belli G., Ellis S. G., Topol E. J. (1997)  
Stenting for Ischemic Heart Disease.  
Prog in Cardiovasc Dis. 40: 159-182

- [29] Moreno P. R., Palacios I. F., Leon M. N., Rhodes J., Fuster V., Fallon J. T. (1999)  
Histopathologic Comparison of Human Coronary In-Stent and Post-Ballon Angioplasty Restenotic Tissue.  
Am J of Card. 84: 462-466
- [30] J.L. Orford, A.P. Selwyn, P. Ganz, J.J. Popma, C. Rodgers (2000)  
The Comparative Pathobiology of Atherosclerosis and Restenosis.  
Am J Cardiol. 86 (suppl): 6H - 11H
- [31] Christen T., Verin V., Bochaton-Piallat M.-L., Popowski Y., Ramaekers F., Debryne P., Camenzind E., van Eys G., Gabbiani G. (2001)  
Mechanisms of Neointima Formation and Remodeling in the Porcine Coronary Artery.  
Circ. 103: 882-888
- [32] Hao H., Ropraz P., Verin V., Camenzind E., Geinoz A., Pepper M.S., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M.-L. (2002)  
Heterogeneity of Smooth Muscle Cell Populations Cultured From Pig Coronary Artery.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22:1093-1099
- [33] Baim D.S.S, Cutlip D.E., SK, Ho K.K., Fortuna R., Schreiber T.L., Feldman R.L., Shani J., Senerchia C., Zhang Y., Lansky A.J., Popma J.J. Kunz R.E. (1998)  
Final results of the ballon vs Optimal Atherectomy Trial (BOAT).  
Circ. 97: 322-331
- [34] Reifert N., Vandormael M., Krajcar M., Göhring S., Preuler W., Schwarz, F., Störger H., Hoffmann M., Klöpfer J., Müller S., Haase J. (1997)  
Randomized Comparison of angioplasty of complex coronary lesions at a single center. Excimer Laser, rotational atherectomy and ballon angioplasty comparison (ERBAC) study.  
Circ. 96: 91-98
- [35] Duda S.H., Wiskirchen J., Schöber W., Johst U., Betsch A., Feuls R., Tepe G., Claussen C.D. (2001)  
Potential Strategies to Reduce Arterial Restenosis.  
Cardiovasc Intervent Radiol. 24 (suppl1): S72-S75
- [36] Lefkovits J., Topol E.J. (1997)  
Pharmacological Approaches for the Prevention of Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention.  
Prog Cardiovasc Dis. 40(2): 141-158
- [37] Kagan S. A. , Myers S.I. (1998)  
Mediators of Restenosis  
Surgical Clinics of North America. 78(3): 481-500

- [38] Heckenkamp J., Gawenda M., Brunkwall J. (2002)  
Vascular Restenosis. Basic science and clinical implications.  
J Cardiovasc Surg. 43: 349-357
- [39] Baek S., March K.L. (1998)  
Gene therapy for Restenosis, getting nearer to the heart of the matter.  
Circ Res. 82: 295-305
- [40] Suzawa H., Kikuchi S., Arai N., Koda A. (1992)  
The mechanism involved in the inhibitory action of tranilast on collagen biosynthesis of keloid fibroblasts.  
Jpn J Pharmacol. 60:91-96
- [41] Miyazawa K., Kikuchi S., Fukuyama J., Hamano S., Ujje A. (1995)  
Inhibition of PDGF- and TGF-beta-1 induced collagen synthesis, migration and proliferation by tranilast in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.  
Atherosclerosis. 118: 213-221
- [42] Fukuyama J., Miyazawa K., Hamano S., Ujje A. (1996)  
Inhibitory effects of tranilast on proliferation, migration, and collagen synthesis of human collagen smooth muscle cells.  
Can J Physiol Pharmacol. 74: 80-84
- [43] Fukuyama J., Ichikawa K., Hamano S., Shibata N. (1996)  
Tranilast supresses the vascular intimal hyperplasia after ballon injury in rabbits fed on a high-cholesterol diet.  
Eur J Pharmacol. 318 :327-332
- [44] Miyazawa N., Umemura K., Kondo K., Nakashima M. (1997)  
Effects of pemirolast and tranilast on intimal thickening after arterial injury in the rat.  
J Cardiovasc Pharmacol. 30: 157-162
- [45] Ishiwata S., Verheye S., Keith A.R., Salame M.Y., de Leon H., King III S.B., Chronos N.A.F. (2000)  
Inhibition of Neointima Formation by Tranilast in Pig Coronary Arteries After Ballon Angioplasty and Stent Implantaion  
J Am Coll Cardiol. 35: 1331-1337
- [46] Tamai H., Katoh K., Suzuki S., Fujii K., Aizawa T, Takase S, Kurogane H., Nishikawa H., Sone T., Sakai K., Suzuki T. (1999)  
Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT)  
Am Heart J. 138: 968-975

- [47] Tamai H., Katoh K., Yamaguchi T., Hayakawa H., Kanmatsuse K., Haze K., Aizawa T., Nakanishi S., Suzuki S., Suzuki T., Takase S., Nishikawa H., Katoh O. (2002)  
The impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: The Second Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT II).  
*Am Heart J.* 143: 506-513
- [48] Holmes D.R., Savage M., LaBlanche J.-M., Grip L., Serruys P.W., Fitzgerald P., Fischman D., Goldberg S., Brinker J. A., Zeiher A.M., Shapiro M. L., Willerson J., Davis B.R., Ferguson J.J., Popma J., King, III S.B., Lincoff A. M., Tcheng J. E., Chan R., Granett J. R., Poland M. (2002)  
Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) Trial.  
*Circ.* 106 (10): 1243-1250
- [49] Conroy M.C., Randinitis E.J., Turner J.L. (1991)  
Pharmacology, Pharmacokinetics, and Therapeutic Use of Meclofenamate Sodium.  
*Clin J Pain.* 7(suppl. 1): 44-48
- [50] Schoeber W., Kehlbach R., Gebert R., Wiskirchen J., Rodegerdts E., Claussen C.D., Duda S.H. (2002)  
Meclofenamic acid for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation and migration – an in vitro study.  
*J Cardiovasc Intervent Radiol.* 25(1): 57-63
- [51] Streffer C. (1996)  
Biologische Grundlagen der Strahlentherapie.  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische Onkologie  
4. Aufl. Berlin – Heidelberg – New York , S. 110-111
- [52] Streffer C. (1996)  
Biochemische Grundlagen einschließlich der Reparatur von Strahlenschäden an der DNA.  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische Onkologie  
4. Aufl. Berlin – Heidelberg – New York , S. 111-114
- [53] Steffer C. (1996)  
Zellproliferation und Zellumsatz  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische Onkologie  
4. Aufl. Berlin – Heidelberg – New York , S. 116-121



- [54] Streffer C. (1996)  
Störungen der Zellvermehrung nach Bestrahlung.  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische  
Onkologie  
4. Aufl. Berlin – Heidelberg – New York , S. 124-127
- [55] Streffer C. (1996)  
Strahlenempfindlichkeit von Säugerzellen im Generationszyklus.  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische  
Onkologie  
4. Aufl. Berlin – Heidelberg – New York , S. 127-129
- [56] Streffer C. (1996)  
Modifizierung der Strahlenwirkung durch Substanzen.  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische  
Onkologie  
4. Aufl. Springer Berlin – Heidelberg – New York , S. 143-150
- [57] Hermann H.J. (1998)  
Physikalische Grundlagen – Radioaktiver Kernzerfall  
In: Nuklearmedizin  
4. Aufl. Urban&Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, S. 9-18
- [58] Hermann H.J. (1998)  
Dosimetrie, Strahlenbelastung, Strahlenrisiko, Strahlenschutz, Umgang mit  
radioaktivem Material am Arbeitsplatz  
In: Nuklearmedizin  
4. Aufl. Urban&Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, S. 103-112
- [59] Radiation Safety Manual  
[http://web.missouri.edu/~muehs/draft/newrsm2/rsm\\_appendices.htm](http://web.missouri.edu/~muehs/draft/newrsm2/rsm_appendices.htm)  
University of Missouri-Columbia  
Dept. for Environmental Health and Safety  
Radionuclide Data Sheets and Decay Tables
- [60] Macaya C., Serruys P. W. , Ruygrok P. (1996)  
Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: one year  
clinical follow up of BENESTENT trial. BENESTENT Study Group.  
J Am Coll Cardiol. 27: 255-261
- [61] Fischman D. L., Leon M. B., Baim D. S. (1994)  
A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty  
in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study  
Investigators.  
N Engl J Med. 31:673-681

- [62] Cross W. G., Ing H., Freedman N. (1983)  
A short atlas of  $\beta$ -ray spectra  
Phys Med Biol. 28 (11): 1251-1260
- [63] Freshney, R. I. (1990)  
Kulturbedingungen  
In: Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch,  
de Gruyter-Verlag, Berlin, NY, 133-34
- [64] Crissmann H. A., Mullaney P. F., Steinkamp J. A. (1975)  
Methods and applications of flow Systems for analysis and sorting of  
mammalian cells.  
In Prescott, D. M. (Hrsg.): Methods in cell biology,  
9. Auflage, Academic Press New York
- [65] Stabin M.G. (1996)  
MIRDOSE: personal computer software for internal dose assessment in nuclear  
medicine.  
J Nucl Med. 37: 538-546
- [66] Margin G. M., Ogburn C. E., (1976)  
Cell, tissue, and organoid cultures of blood vessels.  
In: Rothblat G., Cristofalo V. J. (Hrsg): Growth, Nutrition and Metabolism of  
Cells in Culture.  
Academic Press. (III): 1-56
- [67] Azuma H., Banno K., Yoshimura T. (1976)  
Pharmacological Properties of N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl)anthranilic acid (N-  
5'), a new anti-atopic agent.  
Br J Pharmacol. 58: 483-488
- [68] Ward M.R. Sasahara T., Agrotis A., Dilley R.J., Jennings G.L., Bobik A.  
(1998)  
Inhibitory effects of tranilast on expression of transforming growth  
factor-beta isoforms and receptors in injured arteries.  
Atherosclerosis. 137:267-275
- [69] Watanabe S., Matsuda A., Suzuki Y., Kondo K., Ikeda Y., Hashimoto H.,  
Umemura K. (2000)  
Inhibitory mechanism of tranilast in human coronary artery smooth muscle cells  
proliferation, due to blockade of PDGF-BB-receptors.  
Br J Pharmacol. 130: 307-14 (Abstr.)
- [70] Jin D., Takai S., Shiota N., Miyazaki M. (1998)  
Tranilast, an anti-allergic drug, possesses antagonistic potency to angiotensin  
II.  
Eur J Pharmacol. 361: 199-205 (Abstr.)

- [71] Suzawa H., Kikuchi S., Ichikawa K., Koda A. (1992)  
Inhibitory action of tranilast, an anti-allergic drug, on the release of cytokines and PGE<sub>2</sub> from human monocytes-macrophages.  
Jpn J Pharmacol. 60: 85-90 (Abstr.)
- [72] Nie L., Mogami H., Kanzaki M., Shibata H., Kojima I., (1996)  
Blockade of DNA synthesis induced by platelet-derived growth factor by tranilast, an inhibitor of calcium entry, in vascular smooth muscle cells.  
Mol Pharmacol. 50: 763-769 (Abstr.)
- [73] Takahashi A., Taniguchi T., Ishikawa Y., Yokoyama M. (1999)  
Tranilast inhibits vascular Smooth Muscle Cell Growth and Intimal Hyperplasia by Induction of p21<sup>waf1/cip1/sdi1</sup> and p53.  
Circ Res. 84: 543-550
- [74] Ward M.R., Agrotis A., Kanellakis P., Hall J., Jennings G., Bobik A. (2002)  
Tranilast Prevents Activation of Transforming Growth Factor- $\beta$  System, Leukocyte Accumulation, and Neointimal Growth in Porcine Coronary Arteries After Stenting.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22: 940-948
- [75] Koup J. R., Tucker E., Thomas D. J., Kinkel A.W., Sedman A. J. (1990)  
A single and multiple dose pharmacokinetic and metabolism study of meclofenamate sodium.  
Biopharmaceutics and drug disposition. 2 (1): 1-15
- [76] Sandow N., (Pharm.D)  
RxList-The internet drug Index  
Clinical Pharmacology  
<http://www.rxlist.com>  
[http://www.rxlist.com/cgi/generic3/meclofen\\_cp.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic3/meclofen_cp.htm)
- [77] Sandow N., (Pharm.D)  
RxList -The internet drug Index  
Side Effects and Drug Interactions  
<http://www.rxlist.com>  
[http://www.rxlist.com/cgi/generic3/meclofen\\_cp.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic3/meclofen_cp.htm)
- [78] Heldmann A. W., Brinker J.A. (2001)  
The Messenger and the Message: Preventing Restenosis.  
Catheterization and Cardiovascular Interventions. 53:569-570
- [79] Bailey S. R. (1997)  
Local drug Delivery: Current Applications.  
Progr in Cardiovasc Dis.; 40: 183-204

- [80] Tepe G., Duda S. H., Kalinowski M., Kamenz J., Brehme U., Hanke H., Claussen C. D., Bares R., Baumbach A., Dinkelborg L. M. (2001)  
Lokal Intra-Arterial Drug Delivery for Prevention of Restenosis – Comparison of the Efficiency of Delivery of Different Radiopharmaceuticals Through a Porous Catheter.  
Investigative Radiology. 36: 245 - 249
- [81] Camenzind E., Reys A., Lighart J. (1995)  
Local intracoronary delivery of heparin and of somatostatin analogue (Octreolide) following angioplasty in man: Evaluation of efficiency of delivery by radio-istopic technique.  
J Am Coll Cardiol. 25; 185A
- [82] Wienecke H., Sawitowski Th., Wnendt S., Fischer A., Dirsch O., Karoussos I. A., Erbel R. (2002)  
Stent Coating: A new Approach in Interventional cardiology  
Herz 27; 518-526
- [83] Nabapulle M. N., Eisenberg M. J. (2002)  
Coated Stents for the Prevention of Restenosis: Part I  
Circ. 106; 2734-2740
- [84] Nabapulle M. N., Eisenberg M. J. (2002)  
Coated Stents for the Prevention of Restenosis: Part II  
Circ. 106; 2859-2866
- [85] Müller R., Büllsfeld L., Gerckens U., Grube E. (2002)  
Aktueller Stand der Therapie der koronaren Herzkrankheit mit medikamentenbeschichteten Stents  
Herz 27:508-513
- [86] Carter A. J. (2002)  
Drug-Eluting Stents for the Prevention of Restenosis: Standing the Test of Time  
Catheterization and Cardiovascular Interventions. 57; 69-71
- [87] Laneuville O., Breuer D. K., DeWitt D. L. (1994)  
Differential Inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases –1 and –2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 271: 927-934
- [88] Ricketts A. P., Lundy K. M., Seibel S.B. (1998)  
Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 and 2 by carprofen and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs.  
American Journal of veterinary research. 59: 1441-1446
- [89] Rees M. C., Canete-Soler R., Bernal A. L., Turnbull A.C. (1988)  
Effects of fenamates on prostaglandin E receptor binding.  
Lancet. 2: 541-542

- [90] Stadler I., Kapui Z., Ambrus J. L. (1994)  
Study of the mechanisms of action of sodium meclofenamic acid (Meclomen) a  
“double inhibitor” of the arachidonic acid cascade.  
J Med. 25: 371-382
- [91] Boctor A. M., Eickholt M., Pugsley T. A. (1986)  
Meclofenamate sodium is an inhibitor of both the 5-lipoxygenase and  
cyclooxygenase pathways of the arachidonic acid cascade in vitro.  
Prostaglandins Leucotriens Med. 23 : 229-238
- [92] Brune K., Gühring H. (1999)  
Analgetika – Antiphlogistika - Antirheumatika  
In: Estler: Pharmakologie und Toxikologie  
Schattauer, 5. Aufl: 276-312
- [93] Cipollone F., Patrono C. (2002)  
Cyclooxygenase-2 Polymorphism. Putting a Brake on the Inflammatory  
Response to Vascular Injury?  
Atheroscler Thromb Vasc Biol. 22: 1516-1518
- [94] Bishop-Bailey D., Pepper J. R., Larkin S. W., Mitchell J. A. (1998)  
Differential Induction of Cyclooxygenase-2 in Human Arterial and Venous  
Smooth Muscle – Role of Endogenous Prostanoids.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18: 1655-1661
- [95] Conolly E., Bouchier-Hayes D. J., Kayne E., Leahy A., Fitzgerald D.,  
Belton O. (2002)  
Cyclooxygenase Isoenzyme Expression and Intimal Hyperplasia in a Rat Model  
of Ballon Angioplasty.  
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 300: 393 – 398
- [96] Papafili A., Hill M. R., Bull D.J., McAnulty R. J., Marshall R. P.,  
Humphries S. E., Laurent G. (2002)  
A common promotor variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression:  
evidence for a role in the acute phase inflammatory response.  
Atheroscler Thromb Vasc Biol. 22: 1631-1636
- [97] Pitt B., Pepine C., Willerson J. T. (2002)  
Cyclooxygenase-2 Inhibition and Cardiovascular Events  
Circ. 106: 167-169
- [98] Wiskirchen J., Dittmann H., Kehlbach R., Vogel-Claussen J., Gebert R.,  
Dohmen B. M., Schöber W., Bares W., Rodemann H. P., Claussen C. D., Duda  
S. H. (2001)  
Rhenium-188 for Inhibition of Human Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation.  
Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 49 (3): 809-815

- [99] Rosen E. M., Goldberg I. D., Myrick K. V., Levenson S. (1984)  
Radiation Survival Properties of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells  
Rad Res. 100:182-191
- [100] Fischer-Dzoga K., Dimitrievich G. S., Griem M. L. (1984)  
Radiosensitivity of Vascular Tissue.  
II. Differential Radiosensitivity of Aortic Cells *in Vitro*  
Rad Res. 99: 536-546
- [101] Gajdusek C. M., Tian H., London S., Zhou D., Rasey J., Mayberg M. R.  
(1996)  
Gamma Radiation Effect on Vascular Smooth Muscle Cells in Culture  
Int J Radiation Oncology Biol Phys. 36 (4): 821-828
- [102] Mayberg M. R., London S., Rasey J., Gajdusek C. (2000)  
Inhibition of Rat Smooth Muscle Proliferation by Radiation after Arterial Injury:  
Temporal Characteristics In Vivo and In Vitro.  
Radiat Res. 153: 153-163
- [103] Brenner D. J., Miller R. C., Hall E. J. (1996)  
The Radiobiology of Intravascular Irradiation  
Int J Radiation Oncology Biol. Phys. 36: 805-810
- [104] Brenner D. J., Miller R. C. (2001)  
Long-Term Efficacy of Intracoronary Irradiation in Inhibiting In-Stent Restenosis  
Circ. 103: 1330-1332
- [105] Fareh J., Martel R., Kermani P., Leclerc G. (1999)  
Cellular Effects of  $\beta$ -Particle Delivery on Vascular Smooth Muscle Cells and  
Endothelial Cells  
Circ. 99: 1477-1484
- [106] Terasima T., Tolmach L. J., (1961)  
Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle.  
Nature. 190: 1210-1211
- [107] Maity A., McKenna W. G., Muschel R. J. (1994)  
The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review.  
Radiotherapy and Oncology. 31: 1-13
- [108] Fukui R., Amakawa M., Hoshiga M., Shibata N., Kohbayashi E., Seto M.,  
Sasaki Y., Ueno T., Negoro N., Nakakoji T., Masaaki II, Nishiguchi F., Ishihara  
T., Ohsawa N. (2000)  
Increased migration in late G<sub>1</sub> phase in cultured smooth muscle cells.  
Am J Physiol Cell Physiol. 279: C999-C1007

- [109] Thorgeirsson G., Robertson A. L., Cowan D. H. (1979)  
Migration of Human Endothelial and Smooth Muscle Cells.  
Lab Invest. 41(1): 51-62
- [110] Gotlieb A.I., Spector W. (1981)  
Migration Into an In Vitro Experimental Wound.  
A Comparison of Porcine Aortic Endothelial and Smooth Muscle Cells and the  
Effect of Culture Irradiation.  
Am J Pathol. 103: 271-282
- [111] Fischer-Dzoga K., Dimitrievich G. S., Schaffner T. (1990)  
Effect of Hyperlipidemic Serum and Irradiation on Wound Healing in Primary  
Quiescent Cultures of Vascular Cells  
Experimental and Molecular Pathology. 52: 1-12
- [112] Fischell T. A., Virmani R. (2001)  
Intracoronary Brachytherapy in the Porcine Model. A Different Animal.  
Circ. 104: 2388-2390
- [113] Waksman R., Rodriguez J. C., Robinson K. A., Cipolla G., D., Crocker I.,  
R., Scott N. A., King III S. B., Wolcox J. N. (1997)  
Effect of Intravascular Irradiation on Cell Proliferation, Apoptosis, and Vascular  
Remodeling After Balloon Overstretch Injury of Porcine Coronary Arteries.  
Circ.96: 1944-1952
- [114] Waksman R., Robinson K. A., Crocker I. R., Wang C., Gravanis M. B.,  
Cipolla G., D., Hillstead R., A., King III S. B. (1995)  
Intracoronary Low-Dose  $\beta$ -Irradiation Inhibits Neointima Formation After  
Coronary Artery Balloon Injury in the Swine Restenosis Model  
Circ. 92:3025-3031
- [115] Verin V., Popowski Y., Bochaton-Piallat M.-L., Belenger J., Urban P.,  
Neuville P., Redard M., Costa M., Celetta G., Gabbiani G. (2000)  
Intraarterial Beta Radiation induces Smooth Muscle Cell Apoptosis And  
Reduces Medial Cellularity in a Hypercholesteremic Rabbit Restenosis Model  
Int J Radiation Oncology Biol. Phys. 46: 661-670
- [116] Verin V., Popowski Y., Urban P., Belenger J., Redard M., Costa M.,  
Widmer M.-C., Rouzaud M., Nouet P., Grob E., Schwager M., Kurz J. M.,  
Rutishauser W. (1995)  
Intra-arterial Beta Irradiation Prevents Neointimal Hyperplasia in a  
Hypercholesteremic Rabbit Restenosis Model  
Circ. 92: 2284-2290

- [117] Kollum M., Cottin Y., Chan R. C., Kim H. S., Bhargava B., Vodovotz Y., Waksman R. (2001)  
Decreased adventitial neovascularization after intracoronary irradiation in swine: a time course study.  
Int J Radiation Oncology Biol Phys. 50 (4): 1033-1039
- [118] Kaluza G. L., Raizner A. E., Mazur W., Schulz D. G., Zymek P. T., Nguyen Ho P., Tio F. O., Fajardo L. F., Ali M. N. (2001)  
Dose Response Study of intracoronary beta radiation with  $^{32}\text{P}$  in balloon- and stent-injured coronary arteries in swine.  
Cardiovasc Rad Med. 2(4): 225-30 (abstr.)
- [119] Carter A.J., Laird J. R. (1996)  
Experimental results with endovascular irradiation via a radioactive stent.  
Int J Radiation Oncology Biol Phys. 36 (4): 797-803
- [120] Hehrlein Ch., Stintz M., Kinscherf R., Schlösser K., Huttel E., Friedrich L., Fehsenfeld P., Kübler W. (1996)  
Pure  $\beta$ -Particle-Emitting Stents Inhibit Neointima Formation in Rabbits.  
Circ. 93: 641-645
- [121] Ajani A. E., Waksman R. (2001)  
Intracoronary Beta Radiation: State of the Art  
J Interven Cardiol. 14: 601-610
- [122] Nguyen-Ho P., Kaluza G. L., Zymek P. T., Raizner A.E. (2002)  
Intracoronary Brachytherapy  
Catheterization and Cardiovascular Interventions. 56: 281-288
- [123] J. Kotzerke, M., Rentschler., G. Gladding., E. Schneider., M. Stabin, F. F. Knapp jr., S. N., Reske (1998)  
Dosimetrische Grundlagen für die endovaskuläre Therapie mit Re-188 zur Prävention der Restenose nach Angioplastie  
Nuklearmedizin 37: 68-72
- [124] Fox R. A. (2002)  
Intravascular Brachytherapy of the coronary arteries  
Phys. Med. Biol. 47: R1-R30
- [125] Salame M.Y., Douglas J. S. (2001)  
The Restenosis Story: Is Intracoronary radiation the Solution?  
Cardiology in review. 9 (6): 329-338
- [126] Nag S., Cole P. E., Crocket I. (1999)  
The American Brachytherapy Society - perspective on intravascular brachytherapy.  
Cardiovasc Radiat Med. 1: 8-19



- [127] Waksman R., Robinson K. A., Crocker I. R., Gravanis M. B., Cipolla G. D., Spencer B. King III (1995)  
Endovascular Low-Dose Irradiation Inhibits Neointima Formation After Coronary Artery Balloon Injury in Swine. A Possible Role for Radiation Therapy in Restenosis Prevention  
Circ. 91: 1533-1539
- [128] Sidawy A. N., Weiswasser J. M., Waksman R. (2002)  
Peripheral vascular brachytherapy  
J Vasc Surg. 35: 1041-1047
- [129] Herlein C. (2002)  
Radioaktive Stents – Problematik und Lösungsmöglichkeiten  
Herz. 27: 17-22
- [130] Cohen D., Cosgrove R. S., Berezin R. H., Tierstein P. S., Leon M. B., Kuntz R. E. (2002)  
Cost-Effectiveness of  $\gamma$  Radiation for Treatment of In-Stent Restenosis. Results from the GAMMA-1 Trial.  
Circ. 106: 691-697
- [131] Silber S. (2002a)  
Antiproliferativ beschichtete Stents und intrakoronare Brachytherapie: Gemeinsamkeiten und Unterschiede  
Z Kardiologie. 91: 443-457
- [132] Silber S. (2002b)  
Intrakoronare Strahlentherapie in kontrollierten und offenen Studien mit Afterloading-Systemen und „heißen“ Ballonkathetern  
Eine Analyse von 6692 Patienten  
Herz. 27: 30-55
- [133] Tripuraneni P. (2002)  
Coronary Artery Radiation Therapy for the Prevention of Restenosis After Percutaneous Coronary Angioplasty, II: Outcome of Clinical Trials  
Seminars in Radiation Oncology. 12 (1): 17-30
- [134] Molls M. (1996)  
Prinzipien der Kombination von Radiotherapie und Chemotherapie  
In: Scherer E., Sack H. Herausgeber: Strahlentherapie. Radiologische Onkologie  
4. Aufl. Springer Berlin – Heidelberg – New York, S. 189-205
- [135] Sindermann J. R., Skaletz-Rorowski A., Bartels A., Hohage H., Plenz G., Schmidt A., Breithardt G. (2002)  
Paclitaxel and Cyclosporin A show supra-additive antiproliferative effects on smooth muscle cells by activation of protein kinase C.  
Basic Res Cardiol. 97 (2): 125-131

- [136] Dvorak J., Petera J., Friedrich J., Raupach J., Krajina A., Melichar B., Zoul Z., Lojik M. Vodnansky P., Voboril R., Filip S. (2001)  
Endovascular Brachytherapy potentiated by hyperthermia in the prevention of vascular restenosis. A case report.  
Cardiovasc Radiat Med. 2 (4): 205-207 (abstr.)
- [137] Fortunato J. E., Mauceri H. J., Kocharyan H., Song R. H., Salloum R., Vosicky J., Swedberg K., Malik S., Abusharif F., Glgov S., Weichselbaum R. R., Baaionny H. S. (2000)  
Gene Therapy Enhances the Antiproliferative Effect of Radiation in Intimal Hyperplasia.  
J Surg Res. 89: 155-162
- [138] Raju U., Nakata E., Yang P., Newman R. A., Ang K. K., Milas L. (2002)  
In Vitro Enhancement of Tumor Cell Radiosensitivity by a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Enzyme: Mechanistic Considerations.  
Int J Radiation Oncology Biol Phys. 54 (3): 886-894
- [139] Shah T., Ryu S., Jun Lee H., Brown S., Kim J. H. (2002)  
Pronounced Radiosensitization of Cultured Human Cancer Cells by COX Inhibitor Under Acidic Microenvironment.  
Int J Radiation Oncology Biol Phys. 53 (5): 1314-1318
- [140] Pyo H., Choy H., Amorino G. P., Kim J., Cao Q., Hercules S. K., DuBois R. N. (2001)  
A Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, NS-398, Enhances the Effect of Radiation in Vitro and in Vivo Preferentially on the Cells that Express Cyclooxygenase-2.  
Clinical Cancer Research. 7: 2998-3005
- [141] Kishi K., Petersen S., Petersen C., Hunter N., Mason K., Masferrer J. L., Tofilon P. J., Milas L. (2000)  
Preferential Enhancement of Tumor Radioresponse by a Cyclooxygenase-2 Inhibitor  
Cancer Res. 60: 1326-1331
- [142] Ross J. S., Stagliano N. E., Donovan M. J., Breitbart R. E., Ginsburg G. S. (2001)  
Atherosclerosis and Cancer  
Common Molecular Pathways of Disease Development and Progression  
Annals New York Academy of Sciences. 947:271-293
- [143] Ross S.J., Stagliano N. E., Donovan M. J., Breitbart R. E., Ginsburg G. S., (2001)  
Atherosclerosis: a cancer of the blood-vessels?  
Am J Clin Path. 116 Suppl: 97-107

- [144] Ambrus J.L., Ambrus C. M., Lillie D. B., Jhonson R. J., Gastpar H., Kishel S. (1984)  
Effect of sodium meclofenamate on radiation-induced esophagitis and cystitis.  
J Med. 15 (2): 81-92
- [145] Mahafzah M., Halpern J., Nava H. R., Huben R. P., Sayyid S., Bryson W., Ambrus J. L. (1989)  
Radio-Protective Effect of Sodium Meclofenamate  
A Prospective Clinical Trial  
J Med. 40 (3&4): 261-272
- [146] Ambrus J. L., Ambrus C. M., Pickren J. W., Klein E. (1984)  
Effect of Sodium Meclofenamate on Ultraviolet Radiation Induced Carcinogenesis.  
J Med. 15(2): 161-168
- [147] Rasmussen L.H., Garbarsch C., Lorenzen I. (1987)  
Injury and repair of smaller muscular and elastic arteries. A light microscopical study on the different healing patterns of rabbit femoral and carotid arteries following dilatation injuries by a balloon catheter.  
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.;411(1):87-92.
- [148] Schillinger M., Exner M., Mlekusch W., Haumer M., Ahmadi R., Rumpold H., Wagner O., Minar E.. (2002)  
Inflammatory response to stent implantation: differences in femoropopliteal, iliac, and carotid arteries.  
Radiology.;224(2):529-35.

Ich danke Herrn Professor Dr. C. D. Claussen und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. S. H. Duda, dass sie mir die Möglichkeit geboten haben in ihrer Abteilung zu promovieren.

Herr Professor Dr. K. Dietz unterstützte mich in allen Fragen der statistischen Auswertung. Ihm gebührt mein Dank.

Meinen Dank möchte ich Herrn Dr. W. Schöber für die Erarbeitung des Themas aussprechen sowie Herrn OA Dr. H. Dittmann, der den nuklearmedizinischen Teil meiner Arbeit begleitete.

Ganz besonders hervorheben möchte ich Herrn Dipl. biol. Rainer Kehlbach, der mir mit außergewöhnlichem Engagement in allen Fragen der praktischen Umsetzung stets hilfreich zur Seite gestanden hat. Ich danke ihm für die wertvollen Tipps, die mich in allen Phasen der Arbeit vorangebracht haben.

Insbesondere gilt mein ausdrücklichster Dank Frau Lucia Stebner und Monika Landers für ihre Anteilnahme und ihr Engagement während der Promotionszeit.

# LEBENS LAUF

Name: Alexis Landers  
 Geburtsdatum/-ort: 19.Juli 1978 in Witten  
 Konfession: katholisch  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch

## Eltern/Geschwister:

Vater: Dr. rer. nat. Horst Landers, geb. am 25.09.1943, verst. am 22.06.2004, Chemiker in der Bergbauforschung Essen, später Chemie- und Physiklehrer am Schillergymnasium Witten

Mutter: Monika Landers, geb. am 21.12.1949, geborene Stebner, Grundschullehrerin an der Brenschenschule in Witten-Bommern

## Geschwister:

Manuel Landers, geb. 14.05.1977 Studienreferendar (Sekundarstufe I und II)

Teresa Landers, geb. 16.05.1980 z.Zt. Ausbildung zur Sonderschullehrerin

## Schulischer Werdegang

1983-1985: Zweijähriger Besuch des Kindergartens in Witten-Bommern  
 1985-1989: Grundschule (Brenschenschule) in Witten-Bommern  
 1989-1997: Schillergymnasium Witten  
 1995: Vorversetzung in die Oberstufe. Wahl der Kurse mit naturwissenschaftlichem Schwerpunkt  
 1997: Abitur

## Bundeswehr bzw. Zivildienst

1997-1998: Zivildienst in der kardiologischen Ambulanz des Marienhospitals in Witten.

## Studium

1998-2004: Studium der Humanmedizin  
 1998-2000: Vorklinischer Studienabschnitt an der Ruhr-Universität Bochum  
 2000-2001: Erster klinischer Studienabschnitt an der Ruhr-Universität Bochum und Studienortwechsel an die Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.  
 2001-2003: Zweiter klinischer Studienabschnitt an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Studienortwechsel an die Ruhr-Universität Bochum.  
 2004-2005: Praktisches Jahr an der Ruhr-Universität Bochum. Schwerpunkt: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
 02.06. 2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung