

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie  
der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg, Magdeburger Straße 6, 06097 Halle/Saale

Direktor: Prof. Dr. G. Isenberg

# **Einfluss mechanischer Dehnung auf das Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen des Menschen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg

von Tanja Angelina Gradištanac  
geboren am 21.10.1976 in Böblingen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Isenberg
2. Prof. Dr. Holtz
3. PD Dr Schubert (Rostock)

16.05.2006

18.01.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000011279**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011279>]

## Der schöpferische Irrtum

Irrtümer haben ihren Wert;  
Jedoch nur hie und da.  
Nicht jeder, der nach Indien fährt,  
entdeckt Amerika.

Erich Kästner

## Referat und bibliografische Beschreibung

---

Die Rolle der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen im Rahmen von Gefäßveränderungen wird nach wie vor kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde in der ersten Fragestellung der Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität humaner vaskulärer glatter Muskelzellen untersucht. Verwendet wurden primäre vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Aorta (hAOSM) und aus einer Koronararterie (hCASM) des Menschen. In der Flexercell strain unit wurden die Zellen mittels Unterdruck gedehnt. Durch Bestimmung der BrDU-Inkorporation wurde die DNA-Synthese, mittels der Wst-1-Aktivität die metabolische Aktivität untersucht. Unter dem Einfluss zwei-/dreitägiger zyklischer mechanischer Dehnung (5% Dehnung, 0,5 Hz) zeigten die niedrigen Passagen der hAOSM Zellen eine signifikant verminderte DNA-Synthese (um  $32,4 \pm 26,2\%$ ;  $n=6$ ,  $P=0,013$ ). Gleichzeitig bestand eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität (um  $39,1 \pm 17,9\%$ ,  $n=7$ ,  $P < 0,0001$ ).

Eine Abnahme der DNA-Synthese aufgrund eines Nekrose- bzw. Apoptose-bedingten Zelltodes konnte mittels Bestimmung der Zellzahl, der LDH-Aktivität und der Apoptose ausgeschlossen werden. Um den Widerspruch von gleichzeitiger Abnahme der DNA-Synthese bei Zunahme der metabolischen Aktivität weiter abzuklären, wurde die Gesamtzellzahl und der Mitoseindex der hAOSM Zellen ermittelt. Weder die Gesamtzellzahl (24,6%,  $P=0,287$ ) noch der Mitoseindex (52,8%,  $P=0,215$ ) wiesen eine signifikante Änderung unter dem Einfluss physiologischer Dehnung aus.

In den Versuchen mit hAOSM Zellen niedriger Passagen konnte demnach ein antiproliferativer Effekt physiologischer Dehnung nachgewiesen werden. So könnte mechanische Dehnung selbst zu einem Gleichgewicht der Vorgänge in der Gefäßwand beitragen.

Die untersuchten hCASM Zellen zeigten weder eine dehnungsinduzierte signifikante Veränderung der DNA-Synthese (serumfrei:  $-4,9 \pm 115,1\%$ ,  $n=4$ ,  $P=0,87$ ; Vollmedium:  $+14,6 \pm 44,2\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,6$ ) noch der metabolischen Aktivität (serumfrei:  $+14,6 \pm 44,2\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,6$ ; Vollmedium:  $+81,66 \pm 61,95\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,085$ ). Eine dehnungsinduzierte Zellschädigung konnte durch Bestimmung der LDH-Aktivität der hCASM Zellen ausgeschlossen werden.

In der zweiten Fragestellung interessierte, ob die Situation nach unphysiologischer Dehnung - nach PTCA - im Zellkulturmodell nachgestellt werden kann. hAOSM Zellen zeigten nach viermaliger Dehnung für 120 sec im technischen Maximalbereich (15% Dehnung, bis 80 kPa) über einen Zeitraum von einem Monat keine signifikanten Veränderungen der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität. Eine dehnungsinduzierte Zellschädigung konnte mittels Bestimmung der LDH-Aktivität ausgeschlossen werden.

Ein Restenosemodell war unter ausschließlichem Einfluss mechanischer Dehnung in der Zellkultur nicht nachvollziehbar, möglicherweise weil in vivo die Entwicklung einer Restenose multifaktoriell ist.

Gradištanac, Tanja:

Einfluss mechanischer Dehnung auf das Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen des Menschen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2006

# Inhaltsverzeichnis

---

1.1.	Einleitung	1
1.2.	Aufgabenstellung	17
2.	Materialien und Methoden	18
2.1.	Materialien	18
2.1.1.	Zellkultur	18
2.1.2.	Zellkulturmedien	19
2.1.3.	Passagieren der Zellen	19
2.1.4.	Einfrieren und Auftauen	20
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Zyklische mechanische Dehnung der Zellen	20
2.2.2.	Bestimmung der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität mit Hilfe colorimetrischer Methoden	22
2.2.3.	Bestimmung der Zellzahl mit dem „In situ cell proliferation kit, AP“	24
2.2.4.	Bestimmung der Aktivität der Laktatdehydrogenase mit dem „LDH optimized Lactatdehydrogenase EC 1.1.1.27 UV Test“	24
2.2.5.	Bestimmung der Apoptoserate mit dem „Cell Death Detection ELISA <sup>plus</sup> “ kit	25
2.3.	Datenwiedergabe und Statistik	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Humane glatte Muskelzellen aus der Aorta (hAOSM)	27
3.1.1.	Charakterisierung	27
3.1.2.	Zyklische mechanische Dehnung reduziert die DNA-Synthese in den niedrigen Passagen der hAOSM Zellen	32
3.1.3.	Abnahme der DNA-Synthese ist nicht auf eine Zellschädigung zurückzuführen	35
3.2.	Humane glatte Muskelzellen aus einer Koronararterie (hCASM)	39
3.2.1.	Charakterisierung	39
3.2.2.	Zyklische mechanische Dehnung zeigt keinen Einfluss auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität der hCASM Zellen	41

3.2.3.	Mechanische Dehnung hat keine Zellschädigung der hCASM Zellen zur Folge	43
3.3.	Restenosemodell: Kann die Situation nach einer PTCA im Zellkulturmodell nachgestellt werden?	45
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literatur	63
7.	Thesen	75

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	<u>Abbildung</u>
ACE	<u>Acetylcholinesterase</u>
All	<u>Angiotensin II</u>
bFGF/hFGF-B	<u>bovine/human recombinant fibroblast growth factor</u>
BrdU	<u>5-Bromo-2'-desoxyuridin</u>
BSA	<u>bovine serum albumin</u>
cAMP	<u>cyclo-Adenosin-3',5'-monophosphat</u>
Cas	<u>Caspase</u>
Cav-1	<u>Caveolin-1</u>
Crk	Onkogen
c-Src	hergeleitet vom Rous sarcoma virus oncoprotein
DAG	<u>Diacylglycerol</u>
DAG-PKC	<u>Diacylglycerol-Proteinkinase C</u>
DMEM	<u>Dulbecco's modified Eagle Medium</u>
DNA	<u>Desoxyribonukleinsäure</u>
EDTA	<u>Ethylendiamintetraessigsäure</u>
ELISA	<u>enzym-linked-immunosorbent-assay</u>
ERK	<u>extracellular signal-regulated kinase</u>
FAK	<u>fokal adhesion kinase</u>
FBS	<u>fetal bovine serum</u>
FCS	<u>fetal calf serum</u>
Fyn	Protein-Tyrosin-kinase
g	Erdbeschleunigung
Grb2	<u>growth factor receptor bound protein-2</u>
GTP	<u>Guanosintriphosphat</u>
hAOSM	<u>human aortic smooth muscle</u>
hCASM	<u>human coronary smooth muscle</u>
hEGF	<u>human recombinant epidermal growth factor</u>
ICAM	<u>intercellular adhesion molecule</u>
IGF-I	<u>Insulin growth factor</u>
ITS	<u>Insulin-Transferrin-Selenite</u>
JNK	c-Jun amino terminal kinase
LDH	<u>Laktatdehydrogenase</u>
LW	<u>Leerwert</u>
MAPK	<u>mitogen activated protein kinase</u>
MEK	<u>mitogen activated ERK activating kinase = MAPKK</u>

MMP	<u>M</u> atrix <u>m</u> etalloproteinase
NADH	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid- <u>H</u> ydrogen
NADPH	Phosphorylierte Form des NADH
PAX	<u>P</u> aired <u>b</u> ox gene
PBS	<u>P</u> hosphat gepufferte <u>S</u> alzlösung
PCNA	<u>p</u> roliferating <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen
PDGF	<u>p</u> latelet <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
PKC	<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u>
PLC-IP	<u>P</u> hospholipase <u>C</u> - <u>I</u> nositolphosphat
POD	Peroxidase konjugierter Antikörper
PTCA	<u>p</u> ercutaneous <u>t</u> ransluminal <u>c</u> oronar <u>a</u> ngioplasty
Raf	eine MAPKKK
Ras	eine monomere GTPase
RER	<u>r</u> auhes <u>e</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
RGD	Zell-Adhäsionsequenz Arg-Gly-Asp
R-TK	<u>R</u> ezeptor- <u>T</u> yrosin <u>k</u> inase
S6K	<u>S</u> 6 <u>k</u> inase
SAPK	<u>s</u> tress- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
SH-2	<u>S</u> rc <u>h</u> omolog <u>2</u> domain
Shc	<u>S</u> H-2 <u>c</u> ontaining adaptor protein
SMBM	<u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>b</u> asal <u>m</u> edium
SmGM	<u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>g</u> rowth <u>m</u> edium
Sos	Säugerhomolog von <u>S</u> on- <u>o</u> f- <u>s</u> evenless (ein Drosophila-Genprodukt)
TGF-beta	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>b</u> eta
TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrosefaktor
Wst-1	<u>w</u> ater <u>s</u> oluble <u>T</u> etrazolium

## 1.1 Einleitung

---

In vivo deformiert jede Pulswelle vaskuläre glatte Muskelzellen, welche Bestandteil der Zellwand der Arterien sind. Durch jede Pulswelle wird die Arterienwand um 5-10% gedehnt; eine Dehnung bis zu 25% ist während physiologischer Anpassung möglich [178]. So sind vaskuläre glatte Muskelzellen in situ einer konstanten zyklischen mechanischen Dehnung ausgesetzt. Die Endothelzellen erfahren dabei durch den Flüssigkeitsstrom bedingte Scherkräfte, vaskuläre glatte Muskelzellen werden elongiert [94]. Somit sind vaskuläre glatte Muskelzellen mit einer dynamischen mechanischen Umgebung konfrontiert, welche ihrerseits durch pulsatilen Druck und oszillierende Scherkräfte moduliert wird.

Die Einwirkung mechanischer Kräfte auf Zellen der Arterienwand reguliert die Zellfunktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen. Hämodynamische Veränderungen in Blutfluss, Blutdruck und Wandspannung spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Entwicklung der vaskulären Muskulatur und die erforderliche Adaption der Blutgefäße.

Vaskulären glatten Muskelzellen kommt durch ihre Reaktionsmöglichkeiten die Aufgabe zu, die mechanische Umgebung zu registrieren und darauf zu reagieren. Physiologischerweise ist periodische dynamische Krafteinwirkung relevant für die Morphologie und Funktion der vaskulären glatten Muskelzellen. Durch die begleitend auftretende Beanspruchung wird der vaskuläre Tonus reguliert.

So beeinflussen mechanische Kräfte wie zyklische mechanische Dehnung die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen bedingt ihre Kardinalrolle bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Ursächlich hierfür sind die Veränderungen der arteriellen Strukturen in pathophysiologischen Vorgängen, welche die arterielle Mechanik beeinflussen, wie z.B. Atherogenese, vaskuläre Hypertrophie, Hypertension, die Stabilität atherosklerotischer Plaques oder Restenosen nach gefäßchirurgischen Eingriffen.

Die strukturellen Veränderungen unterliegen einer Vielzahl genetischer, neuraler, humoraler und endothelialer Faktoren.

Mechanische Kräfte wirken auch im Rahmen therapeutischer Interventionen am Gefäß. Die im Zusammenhang mit dem Thema der Arbeit interessierende Intervention ist die perkutane transluminale Coronarangioplastie (PTCA), auch als coronare Ballonangioplastie bezeichnet.

Sie ist eine mögliche Behandlungsweise im Fall okklusiver Gefäßkrankungen, allgemein stenotischer Gefäßveränderungen. Definitionsgemäß liegt dabei eine 60%ige Koronarstenose mit Angina-pectoris-Symptomatik vor. Die vorgenommene Gefäßwanddilataion wird mit ansteigenden Drücken von 2 bis maximal 10 atü (im Durchschnitt 4-6 atü) und Dilatationszeiten von 30 bis 120 Sekunden durchgeführt. Erfolgreich ist die PTCA bei primärer 20%iger Lumenverbesserung sowie einer Reduktion der Stenose um 50%. In der Regel sind hierfür 2 bis 4 Dilatationen nötig. Dieser Eingriff stellt eine mechanische Belastung der Gefäßwand dar. Das Hauptproblem nach initial erfolgreicher Intervention aller Kathetertechniken ist die in den folgenden Monaten auftretende Restenose. Die Restenose ist definiert als in einem Zeitraum von 6 Monaten postinterventionell auftretende Lumeneinengung von mindestens



50%. Die klinische Restenoserate, welche auf einer erneuten Angina-pectoris-Symptomatik gründet, liegt bei nahezu 30%. Die angiographisch verifizierte Restenoserate beträgt 40 - 50%. Ischämien nach neun Monaten bis zu einem Jahr sind am ehesten auf eine progressive Erkrankung zurückzuführen [5, 21]. Restenosen sind als beschleunigte Arterioskleroseantwort auf die dilatatorisch bedingte Verletzung von Endothel, Intima, Media und Adventitia zu verstehen. Sie führt zu einem Verlust des initial erreichten Lumengewinns. Dieser ist klinisch von Bedeutung.

Es wird davon ausgegangen, daß die initial mechanisch bedingte Endothelverletzung durch Sekretion und lokale Wirkung zahlreicher Zytokine zu einer Veränderung des Milieus der Gefäßwand führt. Dies bedingt im Weiteren eine Thrombozytenadhäsion und –aggregation, die Aktivierung von Makrophagen und inflammatorischen Zellen sowie eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Zusätzlich zeigen letztere eine Migration in Richtung Intima und erfahren darüber hinaus eine Transformation vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp. Diese Prozesse werden dabei maßgeblich von PDGF, bFGF, IGF und weiteren mitogenen Faktoren initiiert und reguliert. Zudem synthetisieren und organisieren vaskuläre glatte Muskelzellen die extrazelluläre Matrix und regulieren den Abbau der extrazellulären Matrix.

Die Restenose beinhaltet demnach im Wesentlichen fünf Komponenten:

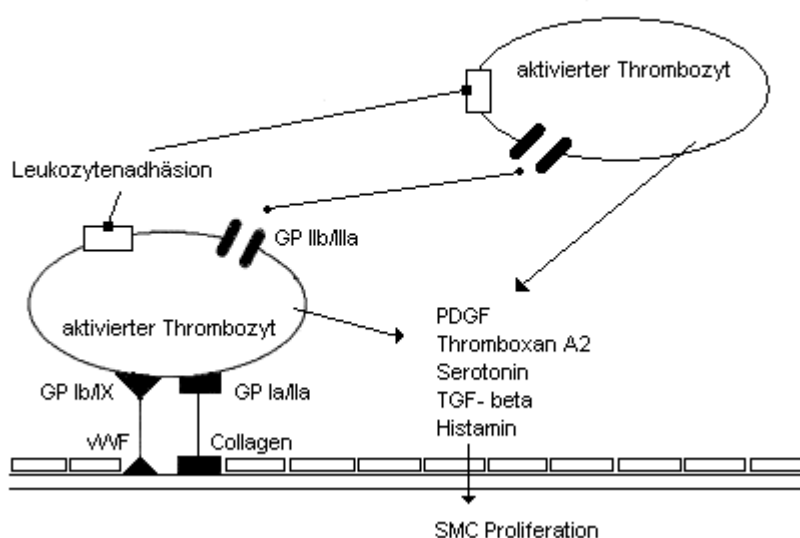
- die frühe elastische Retraktion
- Thrombusbildung und -integration,
- Neointimabildung (Gefäßwandhyperplasie, Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, Aktivierung der Makrophagen, durch die Veränderung des Phänotyps bedingte Sezernierung von extrazellulären Matrixsubstanzen),
- verminderte Apoptose der vaskulären glatten Muskelzellen,
- spätes Gefäßremodeling.

Der Restenosevorgang gilt nach 4-6 Monaten als abgeschlossen [13, 21].

Die rasante Entwicklung der Molekularbiologie in den letzten Jahrzehnten hat zu einem neuen Verständnis von Ätiologie und Pathogenese zahlreicher Gefäßläsionen, so auch der Restenose, geführt. Die gemeinsame Pathobiologie von beschleunigten Arteriopathien wie Restenose, Vaskulopathien im Rahmen von Herztransplantationen, coronarvenöser Bypasschirurgie und Hypertension unterscheidet sich von den zugrundeliegenden Prozessen der Atherosklerose.

**Thrombogenese.** Die Angioplastie einer arteriellen Läsion bedingt eine Dehnung der Gefäßwand, die Ruptur atherosklerotischer Plaques und häufig die Ruptur der Membrana elastica interna. In erster Linie folgt darauf die Thrombozytenadhäsion an der exponierten Oberfläche und murale Thrombusbildung [136]. Es konnte festgestellt werden, dass nach Verletzungen die Produktion von Osteopontin und dem dazugehörigen Rezeptor, dem  $\beta$  3 Integrin, erhöht sind. Das  $\beta$  3 Integrin bindet an den Glycoprotein IIb/IIIa Rezeptor der Thrombozyten [181]. Ausser einer gesteigerten Thrombozytenaggregation fördert die Interaktion zwischen Osteopontin und dem  $\beta$  3 Integrin Rezeptor zudem Migration, Invasion extrazellulärer Matrix und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen [37,

72, 79, 156, 181, 224, 246]. Der Verlust der endothelialen Oberfläche mit anschließender Ablagerung und Degranulation von Thrombozyten exponiert die darunterliegenden Gefäßmuskelzellen zahlreichen Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF und TGF –  $\beta$  (**Abb.1**). Eine Endothelverletzung geht zudem mit dem Verlust von endothelialen Faktoren wie Stickstoffmonoxid einher. Stickstoffmonoxid stellt sonst einen Gegenpol zu den Wachstumsfaktoren dar und inhibiert die Thrombozytenadhäsion sowie -aggregation [21, 72, 86, 87, 108, 112, 114, 199, 239, 252]. Die endotheliale Denudation induziert zudem die Bildung von Gewebefaktoren, welche bei Bindung an den Faktor VII/VIIa die extrinsische Koagulation mit resultierender Thrombusbildung nach sich zieht. Die Bildung von Gewebefaktoren persistiert nach PTCA über einen Monat lang. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass Thrombin selbst die Bildung von Gewebefaktoren induzieren kann und damit einen thrombogenen Kreislauf aufrecht erhält [5, 86, 175, 200]. Die Bildung muraler Thromben wiederum führt zu einer hohen lokalen Konzentration an Thrombin. Thrombin ist ein potentes Mitogen vaskulärer glatter Muskelzellen. Um den Kreislauf zu schließen, wird die Expression von Thrombinrezeptoren durch obengenannte Wachstumsfaktoren stimuliert [2, 37, 200]



**Abb. 1** Beteiligung von PDGF an der neointimalen Proliferation nach Gefäßverletzung im Rahmen der Thrombogenese (nach [37])

**Vaskuläre glatte Muskelzellen.** Sowohl intimale als auch mediale vaskuläre glatte Muskelzellen bestimmen die Zellzusammensetzung der restenotischen Läsion [73, 96]. Der Ursprung neointimaler vaskulärer glatter Muskelzellen ist von therapeutischer Bedeutung. Umstritten ist, ob die Migration signifikant bestimmend für die Läsion ist. In der Bedeutung unumstritten sind hingegen die phänotypisch veränderten Muskelzellen in neointimalen Läsionen.

Die bereits erwähnte Zunahme der Sekretion von Wachstumsfaktoren und anderen Syntheseprodukten ist teils auf eine Modulation des Phänotyps der vaskulären glatten Muskelzellen zurückzuführen. Bereits für Zellen in Primärkultur, abhängig von Probenmaterial (Spezies, Alter) und

Zelldichte lässt sich schon nach Tagen ein spontan vonstatten gehender Wechsel vom kontraktile zum sekretorischen Phänotyp feststellen [10].

Diese Modulation findet auch in vivo statt. Vaskuläre glatte Muskelzellen ändern ihren Phänotyp entsprechend der wechselnden funktionellen Anforderungen. Um ihrer Funktion genügen zu können, sind vaskuläre glatte Muskelzellen in der Lage, eine Bandbreite an Phänotypen zu nutzen. Es ist so zu verstehen, dass an dem einen Ende des Spektrums an Phänotypen der kontraktile Phänotyp steht, am anderen der sekretorische Phänotyp [4, 22, 23, 32, 101, 173].

Die an die vaskulären glatten Muskelzellen gestellten Anforderungen können sowohl physiologische als auch pathophysiologische Ursachen haben. Zu nennen sind u.a. Veränderungen, die Zwischenschritte in der körperlichen Entwicklung darstellen, Veränderungen der Wandspannung bedingt durch erhöhten Blutdruck, durch Regeneration und Wiederherstellung nach direkter Schädigung der Gefäßwand sowie Veränderungen nach Endothelabtragung (Ballonkatheterisierung, anderweitige Traumata).

Eine gesteigerte Proliferation und Proteinsynthese/sekretion ist charakteristischerweise an das Vorkommen des sekretorischen Phänotyps gekoppelt [45, 46, 101, 192].

Die vaskulären glatten Muskelzellen vom sekretorischen Phänotyp sind gekennzeichnet durch die Reduktion des Volumenanteils an Myofilamenten mit vermindertem Nachweis von smc-Myosin, -Aktin und Caldesmon. Die Zellen zeigen im Zytoplasma zahlreich vorkommende synthetisierende Organellen - RER, Golgi und freie Ribosomen. Sie produzieren und sezernieren eine grosse Menge an Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- $\beta$  1 und IGF-I. Diese sind wiederum in der Lage unter anderem die Expression von Thrombinrezeptoren zu stimulieren, welches die mitogene Aktivität von Thrombin hinsichtlich der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen unterstützt [196].

Birukov et al. [23] zeigten an vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta von Kaninchen, dass zyklische mechanische Dehnung (Flexcell-Platten, bis 15% Dehnung, bis 8 d) eine drastische Zunahme der Expression des Markerproteins des kontraktile Phänotyps wie h-Caldesmon (bzw. Abnahme/unveränderte Werte von l-Caldesmon, welches ein Indikator für den sekretorischen Phänotyp ist) zur Folge hat. Dies ist als Ausdruck einer Modulation des Phänotyps vom sekretorischen zum kontraktile zu sehen. In Abwesenheit der zyklischen mechanischen Dehnung zeigte sich wiederum eine deutliche Abnahme der Markerproteine des kontraktile Phänotyps, neben h-Caldesmon auch von Calponin und smc-Myosin. Dies korreliert mit dem Verlust der Kontraktionsfähigkeit der vaskulären glatten Muskelzellen. Diese und andere Veränderungen des Phänotyps der neointimalen Gefäßmuskelzellen (wie die Expression von Osteopontin, Tropoelastin und Procollagen) zeigen Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp unreifer (in der Entwicklung befindlicher) Gefäßmuskelzellen [5]. So ist auch denkbar, dass neointimale Zellen zudem auf eine Expansion von ruhenden Vorläuferzellen statt ausschließlich auf eine Modulation des Phänotyps normaler vaskulärer glatter Muskelzellen zurückzuführen sind.

Reusch et al. fanden zudem unter zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, bis 20 kPa, 36-72 h) eine Zunahme von smooth muscle myosin heavy chain Isoformen sowie eine vermehrte Sekretion von PDGF (dementsprechend eine gesteigerte Proliferation), wobei eine Abnahme der non-muscle myosin heavy chain zu verzeichnen war [196].

Durch die Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen ist bekannt, dass mechanisch bedingte Veränderungen von extrazellulärer Matrix, Zellstoffwechsel, Wachstum, Proliferation, DNA-Synthese und Genexpression ausser auf eine direkte Verletzung der Zellwand, auch auf mechanisch induzierte Vorgänge zurückzuführen sind.

Diskutiert werden verschiedene Kaskaden der Zellantwort.

Mechanische Dehnung induziert die Produktion auto- und parakrin wirkender Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF. Einer der zugrundeliegenden Mechanismen, welcher mechanische Ereignisse in physiologische Antworten übersetzt, ist der der Mechanotransduktion.

Die Mechanotransduktion der vaskulären glatten Muskelzellen ist definiert als zelluläre Antwort auf transmuralen Druck oder Dehnung, welche unterteilt wird in eine resultierende Kontraktion (myogener Tonus), Synthese und Sekretion löslicher und unlöslicher Moleküle (Wachstumsfaktoren, Substanzen der extrazellulären Matrix z.B. Collagen), Veränderungen in Rate und Muster von Zellwachstum und Zellteilung (Hypertrophie/Hyperplasie) [178].

Von Interesse ist dabei die primäre Struktur, welche mechanische Dehnung wahrnimmt und transmittiert. Über diese kommt es zu einer mitogenen Antwort auf mechanische Dehnung, welche über spezifische Interaktionen mit der extrazellulären Matrix vermittelt wird.

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist dabei für die Effektivität der Mechanotransduktion maßgeblich. Wilson et al [246] konnten unter zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, 15-20 kPa, 48 h) eine Zunahme der DNA-Synthese vaskulärer glatter Muskelzellen neonataler Ratten in abnehmender Reihenfolge auf Collagen-, Fibronectin- und Vitronectin-beschichteten Platten feststellen. Keine Zunahme der DNA-Synthese war unter Verwendung von Laminin oder Elastin zu verzeichnen. Demzufolge sind spezifische Proteine der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin) an der zellulären Detektion mechanischer Dehnung beteiligt. Die Zellen erfassen mechanische Dehnung über eine Interaktion von Integrinrezeptoren in der Plasmamembran mit spezifischen Matrixproteinen (sog. RGD-Peptide, fixiert auf bewegtem Substrat; im Gegensatz zu löslichen RGD-Peptiden, welche die PDGF-vermittelte DNA-Synthese unterbrechen, ebenso wie Integrinantikörper).

Diese Interaktion ist entscheidend für die Fähigkeit der Zelle auf mechanische Dehnung zu reagieren, z.B. in Form von PDGF-Sekretion und DNA-Synthese. Desweiteren wird die Rolle des Zytoskeletts in Verbindung mit diesem Zusammenspiel innerhalb der Signalübertragung diskutiert.

Die Mechanotransduktion mündet in verschiedene Wege der zellulären Umsetzung. Möglich sind eine Änderung der Leitfähigkeit der Membranionenkanäle, zytoskelettaler Strukturen, Aktivierung und Inaktivierung zahlreicher Second-messenger-Systeme.

Gefäßwand- und Zellkomponenten, welche Anteil an der Mechanotransduktion haben, sind im Einzelnen:

**Extrazelluläre Matrix.** Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus Strukturproteinen (wie Collagen und Elastin), Adhäsionsproteinen (wie Fibronectin und Laminin, welche die Zell-Zellinteraktion in Form von Liganden und Rezeptoren ermöglichen) und Grundsubstanz zusammen. Die Grundsubstanz besteht

aus Proteoglykanen. Diese sind Molekülkomplexe aus Kohlenhydraten (ca. 95%) und Proteinen (ca. 5%). Die Achse wird aus Hyaluronsäure gebildet, an welche Seitenketten aus Glykosaminoglykanen angelagert sind. Deren hohe Anzahl negativer Ladungen bedingt eine hohe Wasserbindung und damit den raumfüllenden Effekt. Vaskuläre glatte Muskelzellen sind in dieser Matrix adhäsiver extrazellulärer Proteine, bestehend aus Collagen, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Proteoglykanen, eingebettet. Sie haben die Aufgabe die individuellen Zellen einerseits voneinander abzugrenzen, andererseits miteinander zu verbinden. Indem sie die benachbarten vaskulären glatten Muskelzellen physikalisch verkettet, sichert die extrazelluläre Matrix die strukturelle Integrität der Media, welche einen Großteil der Gefäßwand bildet.

Extrazelluläre Matrix reagiert auf Kräfteinwirkungen wie sie z.B. durch transmuralen Druck auftreten. So wird wiederum diskutiert, dass im Rahmen auftretender Kräfte die extrazelluläre Matrix einen Einfluss auf intrazelluläre Phosphorylierungsvorgänge ausübt, welche Zellwachstum und -teilung lenken.

Syndecan – ein transmembranes Heparinsulfat-Proteoglykan – kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Syndecan-4 ist in Regionen fokaler Adhäsionen von Endothelzellen, vaskulären Muskelzellen und Fibroblasten lokalisiert. Diese fokalen Adhäsionen wiederum vermitteln Verbindungen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix, welche spezialisierte membran- und zytoskelettale Proteine enthalten. Hier liegen auch die Membranverbindungen der Aktinfilamentbündel. Die zentrale Funktion von Syndecan ist im wesentlichen durch eine Heparinsulfat-vermittelte Bindung extrazellulärer Liganden bedingt. Dies beinhaltet eine Bandbreite an Molekülen wie Wachstumsfaktoren (bFGF, HB-EGF, PDGF), Proteine der extrazellulären Matrix (Collagen, Fibronectin, Laminin), Zell-Zelladhäsions-Rezeptoren (L-Selectin, N-CAM), Enzyme (Acetylcholinesterase, Lipoproteinlipase), lipidbindende Proteine (LDL), Gerinnungsfaktoren (Antithrombin III, Gewebefaktor) und andere. Bei mangelnder Spezifität der Bindung der genannten Liganden an Syndecan wird vermutet, dass Syndecane Regulatoren der Liganden-vermittelten Aktivierung primärer Signalrezeptoren sind. Als Korezeptoren von Wachstumsfaktor-Rezeptorkinasen, Integrinen und Zelladhäsionsmolekülen zeigen sie eine Verstärkung der Ligandenbindungsaffinität sowie der Adhäsion, indem sie an die zweite Seite der Liganden binden, und der zytoskelettalen Befestigung. So sind sie an diversen Zellfunktionen (z.B. der Zellproliferation), an der zytoskelettalen Organisation, der Zell-extrazellulären Matrixadhäsion und der Zell-Zelladhäsion beteiligt [19, 35, 93, 113, 144, 197]. Darüberhinaus berichten Mali et al. [148], dass durch eine Überexpression von Syndecan-1 eine Verminderung der bFGF-induzierten Zellproliferation und zugleich eine Verstärkung der Zell-Matrixadhäsion hervorgerufen werden kann. So können Syndecane wahrscheinlich in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration nicht nur eine positive, sondern auch eine negative regulierende Rolle im Zellwachstum spielen. Dies wird nicht zuletzt im Rahmen der Organentwicklung diskutiert.

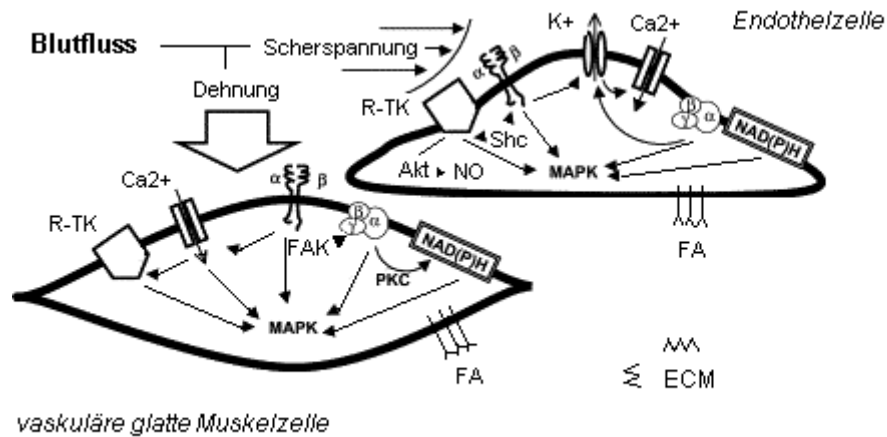
Im Gegenzug konnten Kollros et al. [126] sowie andere Arbeitsgruppen zeigen, dass zyklische mechanische Dehnung ein wirksamer Stimulus für die Collagensynthese ist. Demnach wird gegenläufig unter dem Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung die extrazelluläre Matrix beeinflusst. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Theophyllin (ein cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitor) oder Dibutyryl-cAMP unterdrückt werden. Die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen ist assoziiert

mit der Produktion zahlreicher Proteine der extrazellulären Matrix wie Tenascin, Collagen Typ I und IV, Fibronectin und Proteoglykanen [4, 6, 35, 44, 101, 126, 170].

Die Rolle der extrazellulären Matrix an der Mechanotransduktion zeigt sich abgesehen von ihrer strukturellen Aufgabe zudem in den zahlreichen Experimenten bezüglich der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Einfluss auf intrazelluläre Vorgänge (DNA-Synthese, Proliferation, Sekretion von Wachstumsfaktoren u.a.). So zeigten Wilson et al. [246] an Primärkulturen neugeborener Ratten, dass eine dehnungsinduzierte Erhöhung der DNA-Synthese (zyklische mechanische Dehnung, Flexcell-Platten, 15-20 kPa, 48h) auf Matrixproteinen wie Collagen, Fibronectin oder Vitronectin nachweisbar ist. Auf Matrixproteinen wie Laminin oder Elastin fand sich keine dehnungsinduzierte Veränderung der DNA-Synthese.

**Integrine.** Die Beteiligung der Integrine an der Mechanotransduktion wird aus mehreren Gründen heraus erwogen [24, 95, 212]. Es ist inzwischen bekannt, daß Integrine, eine Gruppe heterodimerer transmembranöser Glycoproteine, mit Matrixproteinen interagieren. Dies gilt besonders für Collagen. Ebenso besteht eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts. Hierfür liefern Erkennungsregionen, bestehend aus dem Tripeptid RGD (Arg-Gly-Asp), die molekulare strukturelle Verbindung für die bidirektionale Übertragung mechanischer Kraft zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett. Integrine werden somit als mögliche Mechanorezeptoren angesehen. Sie unterstützen eine Versteifung des Zytoskeletts proportional zu der einwirkenden mechanischen Kraft. Für eine vermittelnde Rolle spricht, dass Integrine vornehmlich in Bereichen mit hohen Anteilen an Tyrosinkinase, Phospholipase C, Proteinkinase C und Calciumkanälen zu finden sind. All diese Moleküle beeinflussen Kontraktion, Sekretion und Zellteilung. So verwundert es nicht, dass aktivierte Integrine Vorgänge durch divalente Kationen, vor allem Calcium, regulieren und durch diese wiederum selbst reguliert werden. Beispiele zeigen, dass die Aktivierung von Integrinen eine Veränderung der freien intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration nach sich zieht [23, 215].

**Ionenkanäle.** Bereits 1964 berichtete Sparks über depolarisierende Effekte von Dehnung und Druck auf die Zellmembran vaskulärer glatter Muskelzellen in Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium; man vermutete zusätzlich zu den L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanälen weitere ausschlaggebende Ionenkanäle. Kirber et al. [124] beschrieben mechanosensitive Ionenkanäle, welche relativ unspezifisch für Ionen sind. Neben diesen konnte zudem der Einfluss Dihydropyridin-sensitiver spannungsabhängiger Calciumkanäle und  $Ca^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanäle nachgewiesen werden. So kann inzwischen die Depolarisation der Zellmembran vaskulärer glatter Muskelzellen bei ansteigendem transmuralen Druck auf eine Vielzahl von beteiligten Ionenkanälen zurückgeführt werden.



**Abb. 2** Tyrosinkinaserzeptoren (R-TK), Ionenkanäle, Integrine ( $\alpha$ - $\beta$  – Paare), heterodimere G-Proteine (mit drei Untereinheiten  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ) und die Membranoxidase NAD(P)H sind an der Vermittlung der Signaltransduktion beteiligt. Diese nehmen die mechanischen Kräfte (Dehnung/Scherspannung) sowohl auf Endothelzellen als auch auf vaskulären glatten Muskelzellen wahr und reagieren darauf letztendlich mit einer Aktivierung von MAPK (nach [139]). Schematisch dargestellt sind fokale Adhäsionen (FA) – Transmembranproteine, formiert von der fokalen Adhäsionskinase und der zytosomatischen Domäne von Integrinen – mit Verbindung zu Aktinfilamenten des Zytoskeletts einerseits und zu Proteinen der extrazellulären Matrix andererseits.

**Second-messenger-systeme.** Abgesehen von der direkten Regulierung des Calciumeinstromes und der intrazellulären Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ , bewirken Druck und Dehnung die Aktivierung zahlreicher Second-messenger-Systeme. Dies sind unter anderem Tyrosinkinasen, mitogen-aktivierte Proteinkinase, der PLC-IP<sub>3</sub>/DAG-PKC-Mechanismus, Phospholipase A<sub>2</sub> und p450-Systeme; es fand sich eine dehnungsinduzierte Abnahme von cAMP. Zudem konnte gezeigt werden, dass PLC auch direkt durch Strukturanteile der Gefäßwand, wie Collagen aus der extrazellulären Matrix, aktiviert werden kann.

Viele dieser Mechanismen stehen untereinander in Verbindung und zeigen eine Abhängigkeit von der intra- und extrazellulären Calciumkonzentration. Das Zytoskelett steht zum einen mit Second-messenger-Molekülen wie Calcium, DAG und Phosphoinositiden in Kontakt, zum anderen besitzt es Bindungsstellen für diese Moleküle.

Die Mechanotransduktion vaskulärer glatter Muskelzellen bezieht eindeutig - wenn auch vor allem im Hinblick auf kontraktile Funktionen - die Interaktion zahlreicher ionenabhängiger und enzymatischer Mechanismen mit ein. Bedingt durch Druck und Dehnung kommt es mittels Membrandepolarisation und Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und dehnungsaktivierter Kanäle zu einer Zunahme des Calciumeinstromes.

Die enzymatische Kaskade wiederum ist calciumabhängig. Ungeklärt bleibt die Art des Zusammenspiels, z.B. welche Proteine aufgrund Druck und Dehnung durch PKC in vaskulären glatten Muskelzellen phosphoryliert werden.

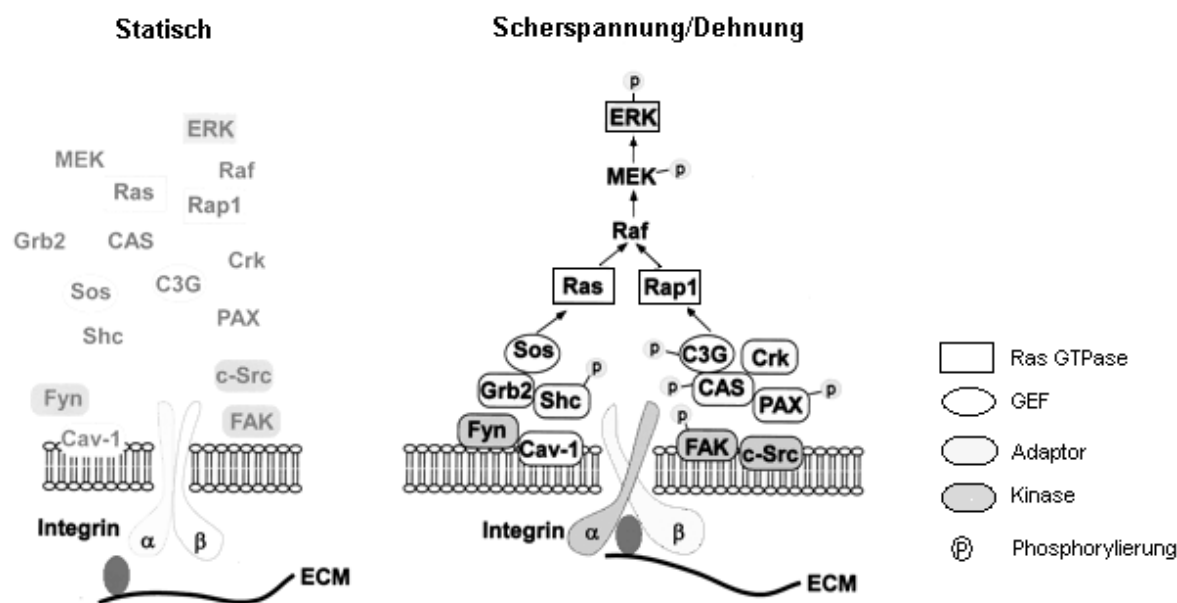
Wie bereits ausgeführt, werden heute für die Mechanotransduktion dehnungsaktivierte Kanäle und Integrine verantwortlich gemacht. Dafür spricht, dass die meisten der für die Transduktion essentiellen Anteile in diesen Bereichen kolokalisiert vorkommen. So sind im Rahmen mechanisch bedingter Stimulation vaskulärer glatter Muskelzellen zahlreiche Signalwege mit der Formation fokaler

Adhäsionsstellen assoziiert. Daran beteiligt ist die fokale Adhäsionskinase (FAK). Diese bindet an die zytoplasmatische Domäne von Integrinen, welche zur Formation dieser fokalen Adhäsionsstellen notwendig sind. Die Aktivierung von FAK ist somit ein Indikator für diese Formation (**Abb.2**).

Aufgrund der bisherigen Einsichten stellt man sich vor, dass Druck und Dehnung auf die extrazelluläre Matrix übertragen werden, welche wiederum über RGD-Bindungsstellen mit den Integrinmolekülen in der Zellmembran vaskulärer glatter Muskelzellen Kontakt hält. Die zytoplasmatische Domäne der Integrine steht in Verbindung mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts und die möglichen Reaktionswege beziehen jedes Messenger-System, welches an der Regulation von Kontraktion und Zellteilung beteiligt ist, mit ein (**Abb.3**).

Eine direkte Übertragung der Krafteinwirkung von extrazellulärer Matrix über Integrine und Elemente des Zytoskeletts auf den Zellkern, was zu einer Änderung der Konfiguration DNA-assoziierter Enzyme führen könnte und damit verbunden zu einem direkten Einfluss auf die DNA-Expression, wird zudem diskutiert [215].

Zellen reagieren auf extrazelluläre Stimuli mit der Aktivierung von Signaltransduktionswegen, welche in Veränderungen der Genexpression münden.



**Abb. 3** Die Integrin-vermittelte Mechanotransduktion beinhaltet multiple Kinasen (z.B. FAK, c-Src, Fyn), Adaptormoleküle (z.B. CAS, Shc), Guanin-nukleotid Austauschfaktoren (GEF wie z.B. C3G, Sos) und kleine GTPasen (z.B. Rap1, Ras) bei der Aktivierung von MAPK (z.B. ERK). Unter statischen Bedingungen befinden sich die mechanosensitiven Integrine in inaktiver Anordnung. D.h. Signalmoleküle sind nicht phosphoryliert bzw. nicht zu Signalkomplexen vereinigt. In Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen kommt es durch eine mittels Scherspannung/Dehnung vermittelte Aktivierung der α- und β- Integrinuntereinheiten zu einer erhöhten Affinität dieser an Proteine der extrazellulären Matrix. Zudem werden die FAK/c-Src und Cav-1/Fyn Signalwege aktiviert. Beide vereinigen sich in Höhe der Raf-MEK-ERK-Kaskade (nach [215]).

Da vaskuläre glatte Muskelzellen *in vivo* unter normalen Umständen trotz beträchtlicher dynamischer Belastung (physiologische Anpassung von 5 - 25% Dehnung) keine gravierenden Veränderungen zeigen, muß im Hinblick auf Wachstum und Zellteilung der Mechanotransduktion eine vitale



inhibitorische Rolle zugeschrieben werden. Die Mechanotransduktion reguliert zudem indirekt den Blutfluss durch Suppression struktureller Veränderungen sowie der Angiogenese.

Nun ist aber in zahlreichen Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen gezeigt worden, dass zyklische mechanische Dehnung eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zur Folge hat. Diese arbeiteten nahezu ausschließlich mit Flexcell-Membranen. Die Versuchsanordnung mit Flexcell-Membranen ist durch eine unphysiologische Dehnung im Sinne eines Hochdruckmodells gekennzeichnet. Das Hochdruckmodell ist definiert durch eine inhomogene Dehnung mit einer meist durchschnittlichen Dehnung von 10%. Dabei kommt es zu einer inhomogenen, lokal unterschiedlich starken Dehnung von minimal 3 bis maximal 25%. Die mechanische Dehnung unter Verwendung von Flexcell-Membranen liegt damit deutlich über der in vivo physiologischen pulsatorischen Dehnung von 5-10%, wobei sich diese Dehnung in vivo homogen vollzieht. Unter Verwendung von Bioflexmembranen wie u.a. durch Hipper et al. und in der vorliegenden Arbeit wird eine homogene, niedrige und damit physiologische Dehnung erzielt. Dies ist durch eine von den Flexcell-Membranen differierenden Versuchsanordnung gelungen, indem die Bioflexmembranen mittels angelegtem Vakuum über einen Plastikstutzen gezogen werden und somit eine homogene biaxiale Dehnung von je nach Einstellung 5% oder 10% nachvollziehen. Die Arbeiten mit homogener mechanischer Dehnung zeigen eine Antiproliferation.

Zwischen den Arbeiten mit Nachweis einer dehnungsinduzierten Proliferation und denjenigen mit Nachweis einer dehnungsinduzierten Antiproliferation vaskulärer glatter Muskelzellen lassen sich abgesehen von der unterschiedlich angelegten Dehnung keine weiteren sicheren Unterschiede ablesen. Nahezu alle bestehenden Arbeiten mit kontroversen Ergebnissen verwendeten Tiermodelle, meist vaskuläre glatte Muskelzellen embryonaler oder neonataler Ratten oder Kaninchen aus der Aorta. Die Forschungsgruppen, welche vaskuläre glatte Muskelzellen des Menschen – sofern es sich um vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Aorta des Menschen handelte – verwendeten, fanden überwiegend eine dehnungsinduzierte Antiproliferation. Die Methoden unterschieden sich im wesentlichen nur in der Verwendung von BrDU oder 3H-Thymidin zur Detektion der DNA-Synthese.

Im Gegensatz zu den Forschungsgruppen, welche mit Hochdruckmodellen arbeiten, konnten dann Hipper et al. [105] an embryonalen vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten (A10 Zelllinie) zeigen, dass physiologische zyklische mechanische Dehnung (Bioflex-Platten, 5% Dehnung, 48 h) eine Abnahme der DNA-Synthese zur Folge hat.

Ebenso fanden Chapman et al. [39] unter dem Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung (Bioflex-Platten, 10% Dehnung, 3-5 d) eine Hemmung der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen aus der thorakalen Aorta von Ratten. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass physiologische Dehnung die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen über einen G1-Zellzyklus-Arrest hemmt. Die dehnungsinduzierte Hemmung der G1/S-Phase Transition ist Folge einer selektiven Erhöhung der Proteinlevel des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p21, welcher die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins hemmt.

Dies konsolidiert den antiproliferativen Effekt physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes der Vorgänge in der Gefäßwand.

**Proteinkinasen.** Die maßgebliche Komponente der Signaltransduktion ist die Aktivierung von Proteinkinasen, welche zahlreiche zelluläre Substrate phosphorylieren, darunter auch Transkriptionsfaktoren, welche die Induktion verschiedener Gene kontrollieren.

Die Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) stellt in diesem Zusammenhang eine der wichtigsten Gruppen dar [85]. MAPK sind Prolin-gesteuerte Proteinkinasen, welche als Teil einer Kaskade durch Phosphorylierung über Threonin- und Tyrosinresiduen aktiviert werden. MAPK sind an Kontraktion und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen beteiligt. Sie sind sowohl im kontraktile als auch im sekretorischen Phänotyp präsent und werden durch mechanische Dehnung, oxidativen Stress und Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF aktiviert.

Drei voneinander getrennt anzusehende Teile der MAPK-Familie werden beschrieben [192].

Die ERK-Familie (extracellular signal-regulated kinase), bestehend aus ERK-1 und ERK-2 (auch p42/p44 MAPK). Sie werden durch Wachstumsfaktoren via Ras, Serin/Threonin-kinase Raf-1 und die MEK aktiviert.

Die zweite Familie der MAPK besteht aus Kinasen, welche das Aminoende des Transkriptionsfaktors c-Jun phosphorylieren. Im Gegensatz zu den zuvor genannten ERK werden diese durch Stressfaktoren wie UV-Licht, Hitzeschock, Hyperosmolarität oder hypoxische Schäden aktiviert. Sie werden als JNK (c-Jun amino terminal kinases)/SAPK (stress-activated protein kinase) bezeichnet [83].

Der dritte Teil ist unter der Bezeichnung p38 (HOG-1 ist ein Hefehomologon dazu) bekannt und wird ebenfalls durch Stressfaktoren aktiviert.

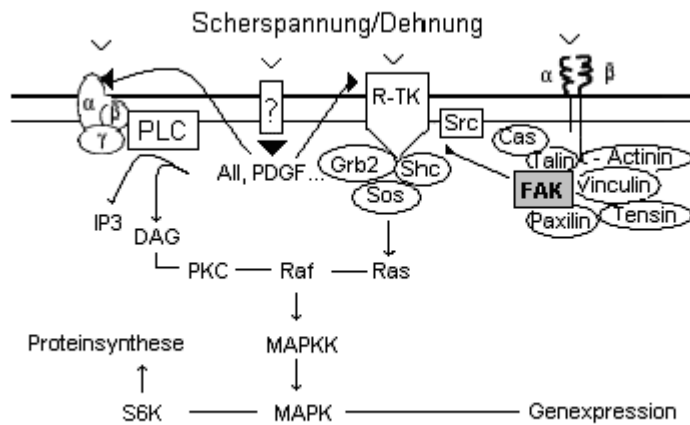
Pyles et al. [192] zeigten in ihren Versuchen an Muskelstreifen der Arteria carotis des Schweines, dass infolge mechanischer Dehnung (Ballonangioplastie: 3 x 6atm, je 60 sec) die MAPK-Aktivität in vivo ansteigt. Sowohl bei diesem Versuchsmaterial als auch bei Koronararterien ergaben Messungen der MAPK-spezifischen Phosphotransferase-Aktivität nach Ballonangioplastie, dass diese Form der mechanischen Dehnung MAPK aktiviert. Damit würde eine Beteiligung der MAPK im Rahmen der Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen bei Restenose in Frage kommen. Verantwortlich dafür ist die Expression von Protoonkogenen als Reaktion auf eine erhöhte MAPK-Aktivität.

Eine mögliche Kaskade geht zudem vom Öffnen und Schließen verschiedener noch unbekannter sarkolemmaler Ionenkanäle (s. Abb. 4 „?“) als direkte Antwort auf mechanische Dehnung aus, was möglicherweise über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems in einer Beeinflussung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren resultiert [139].

Letztlich führt dann die Aktivierung der Proteinkinase-C-Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen zu einer Aktivierung von Raf, MAPK Kinase (auch als MEK für MAPK und ERK kinase), MAPK und weiteren Proteinen, welche in die Proteintranslation involviert sind [54, 60].

Diese Vorgänge resultieren in einer global gesteigerten zellulären Proteinsynthese. Zudem ist postangioplastisch ein protrahierter Anstieg der MAPK-Aktivität zu verzeichnen, welcher die auftretende Modulation des Phänotyps widerspiegelt. MAPK phosphoryliert Transkriptionsfaktoren, welche für die Expression von Genen bei Zellwachstum und Proliferation ausschlaggebend sind, wie die high-molecular-weight Isoform von Caldesmon. Reusch et al. [195] konnten darüber hinaus zeigen, dass eine Aktivierung der ERK-1/ERK-2 und JNK/SAPK abhängig ist von der Zusammensetzung der

extrazellulären Matrix und dass diese Enzyme sich auf derselben extrazellulären Matrix unterschiedlich verhalten.



**Abb. 4** Mechanotransduktion in vaskulären glatten Muskelzellen. Mechanische Dehnung wirkt auf  $\alpha$ - $\beta$ -heterodimere Integrine. Damit verbunden ist möglicherweise eine Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Membrantyrosinkinasen wie c-Src. Aktivierte c-Src wiederum stimuliert die FAK Autophosphorylierung, welche die Anordnung des Shc-Grb2-Sos-Komplexes ermöglicht und damit letztendlich die MAPK aktiviert. Über S6kinase (S6k) könnte die Proteinsynthese stimuliert werden. Alternativ könnten mechanische Kräfte über unbekannte Dehnungsrezeptoren („?“) das Renin-Angiotensin-System stimulieren. Über die konsekutive Produktion von Angiotensin II (All) könnten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beeinflusst werden. Die autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren wie das PDGF kann möglicherweise Tyrosinkinase-Rezeptoren (R-TK) aktivieren (nach [139]).

**Wachstumsfaktoren.** Mit den bereits erwähnten möglichen Faktoren, welche in der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen infolge mechanischer Dehnung involviert sind, ist der Einfluss von Wachstumsfaktoren bereits impliziert. Wachstumsfaktoren, welche nachgewiesenermaßen das Wachstum der vaskulären glatten Muskelzellen in Kultur stimulieren sind PDGF, FGF, EGF, IGF-I und Neuropeptide.

Aktivierte vaskuläre glatte Muskelzellen können selbst einige dieser Mitogene synthetisieren. Dies läßt einen autokrinen Mechanismus als eine mögliche Variante für die Beteiligung vermuten. Eine Verletzung des Gefäßes resultiert in einer Aktivierung von PDGF-alpha- und -beta-Rezeptoren. Dies korreliert eng mit neointimaler Formation [1, 100, 219]. Alle Isoformen von PDGF (PDGF AA, AB und BB) sind in vitro in der Lage die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen sowie deren Migration zu stimulieren. Thrombozyten sind die Hauptproduzenten von PDGF-BB in vivo, wohingegen in restenostischen und atherosklerotischen Läsionen PDGF-AA produziert wird. Zugleich exprimieren vaskuläre glatte Muskelzellen PDGF-A-Rezeptoren, diese können durch PDGF-AA- und -AB-Isoformen stimuliert werden, nicht jedoch durch PDGF-BB. Es zeigt sich, dass im Rahmen arterieller Verletzungen vaskuläre glatte Muskelzellen die Expression des PDGF-A-Rezeptorgens steigern, wohingegen die des PDGF-B vermindert wird [8, 77, 78, 155, 175]. Wilson et al. wiesen die intermediäre Aktion von PDGF-A im Rahmen der durch zyklische mechanische Dehnung (Flexcell-Platten, bis 20 kPa, 48 h) gesteigerten DNA-Synthese vaskulärer glatter Muskelzellen neonataler Ratten nach [245]. Das von den vaskulären glatten Muskelzellen sezernierte PDGF-A führt über einen autokrinen Mechanismus zur gesteigerten DNA-Synthese. In vivo kommt der parakrinen Sekretion von

PDGF durch Endothelzellen, Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen und Fibroblasten zusätzlich Bedeutung zu.

Die Exposition der Gefäßwand gegenüber bFGF führt zu einer übermäßigen neointimalen Proliferation [50, 63, 140, 163]. Endothelin-converting Enzym-1 zeigt nach Ballondilatation eine erhöhte Aktivität, diese resultiert in einer Endothelin-vermittelten Stimulation der Migration vaskulärer glatter Muskelzellen [61, 157]. Die Expression von ACE ist bei verschiedenen Zellen reaktiv erhöht (Endothelzellen, intimale Muskelzellen und Makrophagen, [172]), so dass vermehrt Angiotensin II freigesetzt wird. Angiotensin II ist in der Lage die Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zu stimulieren. In Abwesenheit anderer Mitogene führt Angiotensin II lediglich zur Hypertrophie, nicht zur Proliferation [51, 179]. Dies spiegelt die proliferativen und antiproliferativen Effekte Angiotensin II-stimulierter Zytokine wieder. PDGF-AA und Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) werden beide Angiotensin II-stimuliert von Muskelzellen synthetisiert. PDGF-AA stimuliert, TGF- $\beta$  inhibiert die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Die Rolle von IGF-I bei der Pathogenese von Restenosen liegt bei gesteigerter Produktion von IGF-I durch Stimulation nahe [55, 56, 74]. Dies könnte ebenfalls in einen autokrinen Kreislauf münden. Weiterhin bestätigt dies die klinische Beobachtung erhöhter Restenoseraten bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, eine Erkrankung, welche durch erhöhtes Plasmainsulin und IGF-I-Spiegel charakterisiert ist [26, 36, 84]. Wichtig ist im Zusammenhang mit Restenosen nach PTCA die erhöhte TGF- $\beta$  Expression [147, 167]. Zellproliferation kann somit schon bei niedrigen TGF- $\beta$  Konzentrationen stimuliert werden, jedoch ist bei hohen Konzentrationen eine Hemmung der Proliferation zu verzeichnen. TGF- $\beta$  stimuliert zudem die Matrixproduktion [40, 162].

Die Wachstumsfaktoren wirken nicht unabhängig voneinander, sondern in Form einer zusammengesetzten Aktionsweise. So wird z.B. aufgrund verschiedener Experimente durch Calara et al. [30] an vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten vermutet, daß FGF und PDGF-A erst durch ihr Zusammenwirken eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen hervorrufen. Abgesehen von der Synthese der Wachstumsfaktoren durch die vaskulären glatten Muskelzellen selbst (z.B. Cheng et al. [42]; eng an die Amplitude mechanischer Dehnung gekoppelte Freisetzung von FGF-2), wird hierbei von einer Freisetzung aus geschädigten Zellen (durch PTCA, anderweitige mechanische Belastung) ausgegangen. So lässt sich für freigesetztes FGF der wachstumstimulierende Effekt zum einen durch direkte unmittelbare Aktivierung der mitogenen Signalkaskade erklären, zum anderen über einen indirekten anhaltenden Effekt. Dieser wird durch die FGF-induzierte Stimulation der PDGF-A Produktion vermittelt. Die Aktivierung der endogenen PDGF-A Produktion, welche in einer Zunahme der Protein- und DNA-Synthese mündet, kann ebenso durch die Faktoren Angiotensin II, Interleukin-1 $\beta$  und TGF- $\beta$  erfolgen. Diesem Prozeß wird unter anderen in der Entwicklung von Restenosen eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Laut der Untersuchung von Feng et al. [76] mittels eines DNA-Microarray von 5000 Genen führt bei vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta des Menschen physiologische zyklische mechanische Dehnung (biaxial, 1, 4 und 9% Dehnung, 12 bzw. 24 h) zu einer gesteigerten Transkription der Gene für Cyclooxygenase-1, Tenascin-C (ein Hexamere bildendes Protein der extrazellulären Matrix) und

Plasminogenaktivator-inhibitor-1. Die Transkription ist vermindert bei Matrix-Metalloproteinase-1 und Thrombomodulin. Im Collagenmetabolismus spielen eine Vielzahl an Metalloproteinasen (MMP1-MMP9) eine Rolle. Sie verdauen fibrilläres Collagen, Gelatin, Elastin und Proteoglykane der extrazellulären Matrix. Diese Enzyme werden von vaskulären glatten Muskelzellen, Makrophagen und Fibroblasten produziert. Ihre Aktivität wird durch ein System an Proteasen und Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen (TIMP) reguliert [17, 54, 60, 212, 225]. Die beschriebene Induktion der Cyclooxygenase kann zu einer Synthese von Prostacyclin, einem Vasodilatator, oder zu Prostaglandin E2, einem Inhibitor der Proliferation glatter Muskelzellen, führen.

Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, dass physiologische zyklische mechanische Dehnung einen antiproliferativen Effekt besitzt.

**Inflammatorische Zellen.** Zunehmend wird die Beteiligung inflammatorischer Zellen im Rahmen der beschleunigten Arteriopathie diskutiert. Es wurde festgestellt, dass nach PTCA von vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen der atherosklerotischen Läsion Sauerstoffradikale und andere Oxidantien freigesetzt werden [201]. Die zelluläre Exposition auf Sauerstoffradikale aktiviert den nukleären Faktor-kappa-B-Regulierungskomplex [27]. Dieser Komplex triggert die Transkription von Genen, welche für bestimmte Leukozyten-Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen [233] codieren. Matrix-Metalloproteinasen beeinflussen den Stoffwechsel der extrazellulären Matrix, so dass vaskuläre glatte Muskelzellen die umgebende extrazelluläre Matrix verdauen können und so die Migration von der Media zur Intima möglich wird [42]. In Läsionen beschleunigter Arteriopathie können aktivierte Elemente des Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten und T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. So können oxidierte LDL die Aktivierung von T-Zellen mittels Makrophagen veranlassen. Endotheliale und vaskuläre Muskelzellen der Läsionen produzieren zusätzlich zu den Klasse I MHC Antigenen (HLA-A, B und C) Klasse II MHC Antigene (MHC-DR). Dies lässt auf eine direkte Interaktion mit T-Zellen schließen. Zudem exprimieren sie ICAM-1 und das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül-1 [170, 189]. Beide Rezeptoren sind für die Vermittlung der Adhäsion von Lymphozyten und Makrophagen an Endothelzellen verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von ICAM-1-Antikörpern die intimale Hyperplasie nach Ballonangioplastie aufgehalten werden kann [118, 253]. Patienten mit frühen Restenoseereignissen haben eine signifikant erhöhte ICAM-1 Plasmakonzentration.

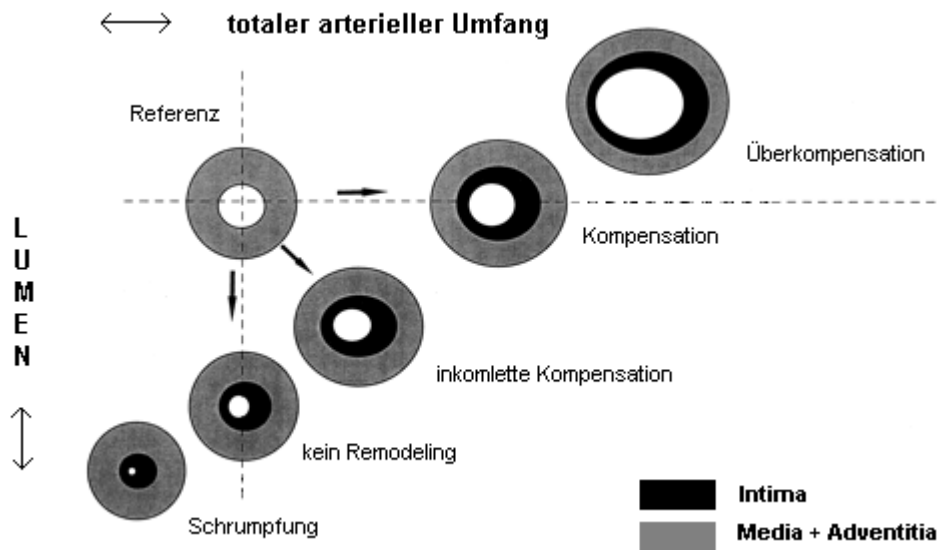
Lymphozyten und Makrophagen sind in der Lage eine Vielzahl an Zytokinen wie Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 zu produzieren; diese stimulieren die zelluläre Proliferation [141]. Diskutiert wird zudem, dass inflammatorische Stimuli nach PTCA die Expression neutrophiler Adhäsionsmoleküle fördert. Dies betrifft vor allem Mac-1 an der Oberfläche polymorphonukleärer Leukozyten. Mit Knock-out Mäusen ohne Mac-1-Gene konnte die Beteiligung von Mac-1 an der neointimalen Bildung nach Angioplastie aufgezeigt werden [110, 217]. Auch für das Adhäsionsmolekül E-selectin, welches lediglich auf aktiviertem Endothel vorgefunden wird, konnte eine Beteiligung am restenotischen Prozess nachgewiesen werden [12, 16].

**Adventitia.** Obwohl sich die Forschung auf die Rolle der Deendothelialisierung im Rahmen der Restenose konzentriert, haben Studien gezeigt, dass Angioplastie auch auf die äusseren Anteile der Media und die Adventitia wirkt [11]. Nach Verletzungen aufgrund Überdehnung bei PTCA zeigt sich eine gesteigerte adventitielle Proliferation [213]. Die Adventitia von Koronararterien hat eine feine Mikrovaskularisierung, die Vasa vasorum, welche die Versorgung der Zellen der Koronararterien mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet. Die koronare Atherosklerose ist verbunden mit einer Vermehrung an Vasa vasorum der Adventitia und im Bereich der Plaques. Die erhöhte Dichte an neu gebildeten Vasa vasorum ist proportional zur Gefäßstenose [135]. Diese Reaktion der Adventitia könnte eine Rolle in der Pathogenese neointimaler Hyperplasie und Restenose spielen [140].

**Apoptose.** Eine weitere Rolle im Rahmen von Gefäßveränderungen, beispielsweise im Rahmen von Restenosen, wird der Apoptose zugeschrieben. Apoptose wird definiert als nichtentzündlicher Mechanismus des programmierten Zelltodes und der Elimination. Hohe Spiegel an Stickstoffmonoxid haben einen proapoptotischen Effekt. Die endogene Produktion wird über eine induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase gesteuert. So könnte eine Überproduktion an Stickstoffmonoxid eine Kompensation der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen bewirken [112]. Eine verlangsamte Reendothelialisierung konnte in Zusammenhang mit TNF- $\alpha$  beobachtet werden, dies wurde auf eine induzierte Apoptose der Endothelzellen zurückgeführt [220, 221].

**Remodeling** bei beschleunigter Arteriopathie. Remodeling ist ein struktureller Wandel des totalen arteriellen Gefäßdurchmessers im Rahmen der Atherogenese oder als Antwort auf Ballonangioplastie. Letztenendes resultiert dies in einer Vergrößerung oder Verringerung des totalen arteriellen Gefäßdurchmessers (**Abb.5**). Dies kann den Effekt von plaque- oder neointimabedingten Veränderungen des Gefäßlumens kompensieren oder verstärken.

Nach Ballonangioplastie liegt in humanen Koronararterien meist eine Verringerung des Gefäßdurchmessers vor. 60-70% des Lumenverlustes werden Remodeling zugeschrieben [120, 121, 135, 159, 160, 186, 188]. 75% der Rigidität der Gefäßwand wird durch Collagen bestimmt, so dass es nahe liegt, dass Veränderungen des Collagenmetabolismus vorhanden sind. Strauss et al. fanden eine gesteigerte Collagensynthese nach Ballonangioplastie der rechten Iliakalarterie von Kaninchen mit einem Maximum nach einer Woche [225]. Wie bereits ausgeführt, wird der Collagenmetabolismus durch eine Vielzahl an Matrixmetalloproteinasen beeinflusst. Nach Ballonangioplastie fand sich eine gesteigerte Aktivität einiger Metalloproteinasen [225]. Bisher konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen Collagenmetabolismus und Remodeling hergestellt werden. Nach Stenting scheint kein Remodeling aufzutreten [97, 133, 180, 187].



**Abb. 5** Arteriell Remodeling. Die Ansammlung von Plaque oder Bildung einer Neointima in Arterien kann ohne Verminderung des Lumens (Kompensation) und sogar mit Zunahme des Lumens (Überkompensation) einhergehen. Im Fall einer inkompletten Kompensation oder bei fehlendem Remodeling kommt es durch Plaque oder Intimahyperplasie zu einer Verminderung des Gefäßlumens. Ein Teil der Arterien schrumpft und führt so zusätzlich zu Plaque und Intimahyperplasie zu einer weiteren Verminderung des Gefäßlumens (nach [188]).

## 1.2. Aufgabenstellung

Da der Einfluss mechanischer Dehnung sowohl in physiologischer als auch in pathophysiologischer Hinsicht in seiner Bedeutung für zahlreiche Aspekte der Kardiovaskularmedizin maßgeblich ist, sollte dieser untersucht werden. Nach wie vor wird der Einfluss mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen kontrovers diskutiert. Die zahlreichen zum Teil bereits erwähnten Studien weisen auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen aus.

Trotz zum Teil sehr unterschiedlicher angelegter Versuchsparameter hinsichtlich der Dehnungsrhythmizität, -amplitude und -dauer sowie der Messintervalle und der Versuchsdauer wird tendenziell bei mehrheitlicher Verwendung eines Hochdruckmodells im Sinne unphysiologischer inhomogener Dehnung eine dehnungsinduzierte Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen beschrieben. Der Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung – zumal an humanen vaskulären glatten Muskelzellen – wurde dagegen bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht. Hierbei zeigte sich ein antiproliferativer Effekt physiologischer hämodynamischer Kräfte.

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde das Augenmerk alleinig auf den Einfluss von zyklischer mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen in Abwesenheit sämtlicher zusätzlicher äußerer Stimuli gelegt.

Zwei Fragestellungen sollten untersucht werden.

Die erste Fragestellung bezog sich auf den Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Um einen relevanten medizinischen Bezug herzustellen - zumal der Einfluss physiologischer Dehnung bisher am Tiermodell untersucht worden war - wurden primäre vaskuläre glatte Muskelzellen des Menschen verwendet. Es handelt sich dabei um primäre Zellen aus der Aorta (2,5 Monate alter Spender) und um primäre Zellen aus einer Koronararterie (48 Jahre alter Spender). Die Zellen wurden auf flexiblen Bioflexmembranen kultiviert, um sie dann einer zwei- bis dreitägigen homogenen rhythmischen Dehnung (0,5 Hz) um 5% zu unterziehen. Die Zellen wurden auf Veränderungen des Wachstums und der Vitalität hin untersucht. Veränderungen des Wachstums wurden über die Bestimmung der DNA-Synthese sowie der Zellzahl detektiert. Veränderungen der Vitalität wurden über eine Bestimmung der metabolischen Aktivität, der Apoptose sowie des Zelltodes mittels LDH-Messung gesichert.

Die zweite Fragestellung bezog sich auf den Einfluss unphysiologischer Überdehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Von Interesse war hierbei, ob sich die Situation nach erfolgter PTCA in einem Zellkulturmodell nachstellen lassen würde. Dazu wurden nach initial viermaliger Dehnung bis 15% über einen Zeitraum von 30 Tagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Dehnung Veränderungen des Wachstums und der Vitalität mit denselben Methoden gemäß der ersten Fragestellung untersucht. Auch hier wurde zum Ausschluss eines Nekrose- oder dehnungsbedingten Zelltodes parallel die LDH-Aktivität bestimmt.



## 2. Materialien und Methoden

---

### 2.1. Materialien

Die verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Firma Sigma: fetal calf Serum (FCS); bovine serum albumin (BSA), Fraction V; Insulin-Transferrin-Selenite Lösung (ITS); „LDH optimized Lactat Dehydrogenase EC 1.1.1.27 UVTest“ Kit.
- Boehringer Mannheim: „Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric)“ Kit; „Cell Proliferation reagent Wst-1“; „Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>“ Kit; „In situ cell proliferation kit,AP“.
- Gibco BRL: Kulturmedien und Reagenzien
- Flexcell Corp. (MacKeespot, MA, USA): Bioflex Collagen-I-Membranen, Flexcell Membranen und Flexercell strain unit
- Greiner: Plastikwaren wie Kulturflaschen, Einmalpipetten u.a.
- Nalgene: Gefrierröhrchen

Alle Materialien wurden über den Handel in größtmöglichem Reinheitsgrad bezogen.

#### - Primäre Zellen

Die primären Zellen wurden über CellSystems, St. Katharinen, Deutschland bezogen. Die Zellen wurden in der Passage 3 geliefert. Es handelte sich dabei um zwei verschiedene primäre Zellen:

- vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Aorta eines 2,5 Monate alten männlichen Europäers (hAOSM; Strain No.: 2634, Lot. No.: 13980); hAOSM Zellen wurden von Passage 6 bis 11 verwendet.
- vaskuläre glatte Muskelzellen aus einer Koronararterie eines 48 Jahre alten männlichen Europäers (hCASM; Strain No.: 5282, Lot. No.: 7F0654); hCASM Zellen wurden von der Passage 5 bis 7 verwendet.

#### 2.1.1. Zellkultur

Voraussetzung für die erfolgreiche Zellkultivierung ist eine absolut korrekte und sterile Arbeitsweise, um Kontaminationen der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Die Arbeiten wurden unter Sterilbänken durchgeführt. Diese waren mit einem vertikalen Luftfiltersystem ausgestattet.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 5-8ml Medium im Brutschrank (Heraeus, Osterode). Dieser gewährleistete eine wassergesättigte Atmosphäre bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> - Gehalt von 5%. Das Medium wurde jeden zweiten oder dritten Tag gewechselt.

## 2.1.2. Zellkulturmedien

### - Zellkultur

hAOSM Zellen wurden mit Vollmedium von 5%FCS (DMEM, 1000mg/l Glucose; 0,1% Gentamicin/Amphotericin) vermehrt.

Bei hCASM Zellen erfolgte die Zellkultur in SMBM (Smooth muscle cell basal medium, CC-3181, Clonetics), welches mit SmGM (Smooth muscle Growth medium Bullet Kit, CC-4149) versetzt wurde. Das Vollmedium enthielt dann 0,1% Insulin (5 mg/ml, bovine, CC-4021); 0,2% hFGF-B (human recombinant Fibroblast Growth factor, 1µg/ml, CC-4068); 0,1% Gentamicin-sulfat (50mg/ml), Amphotericin (50µg/ml, CC-4081); 0,1% hEGF (human recombinant Epidermal Growth factor, 0,5µg/ml, CC-4230); 5%FBS (Fetal bovine serum, CC-4102).

### - Ruhemedien

Das serumarme Ruhemedium, in welchem hAOSM Zellen in der Regel zwei bis drei Tage vor dem Beginn der zyklischen mechanischen Dehnung in ihrem Wachstum arretiert wurden, beinhaltete: 0,5%FCS; 1%ITS (5µg/ml Insulin, 5mg/ml Transferrin, 5ng/ml Selenite); 0,1% Gentamicin/Amphotericin; in DMEM.

hCASM Zellen wurden entweder zwei bis drei Tage vor dem Beginn der Dehnung mit serumfreiem Medium (1%ITS; 0,1% Gentamicin/Amphotericin in DMEM) in ihrem Wachstum arretiert oder sie erhielten weiterhin Vollmedium.

Anfangs wurden Wachstumsreihen der hAOSM Zellen untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an FCS (1%, 2%) eingesetzt, sonst entsprach die Zusammensetzung des Mediums der des serumarmen Ruhemediums.

## 2.1.3. Passagieren der Zellen

Für weitere Passagen der Zellen wurde das Kulturmedium abgezogen und die Zellen wurden daraufhin mit 3,5ml PBS gespült. Die PBS-Lösung (Phosphat gepufferte Salzlösung) enthielt NaCl 137,9mmol/l; KCl 2,7 mmol/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 6,4mmol/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47mmol/l in dd H<sub>2</sub>O. Sie hatte einen pH-Wert von 7,4. Durch den Waschvorgang mit PBS wurde das in der Zellkulturflasche verbliebene Serum entfernt, welches sonst Trypsin in seiner Wirkung inaktiviert.

Im Anschluß daran wurde 3ml Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben und unter mikroskopischer Kontrolle bei Raumtemperatur gewartet bis sich die Zellen abgelöst hatten (3-5 min). Zur Inaktivierung wurde die Zellsuspension mit 3ml Trypsininhibitor versehen. Nach Zugabe von 4ml PBS wurde die Mischung in einem 15ml Polystyrolgefäß 3 Minuten lang bei 200G und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Zelleniederschlag wurde in 10ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe von NEUBAUERkammern unter dem Mikroskop (Hemozytometer, Zählung von je 6 Quadranten oben und unten).

Nach Aussäen der Zellen auf Collagen-I-beschichteten Bioflexmembranen mit einer Zellzahl von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden mit der verbliebenen Zellsuspension ein bis zwei Zellkulturschalen beschickt.

Das Medium wurde sowohl bei den Bioflexzellkulturplatten als auch bei den Zellkulturflaschen am nächsten Tag ausgetauscht. Kontrolliert wurde dabei die Morphologie der Zellen, die Zellzahl und der Anteil der ausgesäten Zellen, welcher auf den Bioflexmembranen angewachsen war. Danach wurde die Passage um eins erhöht.

#### **2.1.4. Einfrieren und Auftauen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsinlösung abgelöst und daraufhin zentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 0,8ml Einfriermedium (Cell Culture Freezing Medium DMSO in DMEM und FCS (Gibco)) resuspendiert und in Gefrier Röhrchen (Nalgene, Nidderau) überführt. Die Gefrier Röhrchen wurden bei -80°C aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Gefrier Röhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Die Zellen wurden in ein 15-ml-Polystyrolgefäß überführt und mit 5%FCS Medium gewaschen. Nach drei Minuten dauernder Zentrifugation bei 200g wurden die Zellen in 7ml Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag ausgetauscht. Die Passagennummer wurde nach dem Auftauen um eins erhöht.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zyklische mechanische Dehnung der Zellen**

#### **- Flexercell strain unit**

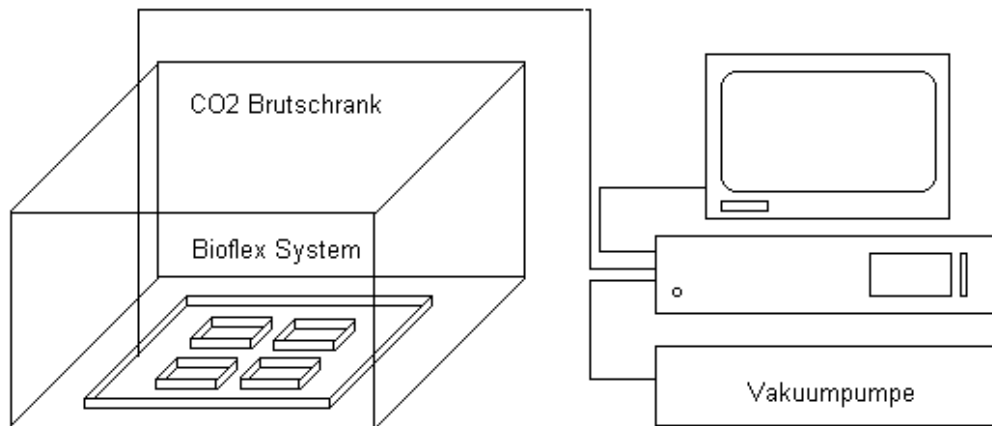
Die Flexercell strain unit (Flexcell Corp., MacKeespot, MA, USA; **Abb. 6**) erlaubt dem Untersucher auf Zellen in Kultur eine definierte und kontrollierte Dehnung auszuüben. Sie besteht aus einer computer-kontrollierten Vakuumeinheit.

Für den Dehnungsvorgang wurden die Bioflexzellkulturplatten mit einer Einfassung aus Gummi abgedichtet und in eine Grundplatte eingelegt. Dabei kamen die einzelnen Silikonmembranen der Bioflexplatten auf je einem der in der Grundplatte verankerten Plastikstutzen (sog. loading post) zu liegen.

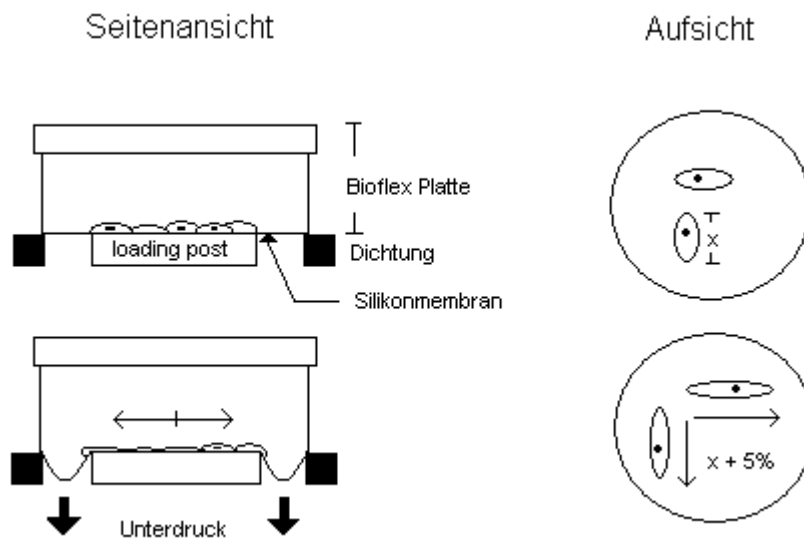
Mit einer Vakuumpumpe wurde Unterdruck unter den flexiblen Silikonmembranen angelegt. Der Unterdruck wurde durch ein Kontrollmodul reguliert.

Durch den angelegten Unterdruck wurden die flexiblen Membranen über den Plastikstutzen entlang nach unten gezogen (**Abb. 7**). Die dehnungsbedingte Oberflächendeformation der flexiblen

Membranen wurde von den Zellen, welche auf den flexiblen Membranen angewachsen waren, nachvollzogen. Der angelegte Unterdruck war somit maßgeblich für den Grad der Dehnung. Die Dehnung der Zellen entsprach einer homogenen biaxialen Dehnung mit isotropem Charakter.



**Abb. 6** Die Flexercell strain unit. Eine computer-kontrollierte Vakuumeinheit, an welche das im CO<sub>2</sub> Brutschrank befindliche Bioflex System angeschlossen wird.



**Abb. 7** Die Bioflexzellkulturplatten in Seitenansicht und Aufsicht in Ruhe und unter Dehnung. Infolge des angelegten Unterdrucks werden die flexiblen Silikonmembranen über die in der Grundplatte verankerten Plastikstützen (sog. loading post) gezogen. Die auf den Silikonmembranen angewachsenen Zellen vollziehen eine gleichmäßig isotrope Dehnung von maximal 5%.

Die experimentellen Bedingungen wurden wie folgt festgelegt:

5% Elongation (-25 kPa); eine Frequenz von 0,5 Hz (Dehnung für 1 Sekunde gefolgt von einer Relaxation für 1 Sekunde); die Dehnung erfolgte in einem Inkubator (37°C, bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%).

hAOSM Zellen wurden für 72 Stunden zyklisch gedehnt.

hCASM Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden zyklisch gedehnt. Für die hCASM Zellen wurde eine um 24 Stunden kürzere Dehnungsdauer gewählt, da die hCASM Zellen bereits in Kultur trotz Vollmedium ein sehr langsames Zellwachstum zeigten und damit unter mechanischer Dehnung über 72 Stunden ungewollt eine verminderte Lebensdauer resultieren könnte.

Für das Restenosemodell mit hAOSM Zellen:

15% Elongation (bis -80 kPa); viermalig 120 Sekunden lang, jeweils gefolgt von einer Relaxation für 30 Sekunden.

### **- Bioflexzellkulturplatten**

Für die Dehnung wurden die Zellen gezählt und mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den flexiblen Silikonmembranen ausgesät. Es wurden Collagen-I-beschichtete Bioflexmembranen verwendet. Die Bioflexzellkulturplatte (Flexcell Corp.) besteht aus sechs mit Silikonmembranen bezogenen Aussparungen (sog. Well). Diese sog. Well haben jeweils eine Fläche von 10cm<sup>2</sup>.

Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen wurden für die nächsten zwei bis drei Tage auf serumarmes Ruhemedium gesetzt.

Vor dem geplanten Dehnungsvorgang wurde das Medium gewechselt.

## **2.2.2. Bestimmung der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität mit Hilfe colorimetrischer Methoden**

### **- Bestimmung der DNA-Synthese mit dem „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ kit**

Die DNA-Synthese wurde mit dem „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ kit (Boehringer Mannheim) quantifiziert. Während der Inkubation mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) wird das Pyrimidinanalog BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die antikörpervermittelte Substratreaktion läßt dann eine Messung der Absorption des entstehenden farbigen Reaktionsproduktes zu. Der Farbumschlag und damit die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit dem Ausmaß der DNA-Synthese in den Zellen.

### **- Bestimmung der metabolischen Aktivität mit dem „Cell Proliferation reagent Wst-1“ kit**

Mit Hilfe von Wst-1 (Boehringer Mannheim), ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz (Natriumsalz von 4-[3-(4iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat), wurde die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Wst-1 ist ein Tetrazoliumsalz ähnlich MTT, XTT und MTS.

Das Tetrazoliumsalz Wst-1 wird durch metabolisch aktive Zellen gespalten. Es entsteht ein rotes lösliches Formazanprodukt. Eine Rolle bei der Reduktion von Wst-1 spielen zelluläre Enzyme (Reduktasen und Reduktionsäquivalente) wie mitochondriale Dehydrogenasen, jedoch ist in Abwesenheit dieser Enzyme eine Reduktion durch NADH und NADPH möglich, wenn

Elektronenakzeptoren wie Phenazin-methosulfat zur Verfügung stehen. Desweiteren scheinen Superoxide an einer Reduktion von Wst-1 beteiligt zu sein [20].

### **- Durchführung der Messungen**

Wst-1- und BrdU- Messungen wurden jeweils in denselben Experimenten durchgeführt.

Die wachstumsarretierten Zellen wurden zuerst für 24 Stunden gedehnt.

Bei den hAOSM Zellen wurde dem serumarmen Ruhemedium für weitere 48 Stunden Dehnung 10µM BrdU hinzugegeben (insgesamt 72 Stunden Dehnung).

Bei den hCASM Zellen wurde für weitere 24 Stunden Dehnung 10µM BrdU hinzugegeben (insgesamt 48 Stunden Dehnung).

Die Zugabe von Wst-1 erfolgte zwei Stunden vor dem Ende der Dehnung. Sowohl bei hAOSM als auch bei hCASM Zellen wurde vor Zugabe von je 150µl Wst-1 pro Well das Medium zur Hälfte abgenommen. Nach Beendigung der Dehnung wurde die Absorption des Wst-1 Spaltproduktes, eines Formazanfarbstoffes, mit einem Spectrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) bei Wellenlänge 450 nm gemessen. Die Referenzmessung zur Bestimmung des Hintergrundes wurde bei 690 nm vorgenommen. Letzterer Wert wurde von der Absorption bei 450 nm subtrahiert.

Bei jedem durchgeführten Experiment diente Medium, welches mit derselben Menge Wst-1 und BrdU inkubiert worden war, als Leerwert. Der Leerwert wurde entsprechend in die Berechnung der endgültigen Werte miteinbezogen.

Für die Bestimmung der BrdU-Inkorporationsrate wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums zuerst durch Inkubation mit 1 ml FixDenat (Boehringer Mannheim) pro Well für 30 Minuten fixiert und denaturiert. Die Denaturierung der DNA ermöglicht die Zugänglichkeit des inkorporierten BrdU für die Aufdeckung über den Antikörper. Die Zellen wurden für weitere 30 Minuten mit 3 bis 4ml einer Lösung von BSA (3%) in PBS inkubiert (1,5 g BSA in 50ml PBS). Im Anschluss daran wurde einmal mit PBS gespült.

Die Zellen wurden dann mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper (Boehringer Mannheim) inkubiert. Die Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper binden an BrdU, welches in die neu synthetisierte, zelluläre DNA eingebaut wurde. Hierfür wurde der Antikörper mit der mitgelieferten Antikörperverdünnungslösung auf 1:100 verdünnt. Davon wurden 750µl pro Well pipettiert. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für die Dauer von 60 Minuten. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 30 Minuten vier- bis fünfmal mit PBS gewaschen. Dann wurde von dem Substrat der Peroxidase, Tetramethylbenzidin (TMB, Boehringer Mannheim), 1ml pro well zugegeben. Die Zellen wurden damit für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Die Peroxidase setzt Tetramethylbenzidin zu einem blauen Farbstoff um. Die Reaktion wurde unter Zugabe von 300µl 1molarer HCl gestoppt. Dabei erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Die Messung der Absorption des gelben Farbproduktes erfolgte mittels des Spectrophotometers bei 450 nm. Der Hintergrund wurde bei 690 nm bestimmt und von der Absorption bei 450 nm subtrahiert. Als Leerwert diente ein Well ohne Zellen, mit welchem unter den entsprechenden genannten Bedingungen wie mit den übrigen verfahren worden war.

### **2.2.3. Bestimmung der Zellzahl von Zellen in S-Phase mit dem „In situ cell proliferation kit, AP“**

Die Bestimmung der Zellen in S-Phase erfolgte mit dem „In situ cell proliferation kit, AP“ (Boehringer Mannheim). Dabei wurde die Anzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen, welche proliferierenden Zellen entsprechen, und die Gesamtzellzahl durch Zählen unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

Dazu wurden wachstumsarretierte Zellen über die vorgesehene Zeit gedehnt und mit 10µM BrdU inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd 20 Minuten lang fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren und die DNA abzusetzen, wurden sie mit 4 mol/l HCl 20 Minuten lang inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Waschpuffer, welcher 0,5% BSA und 0,1% TWEEN 20 (PolyoxyethylenesorbitanMonolaurate) in PBS enthält, gewaschen bis pH-Neutralität erreicht wurde.

Über Nacht wurden sie mit einem Alkaline-phosphatase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper, welcher in zuvor genanntem Waschpuffer 1:15 verdünnt wurde, inkubiert (500µl/Well). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS folgte am Tag darauf die zweieinhalbstündige Inkubation mit dem „Fast red“ Substrat für die Alkaline Phosphatase (Boehringer Mannheim). Die Zellkerne der Zellen in der S-Phase, welche BrdU inkorporiert haben, färbten sich rot.

Zur Bestimmung der Zellen in S-Phase wurden die rotgefärbten Zellkerne unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 10x10 gezählt (ein Gitterquadrat beschreibt eine Fläche von 1mm<sup>2</sup>).

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden dann alle Zellen bei einer Vergrößerung von 10x10 innerhalb der vom Gitter beschriebenen Fläche von 1mm<sup>2</sup> gezählt. Nachfolgend wurde von mm<sup>2</sup> auf cm<sup>2</sup> umgerechnet.

Die Zahl der Zellen in S-Phase pro cm<sup>2</sup> durch die Gesamtzellzahl pro cm<sup>2</sup> dividiert und mit 100 multipliziert ergab den Prozentsatz der Zellen in Replikation, welcher dem Mitoseindex entspricht.

### **2.2.4. Bestimmung der Aktivität der Laktatdehydrogenase mit dem „LDH optimized Lactatdehydrogenase EC 1.1.1.27 UV Test“**

Um Zellschädigung und nekrosebedingten Zelltod einschätzen zu können, wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt. Verwendet wurde dazu der „LDH optimized Lactatdehydrogenase UV Test“ (Sigma Diagnostics).

LDH ist ein im Zytoplasma vorkommendes Enzym vom Typ der Oxidoreduktasen. LDH tritt bei Zellschädigung aus den Zellen aus. Die Messung von LDH im Überstand der Zellen ist somit ein Maß für Zelltod.

Das zugrundeliegende Testprinzip ist die Reaktion  $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Laktat} + \text{NAD}^+$ . Die verwendeten Mengen richteten sich nach der Messung im Sättigungsbereich und der damit bedingten

Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Die LDH-Aktivität wurde kinetisch über die Abnahme der Absorption von NADH mittels Spectrophotometer bei 340 nm bestimmt ( $DE/min \times 4127 = [LDH] U/l$ ).

Für die Messung wurde ein Teil des Zellüberstandes in 15ml-Röhrchen überführt. Die Proben wurden für 5 Minuten in einem Ultraschallwasserbad behandelt. Es wurde folgende Reaktionslösung angesetzt: 18mmol/l NADH und 0,6mmol/l Pyruvat in 50mmol/l Phosphatpuffer; mit einem pH-Wert von 7,5. Davon wurde 1 ml in Küvetten gegeben. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 40µl der jeweiligen Probe zur Reaktionslösung gestartet.

30 Sekunden nach Zugabe der Probenmenge wurde der erste Extinktionswert abgelesen. Weitere Extinktionswerte folgten 60, 120, 180 Sekunden nach Probenzugabe.

### **2.2.5. Bestimmung der Apoptoserate mit dem „Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>“ kit**

Apoptose ist neben Zeiosis und Kondensation des Zytoplasmas durch die Aktivierung von endogenen Endonukleasen gekennzeichnet. Diese spalten  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -abhängig doppelsträngige DNA an der zugänglichen internukleosomalen Linker-Region. Dabei entstehen Mono- und Oligonukleosomen. Die DNA der Nukleosomen selbst ist durch Komplexe mit Kern-Histonen vor der Spaltung durch Endonukleasen geschützt. Die Detektion der histon-assoziierten DNA-Fragmente ist ein Maß für Apoptose.

Zur Bestimmung der Apoptose mittels zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten wurde der „Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>“ kit (Boehringer Mannheim) verwendet.

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die gedehnten Zellen und die Zellen der Kontrolle unter Zugabe von 500µl „Lysispuffer“ (Boehringer Mannheim) über einen Zeitraum von 30 Minuten gelöst. Die Zellsuspension wurde daraufhin vorsichtig in Röhrchen (Eppendorf) pipettiert und bei 200g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurden Zellkerne und unfragmentierte hochmolekulare DNA entfernt. Je 20µl des Zellüberstandes (zytosolische Fraktion) wurden in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt.

Es wurde eine Lösung aus Inkubationspuffer; Anti-Histon-Biotin (ein Biotin-markierter monoklonaler Antikörper); Anti-DNA-POD (ein Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper) hergestellt. Mit je 76µl dieser Lösung wurde der Zellüberstand für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde die Mikrotiterplatte über einen Zeitraum von 15 Minuten fünfmal mit Inkubationspuffer gewaschen. Dann wurden die Proben mit 100µl „ABTS“, einem Substrat der Peroxidase, für 30 Minuten inkubiert.

Die Absorption, der sich entwickelnden grünen Farbe, wurde photometrisch (Dynatech MR 5000) bei 410 nm Wellenlänge gemessen. Als Referenzwellenlänge diente 490 nm. Die Änderung der Absorption bei gedehnten Zellen relativ zu der bei ungedehnten Kontrollzellen wurde rechnerisch ermittelt.



### **2.3. Datenwiedergabe und Statistik**

Ein repräsentatives Experiment wurde auf einer Bioflexzellkulturplatte durchgeführt, dabei dienten zwei bis drei Well der Dehnung und zwei bis drei Well der Kontrolle, ein Leerwert wurde stets auf derselben Platte mitgeführt. Der Mittelwert der Daten wurde berechnet und als ein unabhängiges Experiment ( $n=1$ ) gewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung wiedergegeben.

Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant akzeptiert.

In den Abbildungen geben die Fehlerbalken die Standardabweichung an.

### 3. Ergebnisse

---

Es wurden primäre Zellen von zwei verschiedenen Spendern auf ihr Wachstumsverhalten nach mechanischer Dehnung untersucht. Es handelte sich hierbei um vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Aorta und aus einer Koronararterie. Da nahezu alle Forschungsgruppen ausschließlich vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta als Untersuchungsobjekt nutzen, wurden vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta zuerst verwendet.

Die Zellen wurden zunächst in ihrem Wachstumsverhalten charakterisiert. Daran anschließend wurden Untersuchungen zur DNA-Synthese, zur metabolischen Aktivität und zum Zelltod unter mechanischer Dehnung durchgeführt.

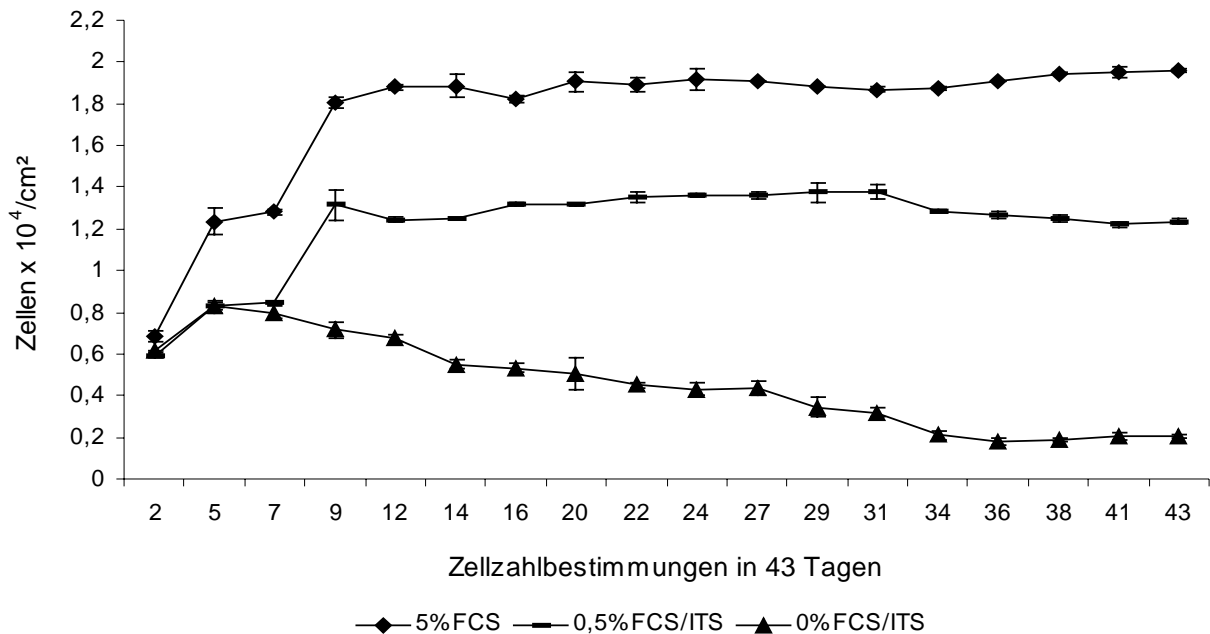
#### 3.1. Humane glatte Muskelzellen aus der Aorta (hAOSM)

##### 3.1.1. Charakterisierung

###### - Zellwachstum

Zu Anfang wurde das Wachstum der hAOSM Zellen unter Verwendung verschiedener Zellkulturmedien beobachtet. Ziel war es, ein optimales Medium zu finden. Dies sollte bei niedriger Wachstumsrate eine Langlebigkeit der Zellen sichern. Die niedrige Wachstumsrate war für die folgenden Versuche Voraussetzung, da zum einen in vivo eine niedrige Wachstumsrate vorliegt, zum anderen Änderungen des Wachstums bei niedrigem Hintergrund besser zu erfassen sind.

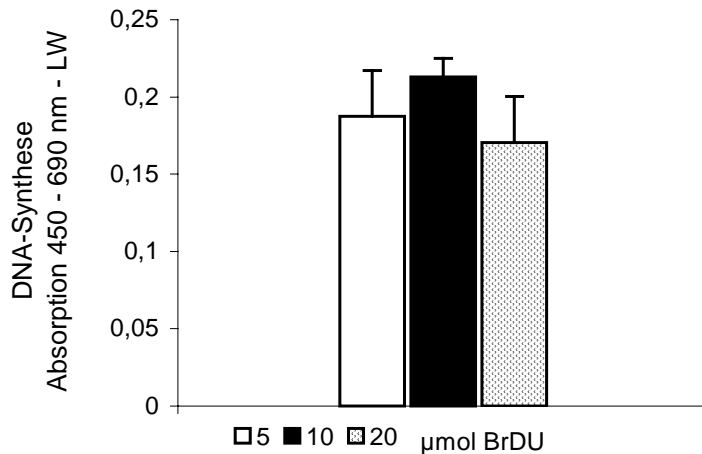
Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Collagen-I-beschichteten Bioflexmembranen ausgesät und zwei Tage lang auf 5%FCS belassen. Dann wurden die Zellen auf die verschiedenen Zellkulturmedien gesetzt. Verwendet wurden dabei 5%FCS (Vollmedium), 0,5%FCS/1%ITS (serumarmes Medium) und 0%FCS/1%ITS (serumfreies Medium). Über einen Zeitraum von 43 Tagen in Abständen von zwei bis drei Tagen wurde die Wachstumskurven ermittelt. Für jedes Zellkulturmedium wurde das Zellwachstum doppelt bestimmt und der Mittelwert errechnet. (18 Zellzahlbestimmungen mittels Zellzählung unter dem Mikroskop, n=2, in situ; **Abb. 8**). Es zeigte sich, dass zumindest ein serumarmes Medium notwendig ist, um eine Balance zwischen Zelltod und Proliferation im Ruhezustand zu gewährleisten. Deshalb wählten wir für die weiteren Versuche Medium mit einer Serumkonzentration von 0,5%FCS/1%ITS.



**Abb. 8** Wachstumskurven von hAOSM Zellen mit verschiedenen Medien. Verwendet wurde 5%FCS, 0,5%FCS/1%ITS und 0%FCS/1%ITS; n=2. Die Veränderung der Zellzahl wurde unter dem Lichtmikroskop über einen Zeitraum von 43 Tagen bestimmt. Eine konstant niedrige Wachstumsrate fand sich unter Verwendung von 0,5%FCS/ITS. Dieses Medium wurde im Weiteren verwendet.

#### - Bestimmung der DNA-Synthese mit verschiedenen BrdU-Konzentrationen

Zur Festlegung der später im Versuch zu verwendenden BrdU-Konzentration wurde die DNA-Synthese mit Konzentrationen von 5, 10 und 20  $\mu\text{mol/l}$  BrdU gemessen, ohne dass eine Dehnung vorgenommen wurde. Die Kulturbedingungen waren folgende: die Zellen wurden auf einer Bioflexmembranplatte ausgesät, dabei wurde jeder BrdU-Konzentration ein Leerwert beiseite gestellt. Nach siebentägigem Wachstum unter Vollmedium wurde für fünf weitere Tage auf serumarmes Ruhemedium umgestellt. Die BrdU-Inkorporation erfolgte mit den jeweiligen Konzentrationen für zwei Stunden. Nach der Inkubation wurde der BrdU-Einbau, wie unter Punkt 2.2.2.3. der Methoden beschrieben, bestimmt. Die Messergebnisse (unter Abzug des Leerwertes, **Abb. 9**) zeigten, dass die DNA-Synthese mit den verwendeten Konzentration ähnlich gut zu erfassen war. Wir wählten für die weiteren Versuche die Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  BrdU.



**Abb. 9** Bestimmung der DNA-Synthese von hAOSM Zellen ohne Dehnung mit BrdU-Konzentrationen von 5, 10 und 20 µmol/l. Die DNA-Synthese war mit den verwendeten Konzentrationen ähnlich gut zu erfassen. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW)

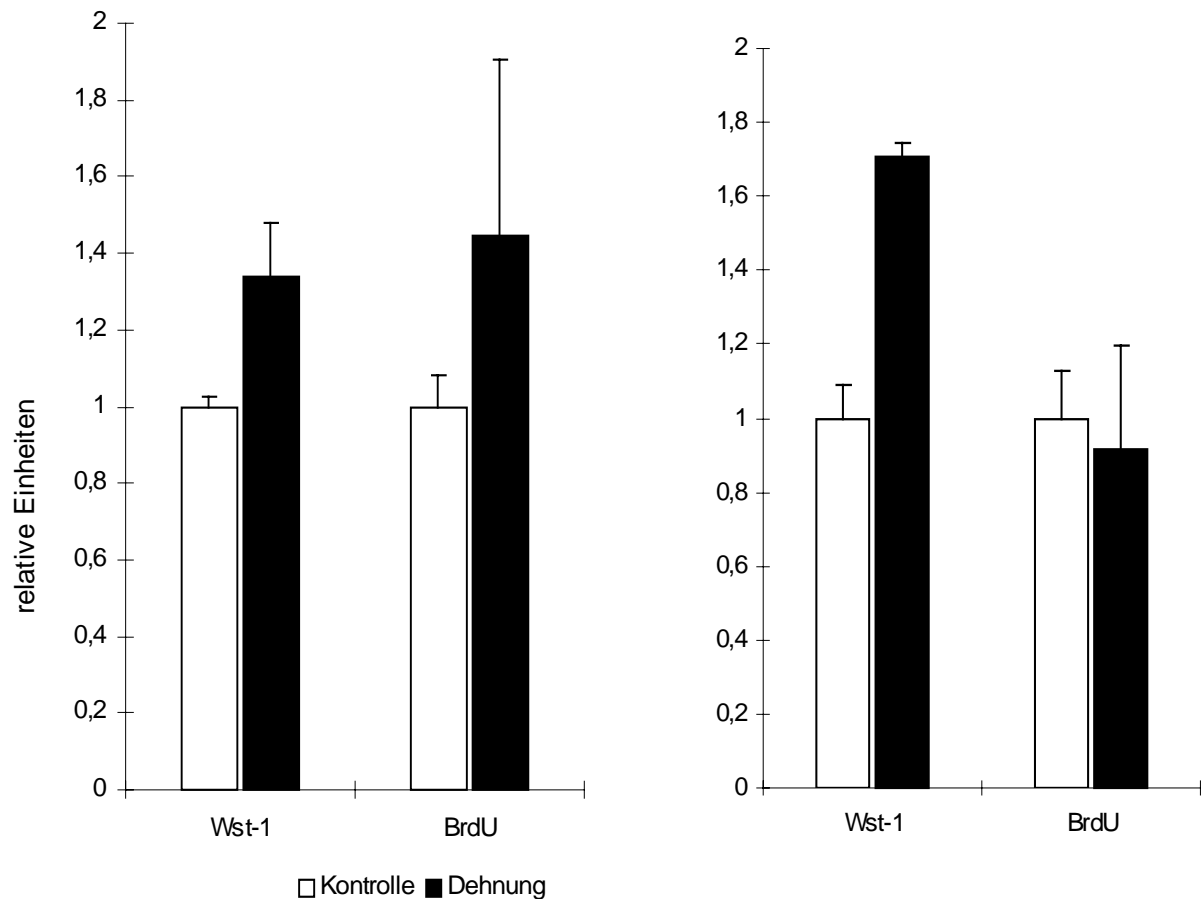
#### - Dehnung mit verschiedenen Medien

Es stellte sich die Frage, ob verschiedene Medien Einfluss auf das Verhalten von hAOSM Zellen nach Dehnung hinsichtlich DNA-Synthese und metabolische Aktivität haben. Dazu untersuchten wir den BrdU-Einbau und die Wst-1-Spaltung von hAOSM Zellen nach Dehnung mit serumarmem Medium und Vollmedium.

Nach konfluentem Wachstum der hAOSM Zellen auf einer Bioflexmembranplatte unter Verwendung von Vollmedium (5%FCS) wurde drei Tage vor Dehnung das Medium gewechselt. Zum einen wurden Zellen auf Vollmedium (5%FCS) belassen, zum anderen wurden Zellen auf serumarmes Medium (0,5%FCS/1%ITS) gesetzt. Die Dehnung erfolgte über 72 Stunden. Die verwendete BrdU-Konzentration war 10µmol/l. Die Inkubation mit BrdU erfolgte für die letzten 6 Stunden der Dehnung.

Die Messwerte für den BrdU-Einbau und die Wst-1-Spaltung unter Verwendung von serumarmem Medium und Vollmedium zeigten keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 10a** und **b**).

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung verschiedener Medien keinen Einfluss auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität der hAOSM Zellen hat. So soll die verwendete FCS-Konzentration nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse alleinig durch das verwendete Serum führen.



**Abb. 10**

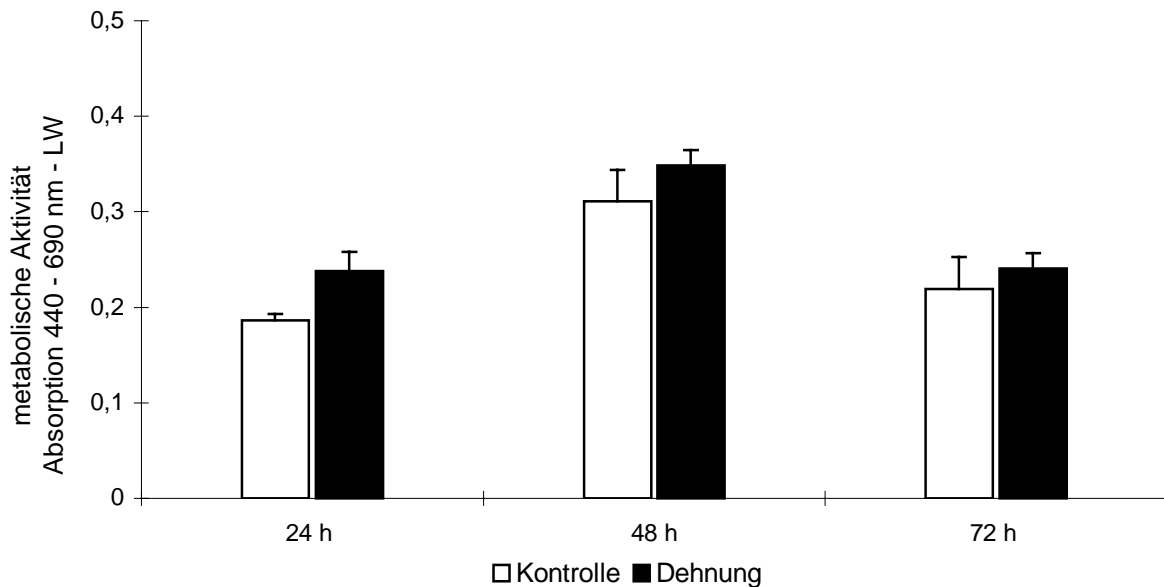
**10a:** BrdU-Einbau unter Dehnung mit 5%FCS

**10b:** BrdU-Einbau unter Dehnung mit 0,5%FCS/1%ITS

Bei Dehnung mit verschiedenen Medien zeigte der BrdU-Einbau keinen signifikanten Unterschied. In relativen Einheiten bezogen auf die Kontrolle.

#### - Wst-1 Zeitverlauf

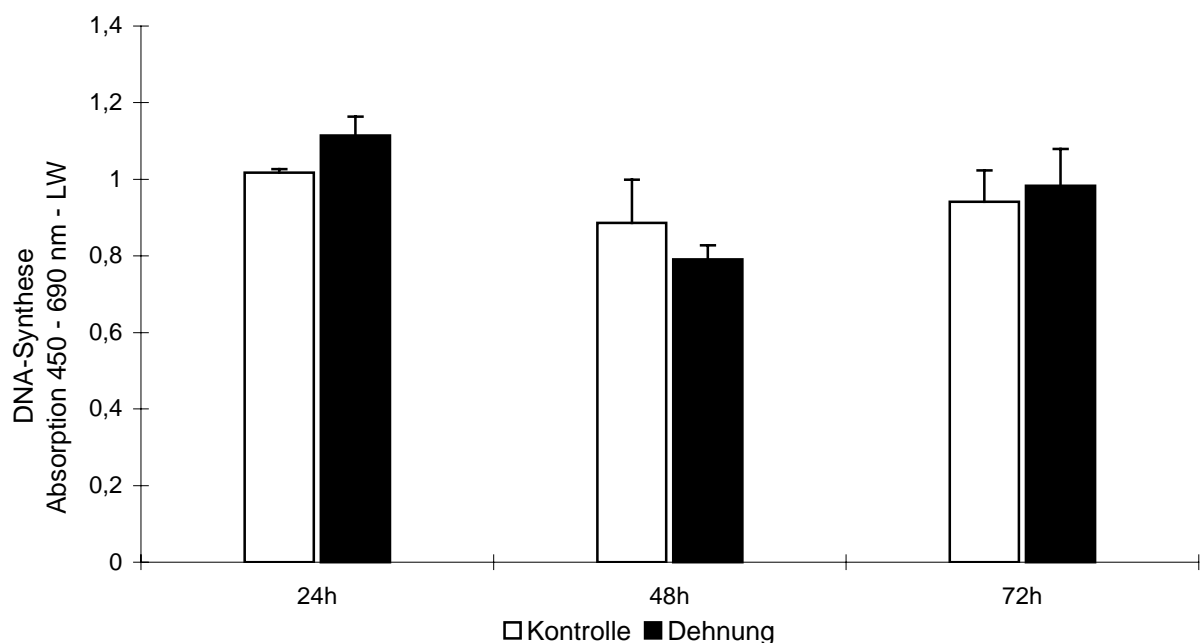
Um einen Eindruck über die metabolische Aktivität von hAOSM Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Dehnung zu erhalten wurde die Wst-1-Aktivität nach 24, 48 und 72 Stunden Dehnung bestimmt. Die hAOSM Zellen wurden unter den festgelegten Bedingungen mit 0,5%FCS/1%ITS ausgesät. Die Zellen wurden jeweils zwei Stunden vor Bestimmung der Absorption mit 150µl Wst-1 inkubiert. Die Wst-1-Spaltung zeigte nach 24, 48 und 72 Stunden Dehnung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wst-1-Spaltung der hAOSM Zellen in Kontrolle und Dehnung (24 Stunden: Kontrolle  $0,19 \pm 0,007$ , Dehnung  $0,24 \pm 0,02$ ,  $P=0,07$ ; 48 Stunden: Kontrolle  $0,31 \pm 0,03$ , Dehnung  $0,35 \pm 0,02$ ,  $P=0,20$ ; 72 Stunden: Kontrolle  $0,22 \pm 0,03$ , Dehnung  $0,24 \pm 0,02$ ,  $P=0,5$ ; **Abb. 11a**).



**Abb. 11a** metabolische Aktivität (Wst-1 Spaltung) von hAOSM Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Dehnung. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW). Die unterschiedlichen Dehnungszeiten zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität.

#### - BrdU-Zeitverlauf

Zum Vergleich mit den regelrechten Versuchen wurde parallel dazu nach 24, 48 und 72 Stunden Dehnung die DNA-Synthese der hAOSM Zellen bestimmt. Die BrdU-Inkorporation erfolgte jeweils für 48 Stunden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der DNA-Synthese gedehnter zu ungedehnten Zellen nach unterschiedlich langen Dehnungszeiten (24 Stunden: Kontrolle  $1,02 \pm 0,01$ , Dehnung  $1,12 \pm 0,05$ ,  $P=0,11$ ; 48 Stunden: Kontrolle  $0,89 \pm 0,11$ , Dehnung  $0,79 \pm 0,04$ ,  $P=0,37$ ; 72 Stunden: Kontrolle  $0,94 \pm 0,08$ , Dehnung  $0,98 \pm 0,1$ ,  $P=0,66$ ; **Abb. 11b**)



**Abb. 11b** DNA-Synthese (BrdU-Einbau, 48 Stunden) hAOSM Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Dehnung. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW). Die unterschiedliche Dehnungszeiten zeigten keinen Einfluss auf die DNA-Synthese.

### 3.1.2. Zyklische mechanische Dehnung reduziert die DNA-Synthese in den niedrigen Passagen der hAOSM Zellen

In der ersten Aufgabenstellung sollte der Einfluss physiologischer Dehnung auf humane vaskuläre glatte Muskelzellen untersucht werden. Zahlreiche Forschungsgruppen stellten fest, dass zyklische mechanische Dehnung eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen bewirkt [9, 182, 245]. Im Gegensatz dazu haben sowohl Hipper et al. [105] als auch Chapman et al. [39] an vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta embryonaler Ratten gezeigt, dass die Proliferation bei physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung signifikant abnimmt.

Diese Widersprüche sind nach wie vor ungeklärt. Bei fehlenden Untersuchungen über den Einfluss mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen des Menschen verwendeten wir zuerst primäre Zellen aus der Aorta eines 2,5 Monate alten europäischen Spenders (hAOSM). Es wurde der Einfluss von zyklischer mechanischer Dehnung (0,5 Hz, 5% Elongation) auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität ermittelt.

Die DNA-Synthese (BrDU-Inkorporation) während 72 Stunden Dehnung auf Collagen-I-beschichteten flexiblen Silikonmembranen wurde nach Beendigung der Dehnung gemessen. In den letzten 48 Stunden erfolgte die Inkubation mit BrDU.

Die mechanische Dehnung der hAOSM Zellen bewirkte eine signifikante Abnahme der DNA-Synthese bei den gedehnten Zellen im Vergleich zu den ungedehnten Kontrollzellen um  $32,4 \pm 26,2\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n=6$ ,  $P=0,013$ , **Abb. 12a**). Dieser Effekt konnte in den Passagen 6 bis einschließlich 9 gezeigt werden.

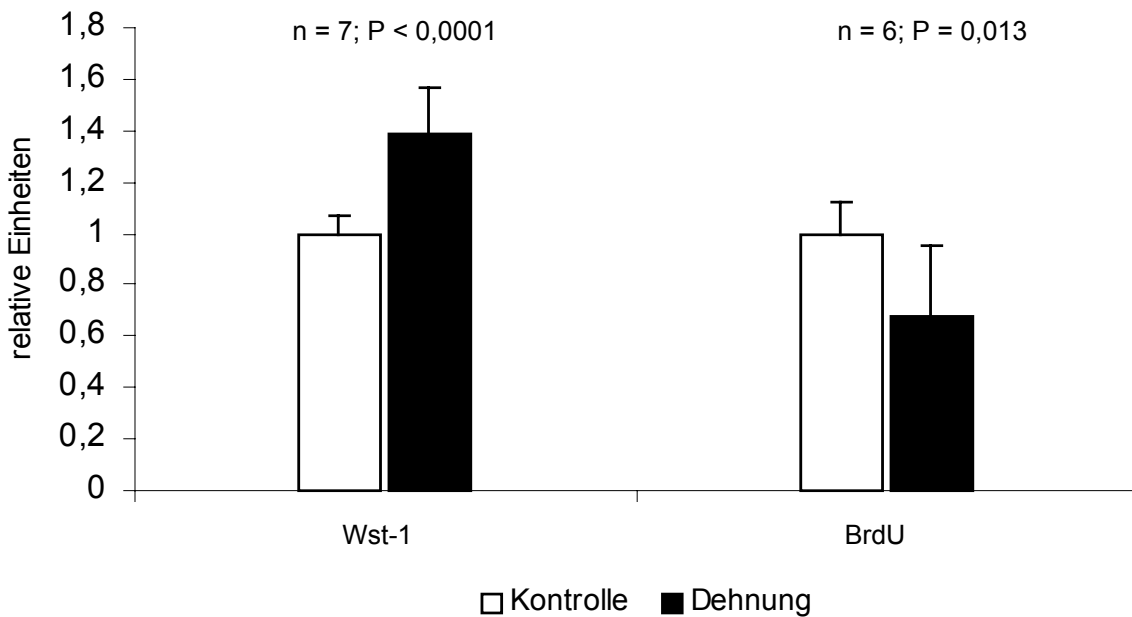
Bei der Bestimmung der metabolischen Aktivität (Wst-1-Spaltung) wurde im Vergleich der ungedehnten zu den gedehnten Zellen eine signifikante Zunahme um  $39,1 \pm 17,9\%$  ( $n=7$ ,  $P < 0,0001$ , **Abb. 12a**) für die Versuche bis zur Passage Nr. 9 gemessen.

Hiermit konnten wir zeigen, dass infolge mechanischer Dehnung die DNA-Synthese humaner vaskulärer glatter Muskelzellen der Aorta signifikant abnimmt.

Interessant ist, dass im Gegensatz zur Abnahme der DNA-Synthese parallel dazu die metabolische Aktivität bei mechanischer Dehnung von hAOSM Zellen in den niedrigen Passagen signifikant zunimmt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Abnahme der DNA-Synthese nicht auf eine Schädigung der Zellen zurückzuführen ist.

Zum einen um weiterhin eine Zellschädigung als Ursache für die Abnahme der DNA-Synthese auszuschließen, zum anderen um der Diskrepanz zwischen DNA-Synthese und metabolischer Aktivität nachzugehen, wurde im Folgenden die Zellzahl, die LDH-Aktivität und die Apoptose – unter 3.1.3. – untersucht.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich bestätigen, dass eine physiologische Dehnung in vitro zu einer Abnahme der DNA-Synthese führt und damit einen antiproliferativen Effekt besitzt.

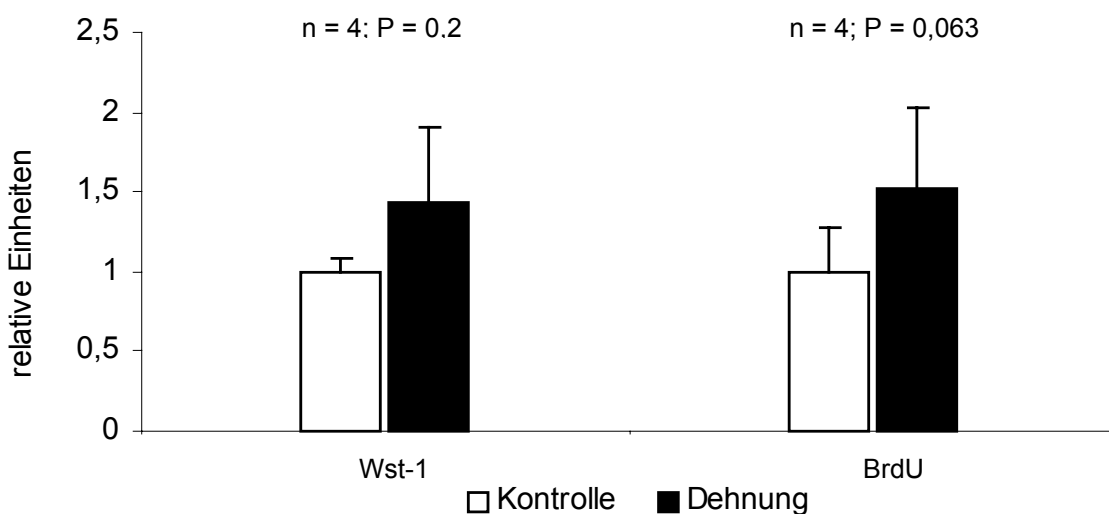


**Abb. 12a** hAOSM Zellen  $\leq$  Passage 9: BrdU Kontrolle>Dehnung. Es zeigte sich eine signifikant verminderte DNA-Synthese (BrdU-Inkorporation) unter Dehnung im Vergleich zur Kontrolle für Zellen bis zur Passage Nr. 9. Die metabolische Aktivität (Wst-1-Spaltung) ist unter Dehnung signifikant höher als in der Kontrolle. In relativen Einheiten bezogen auf die Kontrolle.

Nachdem die hAOSM Zellen von der Passage Nr. 6 bis einschließlich 9 eine signifikante Abnahme der DNA-Synthese und eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität unter zyklischer mechanischer Dehnung gezeigt hatten, war überraschend, dass dieser antiproliferative Effekt in höheren Passagen nicht mehr reproduzierbar war.

Ab der Passage Nr. 9 fand sich nach erfolgter Dehnung eine nicht-signifikante Zunahme der DNA-Synthese (BrdU-Inkorporation) der gedehnten im Vergleich zu den ungedehnten Zellen um  $52,5 \pm 40,9\%$  ( $n=4$ ,  $P=0,063$ , **Abb. 12b**).

Ab der Passage Nr. 9 bestand eine nicht-signifikante Zunahme der Wst-1-Spaltung von  $43,8 \pm 53,8\%$  ( $n=4$ ,  $P=0,2$ , **Abb. 12b**).



**Abb. 12b** hAOSM Zellen  $>$  Passage 9: BrdU Dehnung>Kontrolle. hAOSM Zellen der höheren Passagen zeigten eine signifikant erhöhte DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Die metabolische Aktivität (Wst-1-Spaltung) ist unter Dehnung signifikant höher als in der Kontrolle. In relativen Einheiten bezogen auf die Kontrolle.



In den höheren Passagen konnte weder für die DNA-Synthese noch für die metabolische Aktivität unter dem Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung ein signifikanter Unterschied zwischen hAOSM Zellen der Kontrolle und Dehnung reproduziert werden. Entgegen der signifikanten Abnahme der DNA-Synthese in den Versuchen bis zur Passage Nr. 9 fand sich in den höheren Passagen eine nicht-signifikante Zunahme der DNA-Synthese.

Diese abweichenden Ergebnisse in den höheren Passagen im Vergleich zu den niedrigeren Passagen sind möglicherweise auf eine stattgehabte Modulation des Phänotyps in den höheren Passagen zurückzuführen.

#### - Mitoseindex

Zur Ermittlung des Einflusses von zyklischer mechanischer Dehnung auf die DNA-Synthese und die Zellzahl von hAOSM Zellen wurde zusätzlich eine zweite Methode angewandt. Von Interesse war die Anzahl bzw. die Ratio der proliferierenden Zellen entsprechend dem Mitoseindex während der Versuche.

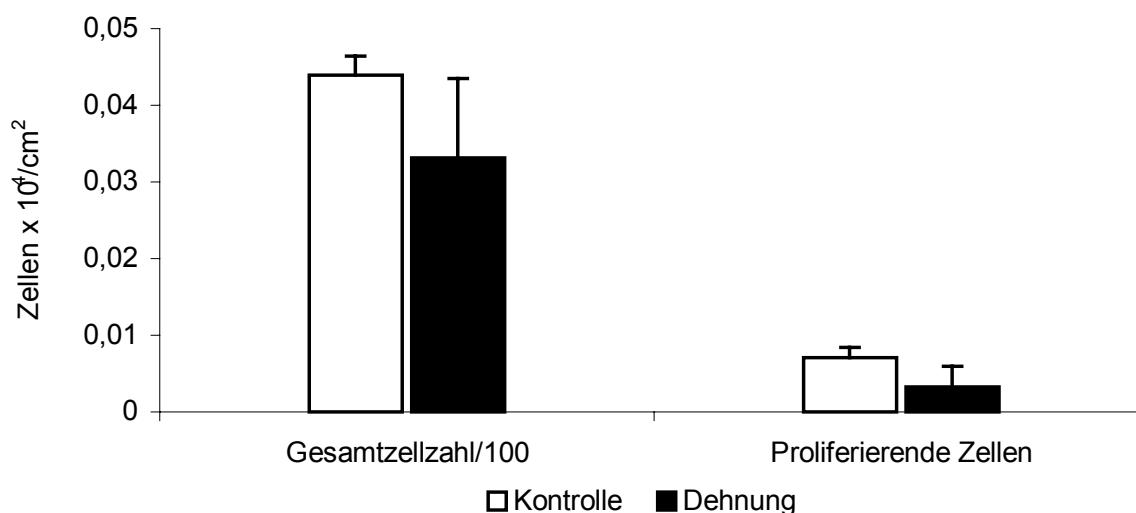
Dabei wurden Zellen der S-Phase, welche den proliferierenden Zellen entsprechen, und die Gesamtzellzahl bestimmt, indem sie unter dem Lichtmikroskop gezählt wurden.

Es zeigte sich unter Dehnung eine nicht-signifikante Abnahme der Zellen in S-Phase pro  $\text{cm}^2$  um 52,8% ( $P=0,215$ ).

Für die Gesamtzellzahl pro  $\text{cm}^2$  fand sich eine nicht-signifikante Abnahme um 24,6% ( $P=0,287$ ).

Die absoluten Zahlenwerte pro  $\text{cm}^2$  waren wie folgt: in Kontrolle waren  $0,007 \pm 0,001 \times 10^4$  Zellen in S-Phase, die Gesamtzahl war  $4,39 \pm 0,24 \times 10^4$  Zellen (**Abb. 13a**). Im Falle der Dehnung befanden sich  $0,0033 \pm 0,003 \times 10^4$  Zellen in S-Phase, die Gesamtzahl war  $3,31 \pm 1,03 \times 10^4$  Zellen (**Abb. 13a**).

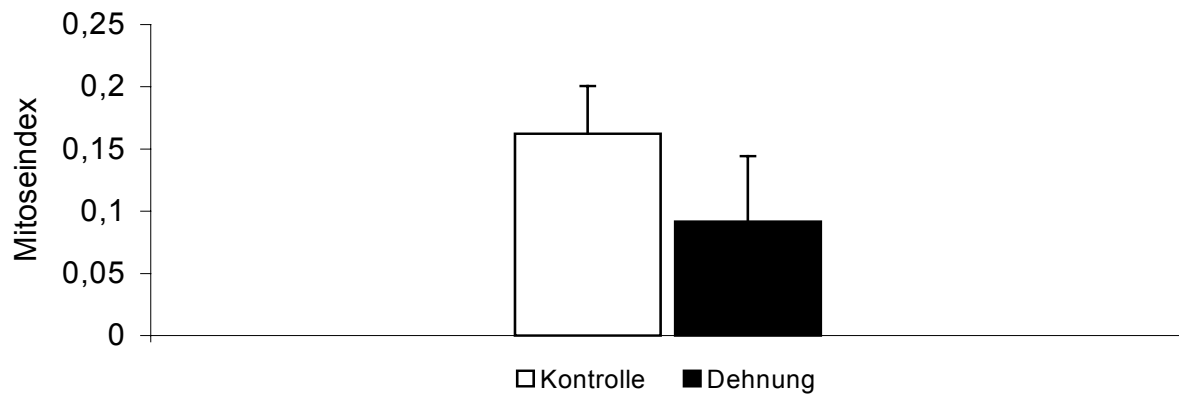
Der Mitoseindex der hAOSM Zellen (in %) entsprach demnach in Kontrolle  $0,16 \pm 0,031$ , in Dehnung  $0,09 \pm 0,05$  (**Abb. 13b**).



**Abb. 13a** Gesamtzellzahl (im Diagramm /100) und proliferierende Zellen (S-Phase) von hAOSM Zellen nach 72 h Dehnung im Vergleich zur Kontrolle. In Zellen  $\times 10^4/\text{cm}^2$ . Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen unter Dehnung.

Weder in Hinblick auf die Gesamtzellzahl noch auf die Anzahl der proliferierenden Zellen fand sich eine signifikante Änderung unter dem Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung.

Demnach liegt unter zyklischer mechanischer Dehnung weder eine wesentliche Zunahme noch eine Abnahme der Gesamtzellzahl oder der Anzahl proliferierender Zellen vor.



**Abb. 13b** Mitoseindex entsprechend der Ratio der hAOSM Zellen in S-Phase zur Gesamtzellzahl in Prozentangabe nach 72 h Dehnung im Vergleich zur Kontrolle (in %). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss der Dehnung.

Bei insgesamt niedrigem Mitoseindex ergab sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch hinsichtlich des Mitoseindex von hAOSM Zellen keine signifikante Veränderung.

Durch den niedrigen Mitoseindex der hAOSM Zellen sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung erklärt sich, warum trotz signifikanter Abnahme der DNA-Synthese unter Dehnung keine Änderung der Gesamtzellzahl detektiert werden kann. Um einen Unterschied in der Zellzahl zu detektieren, wäre eine Veränderung von mindestens 20% notwendig, welche bei einem solch niedrigen Mitoseindex erst nach einem vergleichsweise langen Zeitraum auftritt.

### 3.1.3. Abnahme der DNA-Synthese ist nicht auf eine Zellschädigung zurückzuführen

#### - Zellzahl

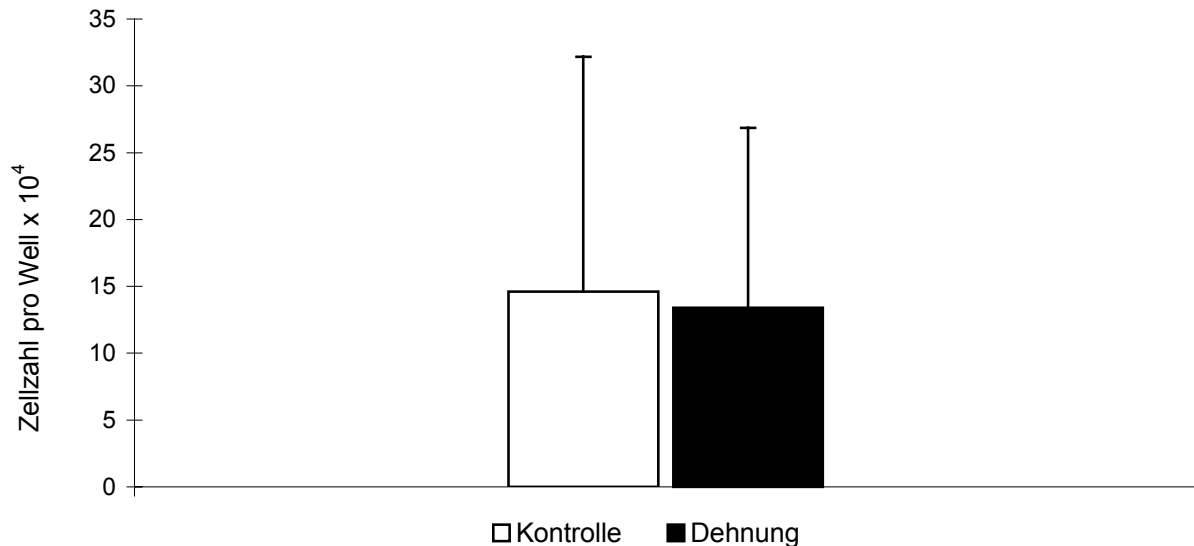
Zum einen wurde die Zellzahl bestimmt, um zu klären, ob die Abnahme der DNA-Synthese (bis einschließlich Passage Nr. 9) durch eine Verminderung der Zellzahl zustande kommt. Zum anderen wurde die Zellzahl bestimmt, um der Diskrepanz zwischen der Abnahme der DNA-Synthese und der Zunahme der metabolischen Aktivität unter zyklischer mechanischer Dehnung weiter nachzugehen.

Da Wst-1 durch metabolisch aktive Zellen gespalten wird und dementsprechend als Parameter für die Lebensfähigkeit der Zelle dient, lässt die Bestimmung der metabolischen Aktivität Rückschlüsse auf die Zellproliferation zu. Ausgehend von einer Korrelation der Menge an Wst-1-Spaltprodukten und der Anzahl lebensfähiger Zellen, käme eine erhöhte metabolische Aktivität in Folge erhöhter Zellzahl in Frage.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in NEUBAUER-Kammern nach Trypsinierung.

Zusammenfassend ergab sich für die Kontrolle eine Zellzahl von  $14,6 \pm 17,57 \times 10^4$  Zellen pro Well. Für die Dehnung ergab sich eine Zellzahl von  $13,4 \pm 13,47 \times 10^4$  Zellen pro Well.

Es fand sich keine signifikante Veränderung der Zellzahl unter dem Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung ( $-11,45 \pm 69,4\%$ ;  $n=5$ ,  $P=0,91$ , **Abb. 14**).



**Abb. 14** hAOSM Zellen Zellzahl pro Well  $\times 10^4$  von Kontrolle und Dehnung ( $n=5$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Zellzahl unter dem Einfluss der Dehnung.

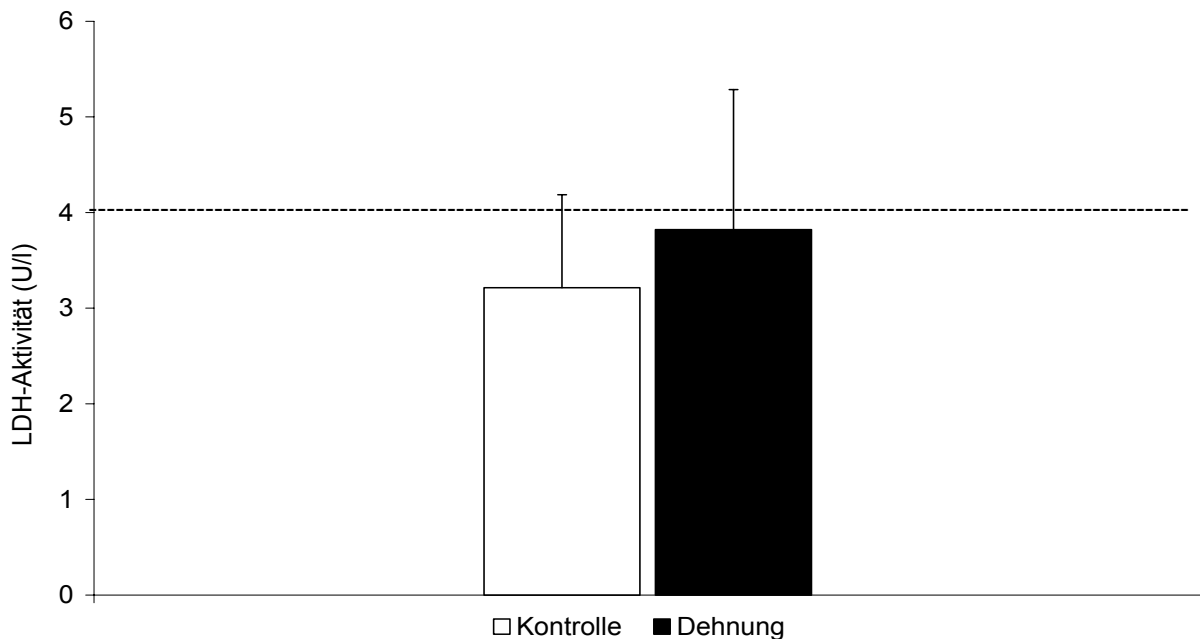
Aufgrund der signifikanten Abnahme der DNA-Synthese wäre eine langfristige Abnahme der Zellzahl zu erwarten. Die Bestimmung der Zellzahl zeigte jedoch nach 72 h keine Unterschiede der Zellzahl zwischen Kontrolle und Dehnung. Dies lässt sich auf den niedrigen Mitoseindex sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung (s. Unterpunkt „Mitoseindex“ unter 3.1.2.) von 0,16 bzw. 0,09 % zurückführen. Nach 72 h liegen demnach vermutlich nur so minimale Unterschiede in der Zellzahl vor, dass diese zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden können.

#### - LDH-Aktivität und Apoptose

Um eine Abnahme der gemessenen DNA-Synthese aufgrund einer dehnungsinduzierten Zellschädigung oder Apoptose auszuschließen, wurde zum einen die Messung der Laktatdehydrogenaseaktivität im Zellüberstand, zum anderen die Bestimmung zytosolischer DNA-Histon-Komplexe herangezogen.

Die LDH-Aktivität zeigte in keinem Versuch signifikante Unterschiede zwischen Dehnung und Kontrolle ( $n=6$ ,  $P=0,07$ , **Abb. 15**).

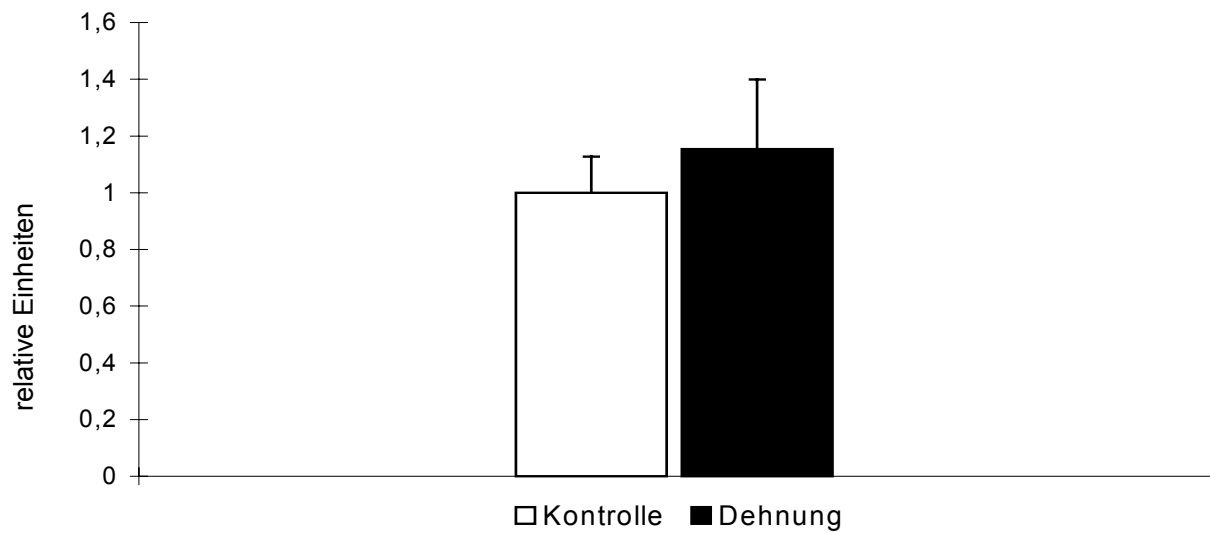
Die gemessenen Werte nach Abzug des Leerwertes waren grundsätzlich sehr niedrig; die gemessene LDH-Aktivität lag meist im Bereich von 4 U/l (dies entspricht der niedrigsten mit diesem Test erfassbaren Aktivität von 0,001 E/min bei 340nm).



**Abb. 15** Die LDH-Aktivität (U/l) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Dehnung. Die Nachweisgrenze der LDH-Aktivität ist mittels unterbrochener Linie in Höhe von 4 U/l eingezeichnet.

Sowohl vor als auch nach Dehnung war die LDH-Aktivität sehr niedrig. Erwartungsgemäß stellt in Ruhe der Zelltod ein seltenes Ereignis dar. Die mechanische Dehnung hat darauf keinen signifikanten Einfluss.

Um eine Abnahme der DNA-Synthese infolge einer Apoptose-bedingten Verminderung der Zellzahl auszuschließen, wurde die Bestimmung der Apoptose mittels zytosolischer DNA-Histon-Komplexe im ELISA durchgeführt. Es wurde eine nicht-signifikante Erhöhung um  $15,4 \pm 24,47\%$  ( $n=3$ ,  $P=0,337$ , **Abb. 16**) nach mechanischer Dehnung gemessen. Der durchschnittliche Wert lag in der Kontrolle bei  $0,18 \pm 0,21$ , in der Dehnung bei  $0,24 \pm 0,31$ . Wie bei der Bestimmung der LDH-Aktivität waren auch bei der Bestimmung der Apoptose die Messwerte insgesamt sehr niedrig.



**Abb. 16** Apoptose von hAOSM Zellen unter Dehnung mittels ELISA. In relativen Einheiten bezogen auf die Kontrolle  $1 \pm 0,13$ , Dehnung  $1,15 \pm 0,24$ . Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss der Dehnung.

Aufgrund der Ergebnisse bei Bestimmung der Zellzahl, der LDH-Aktivität und der Apoptose läßt sich sowohl eine relevante dehnungsinduzierte Zellschädigung als auch eine Apoptose-bedingte Verminderung der Zellzahl ausschließen.

### 3.2. Humane glatte Muskelzellen aus einer Koronararterie (hCASM)

Zuerst war der Einfluss physiologischer mechanischer Dehnung auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität an humanen glatten Muskelzellen der Aorta eines 2,5 Monate alten Europäers untersucht worden. Da sich die klinische Fragestellung auf das Koronargefäßsystem fokussiert, wurden anschließend die Versuche mit humanen glatten Muskelzellen aus einer Koronararterie durchgeführt. Es wurden Zellen aus der Koronararterie eines 48 Jahre alten Europäers verwendet. Zusätzlich zu den bereits verwendeten vaskulären glatten Muskelzellen eines jüngeren Spenders interessierte der Einfluss mechanischer Dehnung auf diejenigen eines älteren Spenders.

#### 3.2.1. Charakterisierung

##### - Erfassung des Wachstums von hCASM Zellen auf verschiedenen Medien

Ziel war es, zunächst optimale Versuchsbedingungen für die hCASM Zellen mit einer niedrigen Proliferationsrate, ähnlich der in vivo, zu erhalten. Um das Wachstumsverhalten von hCASM Zellen auf verschiedenen Medien zu beobachten, wurden die Zellen auf einer 24-Well-Platte mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

Acht Tage verblieben die Zellen bei Vollmedium ehe auf die verschiedenen Medien gewechselt wurde. Die Membranen waren zu dem Zeitpunkt des Mediumwechsels einheitlich zu 60-70% mit Zellen bewachsen.

Folgende Medien wurden getestet:

- 1) 0%FCS/1%ITS in DMEM;
- 2) 0,5%FCS/1%ITS in DMEM;
- 3) 1%FCS/1%ITS in DMEM;
- 4) 2%FCS/1%ITS in DMEM
- 5) Vollmedium (=SMBM, 5%FCS).

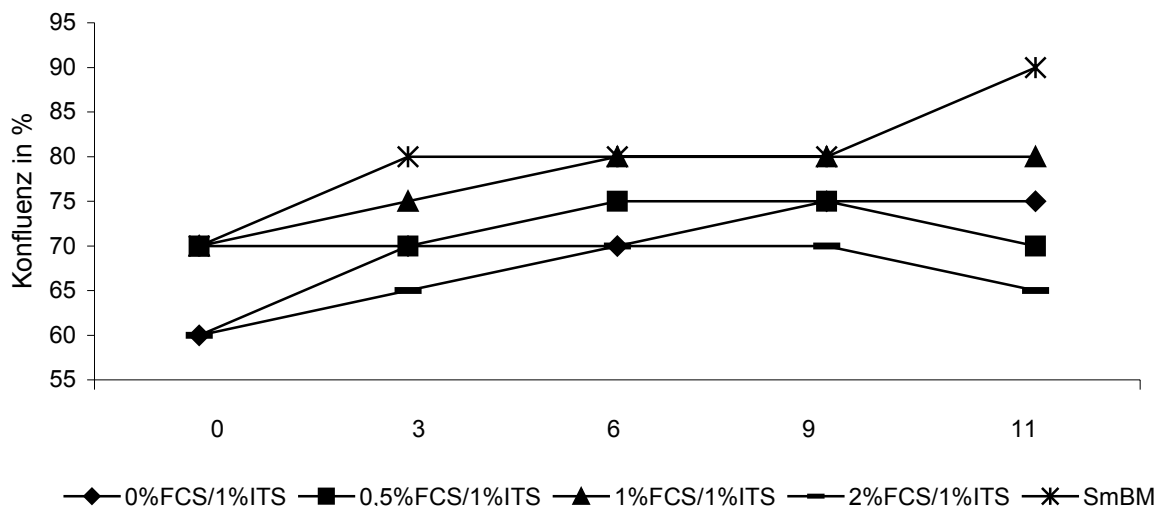
Nach 3, 6, 9 und 11 Tagen wurde das Zellwachstum (die Konfluenz) auf den verschiedenen Medien unter dem Mikroskop eingeschätzt (**Abb. 17**).

Bei konstantem Verhalten über den beobachteten Zeitraum zeigte sich nach 11 Tagen nahezu konfluentes Wachstum bei Vollmedium (SMBM 90%); die Membranen waren bei 0%FCS/1%ITS zu 75%, bei 0,5%FCS/1%ITS zu 70%, bei 1%FCS/1%ITS zu 80% und bei 2%FCS/1%ITS zu 65% mit Zellen bewachsen.

Um eine quantitative Aussage über das Zellwachstum zu erhalten, erfolgte die Bestimmung der DNA-Synthese mit BrdU. Die Zellen wurden mit 15µM BrdU für 24 Stunden und 48 Stunden inkubiert. Leerwerte für das Vollmedium (SMBM) wurden jeweils mitbestimmt (**Abb. 18**).

Erwartungsgemäß war die Konfluenz als auch die DNA-Synthese der hCASM Zellen unter Vollmedium am höchsten. Erstaunlicherweise zeigte sich über einen Zeitraum von 11 Tage unter

serumfreiem Medium eine Konfluenz von 75%, welche diejenige unter 0,5%FCS/1%ITS und 2%FCS/1%ITS übertraf. Die BrdU-Absorptionswerte waren im Allgemeinen sehr niedrig.

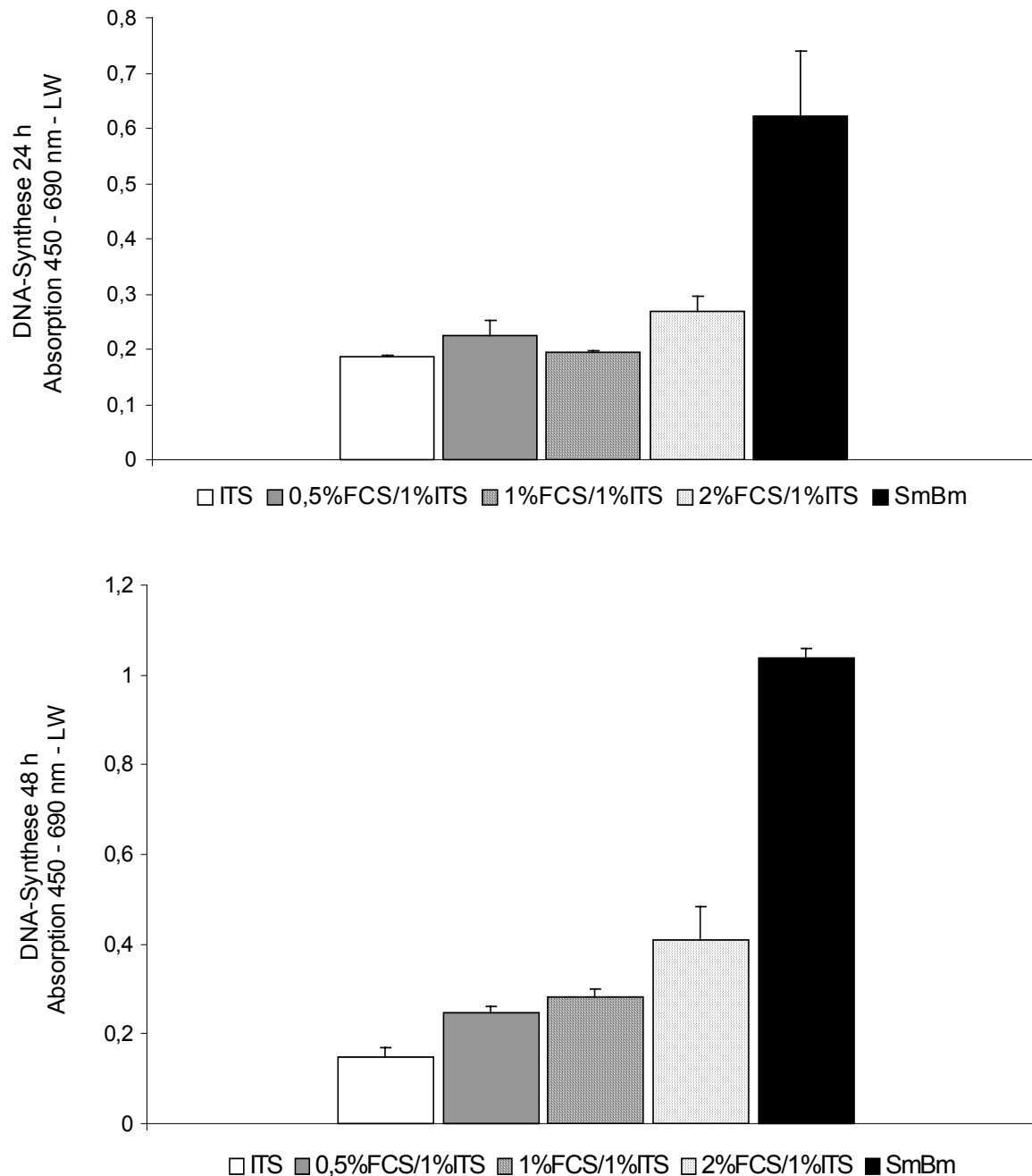


**Abb. 17** Das Wachstum von hCASM Zellen unter verschiedenen Medien. Die Konfluenz wurde unter dem Mikroskop zu Beginn und nach 3, 6, 9 und 11 Tagen in Prozent geschätzt.

Bereits nach Passagieren der Zellen zeigten die hCASM Zellen ein zwar konstantes, aber ausgesprochen langsames Wachstum. Dies legt nahe, dass die allgemein sehr niedrige DNA-Synthese ein Charakteristikum der vaskulären glatten Muskelzellen der Koronararterien sein könnte. Nicht nur das langsame Zellwachstum, sondern auch die Messung sehr niedriger BrDU-Werte und damit sehr kleiner Unterschiede gestaltete die Versuchsdurchführung im Weiteren äußerst schwierig.

Da sich keine signifikante Änderung hinsichtlich der DNA-Synthese bei unterschiedlichen BrDU-Inkorporationszeiten von 24 und 48 Stunden zeigte, verwendeten wir im Folgenden eine BrDU-Inkorporationszeit von 24 Stunden.

Bezüglich des Mediums verwendeten wir im Folgenden serumfreies Medium (0%FCS/ITS) und Vollmedium (5%FCS). Die Verwendung serumfreien Mediums und Vollmediums sollte die Möglichkeit eines Vergleiches der untersuchten Parameter unter Verwendung zweier verschiedener Medien bieten. An der Verwendung des serumfreien Mediums wurde zum einen aufgrund der erstaunlich guten Konfluenz im Vergleich zu serumhaltigen Medien, zum anderen für den Vergleich mit den Ergebnissen der hAOSM Zellen festgehalten.



**Abb. 18** 24 Stunden (oben) und 48 Stunden (unten) BrdU-Einbau von hCASM Zellen mit ITS, 0,5%FCS/1%ITS, 1%FCS/1%ITS, 2%FCS/1%ITS und SmBm Vollmedium. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen infolge unterschiedlicher Dauer des BrdU-Einbaus.

### 3.2.2. Zyklische mechanische Dehnung zeigt keinen Einfluss auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität der hCASM Zellen

Die untersuchten primären Zellen waren vaskuläre glatte Muskelzellen aus einer Koronararterie eines 48jährigen europäischen Spenders.

Entsprechend dem bei den hAOSM Zellen durchgeführten Versuchsprotokoll wurde der Einfluss von zyklischer mechanischer Dehnung (0,5Hz, 5% Elongation) auf die DNA-Synthese (BrdU-Inkorporation) und die metabolische Aktivität (Wst-1-Spaltung) untersucht.



Der BrdU-Einbau (24 Stunden) erfolgte bei den hCASM Zellen im Rahmen 48stündiger mechanischer Dehnung der Zellen auf Collagen-I-beschichteten Silikonmembranen.

Bei den Versuchen unter Verwendung von serumfreiem Ruhemedium zeigte sich eine nicht-signifikante Veränderung der DNA-Synthese von gedehnten im Vergleich zu ungedehnten Zellen von  $-4,9 \pm 115,1\%$  ( $n=4$ ,  $P=0,87$ , **Abb. 19**).

Im Gegensatz zu den hAOSM Zellen (bis zur Passage Nr. 9) bestand demnach keine signifikante Veränderung der DNA-Synthese bei hCASM Zellen.

Bei Versuchen, welche mit Vollmedium (SMBM) durchgeführt wurden, fand sich eine DNA-Synthese der gedehnten im Vergleich zu den ungedehnten Zellen von  $+14,6 \pm 44,2\%$  ( $n=3$ ,  $P=0,6$ , **Abb. 20**), auch diese Veränderung war nicht signifikant.

Demnach hat die physiologische zyklische mechanische Dehnung auf die Proliferation der hCASM Zellen weder unter serumfreiem Medium noch unter Vollmedium einen signifikanten Einfluss. Die Verwendung zweier verschiedener Medien zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter.

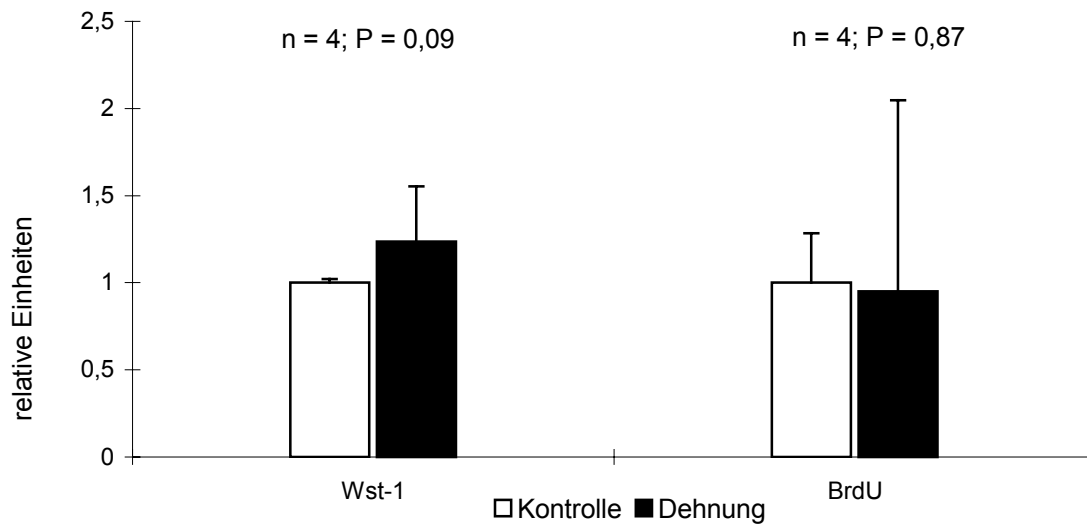
Somit besteht keine dehnungsinduzierte Abnahme der Proliferation von hCASM Zellen, jedoch auch keine Zunahme.

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität (Wst-1-Spaltung) der hCASM Zellen zeigte bei Verwendung von serumfreiem Ruhemedium eine metabolische Aktivität von den gedehnten im Vergleich zu den ungedehnten Zellen von  $+31,08 \pm 30,82\%$  ( $n=4$ ,  $P=0,09$ , **Abb. 19**).

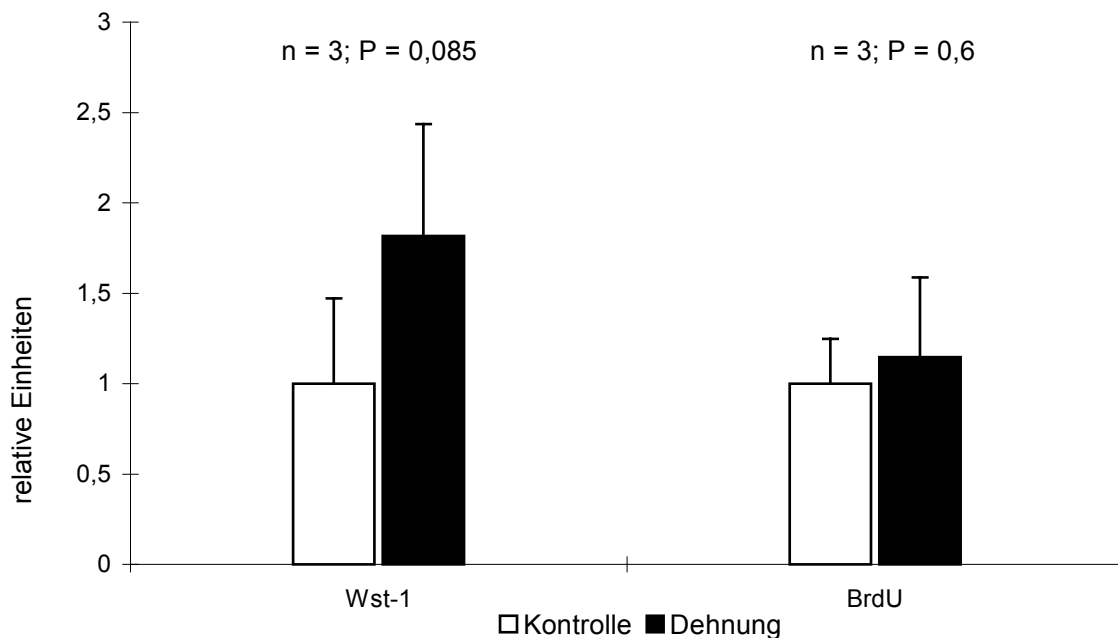
Im Gegensatz zu den hAOSM Zellen (bis zur Passage Nr.9) war die Veränderung der metabolischen Aktivität bei hCASM Zellen nicht signifikant.

Bei Verwendung von Vollmedium wurde ebenfalls keine signifikante Veränderung der metabolischen Aktivität (Wst-1-Spaltung) infolge Dehnung gemessen ( $+81,66 \pm 61,95\%$  ( $n=3$ ,  $P=0,085$ , **Abb. 20**)).

Für die hCASM Zellen zeigte sich somit weder unter serumfreiem Medium noch unter Vollmedium eine signifikante dehnungsinduzierte Zunahme der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität. Ebenso wenig liegt eine signifikante Abnahme der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität vor. Da keine signifikante dehnungsinduzierte Veränderung der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität unter serumfreiem Medium und Vollmedium vorliegt, lässt dies zumindest auf eine ausreichende Zellvitalität der hCASM Zellen schließen. Zudem lässt sich damit zeigen, dass trotz langsamen Zellwachstums und niedriger DNA-Synthese in Ruhe und in Dehnung die metabolische Aktivität regelrecht ist.



**Abb. 19** metabolische Aktivität (Wst-1) und DNA-Synthese (BrdU) von hCASM Zellen mit serumfreiem Medium in relativen Einheiten auf die Kontrolle bezogen. Wst-1 Kontrolle  $1 \pm 0,02$ , Dehnung  $1,24 \pm 0,32$ ; BrdU Kontrolle  $1 \pm 0,28$ , Dehnung  $0,95 \pm 1,1$ . Es zeigte sich keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss der Dehnung.



**Abb. 20** metabolische Aktivität (Wst-1-Spaltung) und DNA-Synthese (BrdU) hCASM Zellen mit SmBm in relativen Einheiten bezogen auf die Kontrolle. Wst-1 Kontrolle  $1 \pm 0,47$ , Dehnung  $1,22 \pm 0,62$ ; BrdU Kontrolle  $1 \pm 0,25$ , Dehnung  $1,15 \pm 0,44$ . Es zeigte sich keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss der Dehnung.

### 3.2.3. Mechanische Dehnung hat keine Zellschädigung der hCASM Zellen zur Folge

Durch die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand sollte bei langsamer Konfluenz der hCASM Zellen zum einen sichergestellt werden, dass vor mechanischer Dehnung kein vermehrter Zelltod vorlag. Zum anderen sollte durch den Vergleich der LDH-Aktivität vor und nach Dehnung der Einfluss einer dehnungsinduzierten Zellschädigung auf die Messung der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität von hCASM Zellen ausgeschlossen werden.

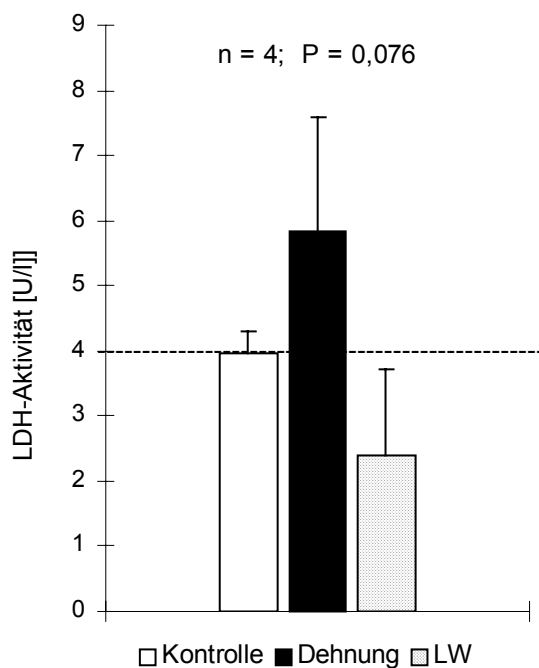
Unter Bedingungen mit serumarmem Ruhemedium war nach Dehnung der hCASM Zellen eine nicht-signifikant veränderte LDH-Aktivität von +47,84% zu sehen (in Kontrolle  $3,95 \pm 0,34$  U/l, in Dehnung  $5,85 \pm 1,73$  U/l, Leerwert  $2,41 \pm 1,32$ ;  $n=4$ ,  $P=0,076$ ; **Abb. 21**).

Die LDH-Aktivität unter Vollmedium zeigte eine nicht-signifikante Veränderung um +11,93% (in Kontrolle  $13,52 \pm 1,41$  U/l, in Dehnung  $15,13 \pm 3,64$  U/l, Leerwert  $9,63 \pm 3,64$ ;  $n=3$ ,  $P=0,51$ ; **Abb. 22**).

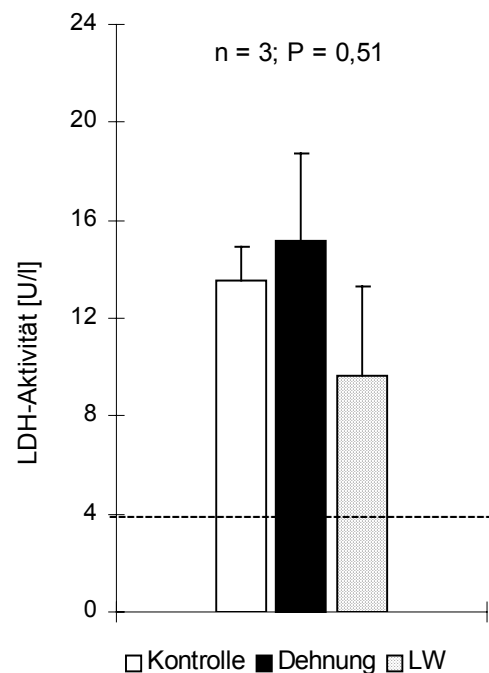
Die LDH-Messungen im Zellüberstand zeigten sowohl bei Verwendung von serumarmem Ruhemedium, als auch bei Vollmedium keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Dehnung und Kontrolle.

Dass die Messwerte der LDH-Aktivität unter Vollmedium sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung persistierend höher waren als diejenigen unter serumfreiem Ruhemedium, lässt sich auf das FCS zurückführen. Abzulesen ist dies am höheren Leerwert unter Vollmedium.

Wie bei den Versuchen mit hAOSM Zellen lagen die gemessenen Werte für die LDH-Aktivität nach Abzug des Leerwertes stets im niedrigsten von dieser Methode erfassbaren Bereich von 0,001 E/min (entsprechend 4 U/l).



**Abb. 21** LDH-Aktivität [U/l] im Überstand von hCASM Zellen mit serumarmem Medium nach 48 Stunden Dehnung im Vergleich mit Kontrolle und Leerwert (LW). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss der Dehnung



**Abb. 22** LDH-Aktivität [U/l] im Überstand von hCASM Zellen mit Vollmedium nach 48 Stunden Dehnung im Vergleich mit Kontrolle und Leerwert (LW). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss der Dehnung.

Die Nachweisgrenze der LDH-Aktivität ist in beiden Abbildungen mittels unterbrochener Linie in Höhe von 4 U/l eingezeichnet.

Für die hCASM Zellen, wie auch für die hAOSM Zellen, lässt sich damit zeigen, dass keine dehnungsinduzierte Zellschädigung vorliegt. Somit sind die Messungen der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität nicht durch eine dehnungsinduzierte Zellschädigung beeinflusst.

### 3.3. Restenosemodell:

#### Kann die Situation nach einer PTCA im Zellkulturmodell nachgestellt werden?

In den Versuchen unter 3.1. und 3.2. war der Einfluss physiologischer mechanischer Dehnung auf humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta und der Koronararterien untersucht worden. Dabei konnte für die niedrigen Passagen der hAOSM Zellen eine Abnahme der DNA-Synthese unter dem Einfluss physiologischer mechanischer Dehnung gezeigt werden. Nach pathologischer Dehnung im Rahmen einer PTCA besteht klinisch die Problematik, dass sich eine Restenose entwickeln kann. Es wird vermutet, dass der Restenose eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zugrunde liegt. In den folgenden Untersuchungen interessierte demnach der Einfluss pathologischer Dehnung auf humane vaskuläre glatte Muskelzellen. Mit vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta eines 2,5 Monate alten europäischen Spenders (hAOSM) sollte möglichst die Situation einer Restenose, welche sich in den ersten sechs Monaten nach erfolgter PTCA entwickelt, nachvollzogen werden. Vorlage für die Dehnung waren entsprechend praxisnahe Werte einer PTCA für Frequenz, Dauer und angelegten Druck [21]. Nach erfolgter Dehnung wurde die DNA-Synthese, die metabolische Aktivität sowie der Zelltod einen Monat lang zu verschiedenen Zeitpunkten parallel bestimmt.

Dazu wurden hAOSM Zellen parallel auf vier Bioflexmembranplatten (je 3 Well Dehnung, 3 Well Kontrolle, n=4) ausgesät und auf Vollmedium bis zu konfluentem Wachstum belassen (8 Tage). Zwei Tage vor der Dehnung wurde auf serumarmes Medium gewechselt. Die Dehnung erfolgte viermal für 120 Sekunden mit dazwischen liegenden Relaxationszeiten von 30 Sekunden. Gedeht wurde dabei im technischen Maximalbereich (für Bioflex) von 15%, bis 80kPa.

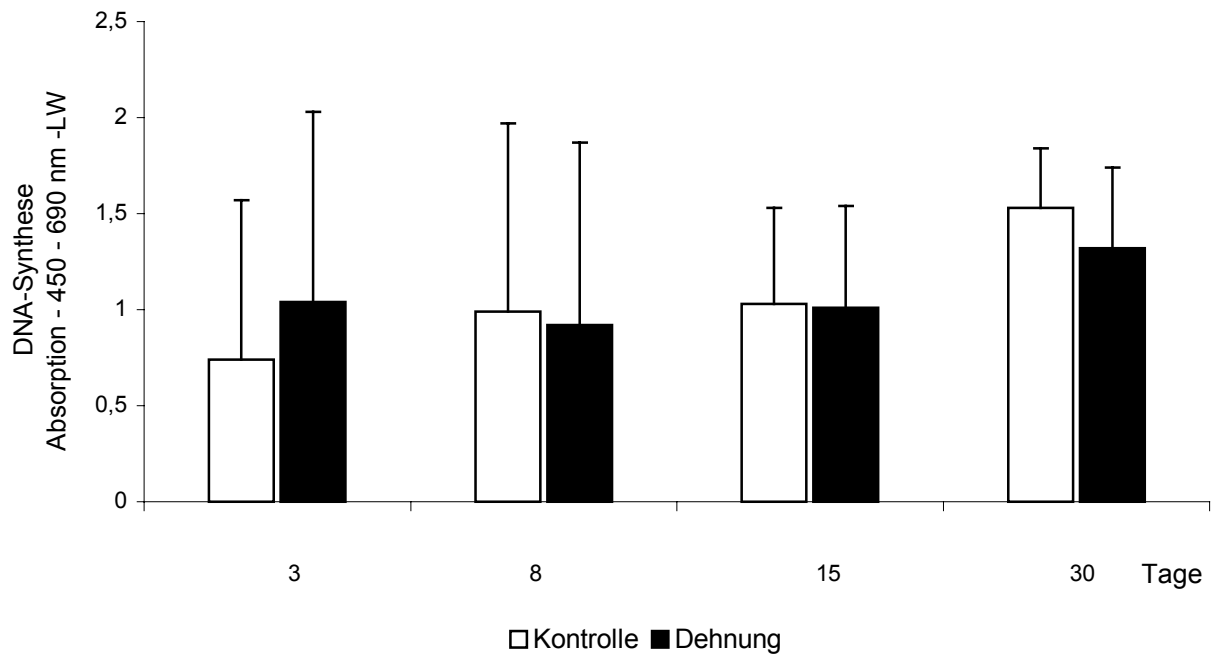
Vor und nach der Dehnung wurde die LDH-Aktivität im Überstand als Maß für den Zelltod bestimmt. Im Abstand von 3, 8, 15 und 30 Tagen nach der Dehnung wurde die DNA-Synthese bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden Leerwerte für Kontrolle und Dehnung mitgeführt.

Für den Zeitraum zwischen der Dehnung und der Bestimmung der DNA-Synthese wurde jeden zweiten oder dritten Tag das serumarme Medium gewechselt.

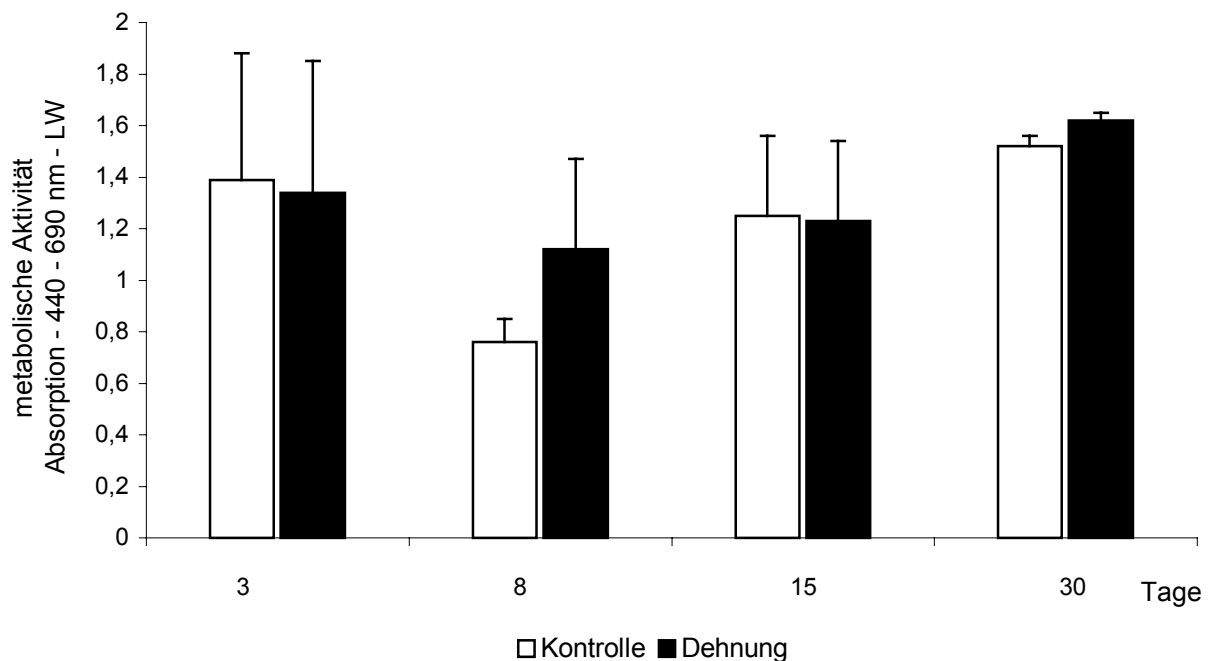
Unmittelbar vor der Inkubation mit BrdU wurde bei den jeweiligen hAOSM Zellen nochmals eine LDH-Aktivitätsbestimmung vorgenommen. Die BrdU-Inkubation erfolgte in der Regel mit 10µmol/l BrdU für 48 Stunden. Die metabolische Aktivität wurde parallel mittels Wst-1-Spaltung bestimmt.

Die DNA-Synthese zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Dehnung (3 Tage nach Dehnung: K  $0,74 \pm 0,83$ , D  $1,04 \pm 0,99$ ,  $P=0,76$ ; nach 8 Tagen: K  $0,99 \pm 0,98$ , D  $0,92 \pm 0,95$ ,  $P=0,94$ ; nach 15 Tagen: K  $1,03 \pm 0,05$ , D  $1,01 \pm 0,53$ ,  $P=0,97$ ; nach 30 Tagen: K  $1,53 \pm 0,31$ , D  $1,32 \pm 0,42$ ,  $P=0,6$ ; n=4, **Abb. 23a**).

Die metabolische Aktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Dehnung (3 Tage nach Dehnung: K  $1,39 \pm 0,49$ , D  $1,34 \pm 0,51$ ,  $P=0,93$ ; nach 8 Tagen: K  $0,76 \pm 0,09$ , D  $1,12 \pm 0,35$ ,  $P=0,43$ ; nach 15 Tagen: K  $1,25 \pm 0,31$ , D  $1,23 \pm 0,31$ ,  $P=0,97$ ; nach 30 Tagen: K  $1,52 \pm 0,04$ , D  $1,62 \pm 0,03$ ,  $P=0,06$ ; n=4, **Abb. 23b**).



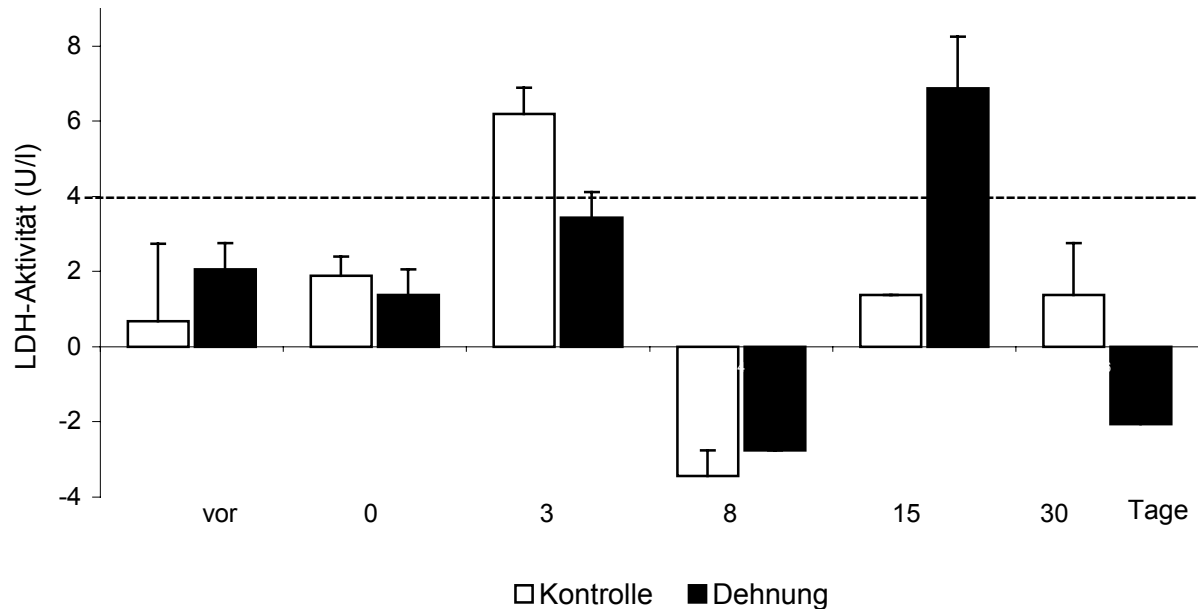
**Abb. 23a** DNA-Synthese (BrDU-Inkorporation) hAOSM Zellen 3, 8, 15 und 30 Tage nach Dehnung. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Dehnung und Kontrolle hinsichtlich der metabolischen Aktivität.



**Abb. 23b** metabolische Aktivität (Wst-1-Spaltung) hAOSM Zellen 3, 8, 15 und 30 Tage nach Dehnung. Absorption unter Abzug des Leerwertes (LW). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Dehnung und Kontrolle hinsichtlich der metabolischen Aktivität.

Die LDH-Aktivität zeigte zwischen Kontrolle und Dehnung weder vor noch nach Dehnung signifikante Unterschiede (n=4, **Abb. 23c**).

Die im Überstand gemessene LDH-Aktivität lag meist unterhalb der Nachweisgrenze (niedrigste erfassbare Aktivität in diesem Test bei 0,001 E/min bei 340 nm, entsprechend 4 U/l). Die negativen Werte für die LDH-Aktivität kamen durch Abzug des Leerwertes von bereits sehr niedrigen Werten der LDH-Aktivität zustande.



**Abb. 23c** LDH-Aktivität (U/l) im Überstand vor Dehnung sowie unmittelbar nach der Dehnung und zu vier weiteren Zeitpunkten nach Dehnung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Dehnung und Kontrolle hinsichtlich der LDH-Aktivität. Die Nachweisgrenze der LDH-Aktivität ist mittels unterbrochener Linie in Höhe von 4 U/l eingezeichnet.

Die Langzeitversuche über einen Zeitraum von einem Monat nach Dehnung von hAOSM Zellen haben weder hinsichtlich der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität noch hinsichtlich des Zelltodes signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Dehnung gezeigt.

Die Restenose nach PTCA scheint auf diesem Wege nicht reproduzierbar zu sein. In vivo könnte bei der Entwicklung einer Restenose die Wirkung der Kofaktoren im Vordergrund stehen.

## 4. Diskussion

---

Blutgefäße werden permanent mechanisch in Form von zyklischer mechanischer Dehnung durch den pulsatilen Charakter des Blutflusses und der damit einhergehenden Scherspannung beansprucht. Hinzu kommt eine druckbedingte zirkumferentielle Wandspannung. Kommt es zu einer Veränderung der einwirkenden mechanischen Kräfte, vollziehen Arterien ein kompensatorisches Remodeling. Dementsprechend können bei Veränderungen des Blutdrucks Veränderungen der Gefäßwandstärke im Ansatz zu einer Normalisierung der zirkumferentiellen Wandspannung führen. Ebenso wird bei Veränderungen der Blutflussrate die Scherspannung über eine Anpassung des Gefäßdurchmessers wirksam.

Ein solches Remodeling als Antwort auf hämodynamische Einflüsse beeinflusst nicht zuletzt die Entwicklung von Gefäßerkrankungen wie im Fall des Bluthochdrucks und der Arteriosklerose.

Die dehnungsmodulierte Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen wird als einer der bestimmenden Faktoren in der Pathogenese des Bluthochdrucks, der Arteriosklerose und der Restenose nach therapeutischen Gefäßeingriffen diskutiert.

Obwohl diese Vorgänge Thema bereits zahlreicher zum Teil sehr unterschiedlich angelegter Untersuchungen waren, wird nach wie vor kontrovers diskutiert, ob zyklische mechanische Dehnung zu einer Zunahme oder zu einer Abnahme des Zellwachstums glatter Muskelzellen führt.

Die unterschiedlichen und teils widersprüchlichen Ergebnisse im Vergleich mit dieser Arbeit aber auch der verschiedenen zitierten Arbeiten untereinander sind möglicherweise nicht zuletzt auf die variierenden zugrundeliegenden Parameter zurückzuführen. Von Arbeit zu Arbeit bestehen nicht nur Unterschiede in Dauer, Amplitude und Rhythmus der angelegten mechanischen Dehnung, sondern es variieren zudem die Passagenzahl, die Messintervalle und –zeitpunkte, die Bestimmungsart sowie das zur Untersuchung verwendete Material (human/Tiermodell, unterschiedlicher Entnahmeort).

Eine Zunahme der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen unter Verwendung unphysiologischer mechanischer Dehnung im Sinne eines Hochdruckmodells wurde bereits für vaskuläre glatte Muskelzellen von Menschen [10, 191, 250], Kaninchen und Ratten [245] beschrieben. Dieser Vorgang könnte für die Restenose nach Ballonangioplastie verantwortlich sein.

In vitro wird die Proliferation unter anderem auf die autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren wie PDGF oder Angiotensin II zurückgeführt. So zeigten Untersuchungen an vaskulären glatten Muskelzellen neonataler Ratten von Reusch et al. [196] und von Wilson et al. [245], dass zyklische mechanische Dehnung im Sinne eines Hochdruckmodells (Flexcell-Platten, bis 20 kPa) zu einer Zunahme der Proliferation führt, welches in beiden Untersuchungen auf eine Sekretion und autokrine Wirkung von PDGF zurückgeführt werden konnte.

Hinterfragt wurde die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen in primären und restenostischen Gefäßläsionen durch die Untersuchungen von O'Brien et al. [169]. Es wurde die Expression von PCNA

(proliferating cell nuclear antigen), einem Marker für Zellteilung und Proliferation, welcher vornehmlich in der S-Phase des Zellzyklus produziert wird, an primären und restenotischen humanen Atherektomiepräparaten der Koronararterien untersucht. Die Ergebnisse legten nahe, dass die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen sowohl in primären als auch in restenotischen Gefäßläsionen selten und lediglich auf niedrigem Niveau auftritt. Dies ließ nicht zuletzt an der Übertragbarkeit etablierter Tiermodelle bezüglich des Gefäßsystems auf den Menschen zweifeln und mag einer der Gründe dafür sein, dass zahlreiche der bisherigen therapeutischen Herangehensweisen fehlschlügen.

Ganz im Gegensatz zu dem Großteil der bereits erwähnten auf Hochdruckmodellen basierenden Arbeiten zeigten Chapman et al. [39] sowie Hipper et al. [105] eine Abnahme der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen unter dem Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung (Bioflex-Platten, 10 bzw. 5% Dehnung, 48 h).

So fanden Hipper et al. [105] unter dynamischen Bedingungen an embryonalen Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten (A10-Zelllinie), dass physiologische zyklische mechanische Dehnung zu einer Abnahme der DNA-Synthese führt.

Und Chapman et al. [39] konnten an vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten nachweisen, daß eine physiologische Dehnung dieser Zellen in Kultur zu einer Hemmung der Proliferation aufgrund einer Unterbrechung des Zellzyklus infolge Rb-Phosphorylierung durch p21-Protein führt.

Zahlreiche Studien haben inzwischen die Regulation des Wachstums von vaskulären glatten Muskelzellen in vitro untersucht. Diese Untersuchungen wurden jedoch zum einen vornehmlich unter statischen oder auf Hochdruckmodellen basierenden Bedingungen und zum anderen nicht an humanen Gefäßmuskelzellen vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher unabhängig von Veränderungen des Endothels oder Faktoren der Thrombogenese der Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen des Menschen untersucht werden. Dabei zeigte sich für humane aortale glatte Muskelzellen, dass physiologische zyklische mechanische Dehnung (Bioflex-Platten, 5% Dehnung, 72 h) eine Verminderung der Proliferation zur Folge hat. Ähnliche Veränderungen zeigten sich für koronare glatte Muskelzellen (Bioflex-Platten, 5% Dehnung, 48 h), jedoch waren diese nicht signifikant. Parameter der Zellschädigung und der Apoptose blieben dabei unverändert.

Eine signifikante Abnahme der DNA-Synthese humaner aortaler glatter Muskelzellen unter dem Einfluss von Dehnung konnte in dieser Arbeit jedoch nur für die niedrigen Passagen gezeigt werden. In den höheren Passagen der hAOSM Zellen sowie in den Versuchen mit hCASM Zellen bestand keine signifikante Veränderung, ob nun Zunahme oder Abnahme der DNA-Synthese, infolge physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung. Bei gleichbleibender Versuchsanordnung konnte für die nicht mehr detektierbare dehnungsinduzierte Abnahme der DNA-Synthese der hAOSM Zellen in höherer Passage und für die hCASM Zellen nur die Passagenzahl bzw. die Verweildauer in Zellkultur ermittelt werden. Die Passagenzahl bringt in jeder primären Zellkultur das Problem der Entdifferenzierung mit sich. Im Falle der vaskulären glatten Muskelzellen ist die Entdifferenzierung der Zellen in Zellkultur mit einer Modulation des Phänotyps ausführlich von Birukov et al. [22, 23] und Campbell et al. [32] – wie auf



Seite 54 ausgeführt – untersucht worden. Campbell et al. [32] führen zudem aus, dass bei längerem Verbleib in Zellkultur mit spontanem Wechsel zum sekretorischen Phänotyp trotz Konfluenz die vaskulären glatten Muskelzellen in einem irreversiblen sekretorischen Zustand verbleiben. Gemäß Ross und Kariya [32] ist der Verlust der Reversibilität des Phänotypes nicht auf ein Altern zurückzuführen. Die vaskulären glatten Muskelzellen im irreversiblen sekretorischen Zustand vollziehen aber schliesslich den Prozess des Alterns.

Auch andere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass zyklische mechanische Dehnung die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen nicht stimuliert. Dies unterstützt die Annahme, dass in vivo zyklische mechanische Dehnung einen antiproliferativen Effekt besitzen könnte. So fanden Ballyk et al. [14], dass eine Unterdrückung der Pulsweite zu einer Hyperplasie von Gefäßmuskelzellen und zu einer Gefäßstenose arterieller Grafts oder an Nahtlinien führen kann.

Auch unter Verwendung von Hochdruckmodellen, welche nachfolgend zusammengefasst sind, konnten weitere Autoren eine Reduzierung der Proliferationsrate aufgrund zyklischer mechanischer Dehnung während der ersten drei Tage der Dehnung nachweisen (Sumpio BE [226]).

Ebenfalls für humane aortale vaskuläre glatte Muskelzellen (9 Jahre alter Donor) verzeichneten Papadaki et al. [182] mittels PCNA-Immunfluoreszenz eine Abnahme der Proliferation unter flüssigkeitsbedingter Scherspannung (5-25 dyn/cm<sup>2</sup>, 24 h). Papadaki et al. diskutieren damit einen homöostatischen Effekt von blutflussbedingter Scherspannung für die vaskulären glatten Muskelzellen der Media in normalen arteriellen Gefäßen.

Bei vergleichenden Untersuchungen an Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen fand sich bei weiteren Arbeitsgruppen keine Zunahme der Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen infolge zyklischer mechanischer Dehnung.

Banes et al. [9] zeigten so im Vergleich von endothelialen Zellen der Aorta von Ratten und humaner vaskulärer glatter Muskelzellen der Umbilikalvene, daß zyklische mechanische Dehnung (Flexcell-Platten, 15-18% Dehnung, 1 bis 3 Tage) zu einer vermehrten DNA-Synthese der Endothelzellen, jedoch nicht der vaskulären glatten Muskelzellen führt. Diese proliferierten erst unter Zugabe von Wachstumsfaktoren wie PDGF und IGF-I.

Sumpio et al. [226] verglichen Endothelzellen mit vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta von Schweinen. Im Rahmen siebentägiger zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, 24% Dehnung) fanden sie im Gegensatz zu dem Verhalten von Endothelzellen eine Hemmung der Proliferation sowie eine Abnahme der Zellzahl vaskulärer glatter Muskelzellen.

Ebenso konnten Dethlefsen et al. [58] unter zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, 27% Dehnung, 4-12 Tage) eine Zunahme der Zellzahl von Endothelzellen der Aorta von Rindern im Gegensatz zu einer unveränderten Zellzahl für vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta von Rindern sowie des Menschen nachweisen.

Damit zeigt sich, dass physiologische, aber auch unphysiologische (inhomogene) zyklische mechanische Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen - wie auch in der vorliegenden Arbeit bei hAOSM und hCASM Zellen - entweder einen antiproliferativen oder zumindest keinen proliferativen Einfluss hat. Dies würde die Vermutung zulassen, dass – im Gegensatz zu Endothelzellen – eine

Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen in vivo nicht auf den Einfluss mechanischer Dehnung selbst, sondern vielmehr auf den Einfluss anderer dehnungsinduzierter Faktoren der Gefäßwand zurückzuführen ist – wie dies bereits Banes et al. [9] mit der Zugabe von Wachstumshormonen wie PDGF und IGF-I veranschaulichten. Jedoch existieren auch hier widersprüchliche Ergebnisse. So zeigten sowohl Calara et al. [30] als auch Wilson et al. [245] an vaskulären Muskelzellen aus der Aorta von Ratten, dass im Rahmen angewandter Dehnung (Druck mit einem Plastikröhrchen 10 sec; zyklische mechanische Dehnung Flexercell-Platten, 15-20 kPa, bis 54 h) über die autokrine Expression von sowohl FGF als auch PDGF eine vermehrte DNA-Synthese induziert wird. Hipper et al. [105] jedoch fanden im Rahmen der Untersuchungen an vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta embryonaler Ratten (A10 Zelllinie) weder eine signifikante Veränderung der DNA-Synthese noch der Wst-1 Aktivität bei Inkubation vaskulärer glatter Muskelzellen mit dem Medium gedehnter Zellen.

In weiteren Untersuchungen zeigten Dethlefsen et al. [58], dass sowohl die Verwendung von Medium gedehnter als auch ungedehnter subkonfluenter Endothelzellen auf vaskuläre glatte Muskelzellen einen proliferativen Effekt hat. Das Medium gedehnter konfluenter Endothelzellen hatte im Gegensatz dazu einen proliferationshemmenden Effekt auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Weiterführend waren zudem ihre Untersuchungen an humanen vaskulären glatten Muskelzellen der Vena saphena und der Aorta. Zyklische mechanische Dehnung (Flexcell-Platten, 27% Dehnung, 9 Tage) hatte demnach keinen Einfluss auf das Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen der Aorta im Gegensatz zu einer dehnungsinduzierten Proliferation der Zellen der Vena saphena.

Ebenso zeigten Predel et al. [192] bei einem Vergleich von humanen vaskulären glatten Muskelzellen aus der Vena saphena und aus der A. mammaria interna, dass nach 2 und 6 Tagen zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, bis 25% Dehnung) sowohl die DNA-Synthese als auch die Zellzahl venöser vaskulärer glatter Muskelzellen zunimmt. Die Zellzahl der vaskulären glatten Muskelzellen aus der Arterie blieb jedoch konstant. Dies lässt die Vermutung zu, daß der Entnahmeort der vaskulären glatten Muskelzellen eine Rolle bei der Reaktion auf mechanische Dehnung spielen könnte. Die unterschiedliche Reaktion vaskulärer glatter Muskelzellen aus Arterien und Venen unter dem Einfluss mechanischer Dehnung ließe sich möglicherweise auf die voneinander abweichende Gefäßwandarchitektur von Arterien und Venen sowie auf das unterschiedliche Verhältnis der muskulären und elastischen Anteile in der Gefäßwand bei in der Regel dünnerer Gefäßwand der Venen zurückführen. Letztendlich könnte dies das unterschiedliche Verhalten vaskulärer glatter Muskelzellen der Arterien und Venen auf den Einfluss mechanischer Dehnung bedingen. Die unterschiedliche Reaktion vaskulärer glatter Muskelzellen zwischen Arterien unterschiedlicher Lokalisation unter dem Einfluss mechanischer Dehnung könnten möglicherweise auf der Unterscheidung von Arterien vom muskulären und elastischen Typ beruhen. Dies könnte die z.T. widersprüchlichen Aussagen der verschiedenen Forschungsgruppen bezüglich des Verhaltens vaskulärer glatter Muskelzellen unter mechanischer Dehnung erklären.

Auf dem Boden eines Hochdruckmodells (Flexcell-Platten, bis 25% Dehnung, 24 h) konnten Yang et al. [251] an humanen vaskulären Muskelzellen der Koronararterien mittels 3H-Thymidin-Inkorporation

eine Zunahme der Proliferation nach 24 Stunden und eine Zunahme der Zellzahl nach 6 Tagen nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten weder die höheren Passagen der verwendeten hAOSM Zellen noch die Versuche mit hCASM Zellen eine Veränderung der Proliferation unter dem Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung (Bioflex, 5% Dehnung, 48 h).

Bereits nach Passagieren der Zellen zeigten die hCASM Zellen ein zwar konstantes, aber ausgesprochen langsames Wachstum. Gemäß dem auch in vivo vorliegenden niedrigen Mitoseindex vaskulärer glatter Muskelzellen war dies in der Versuchsführung gewünscht. Jedoch nicht nur das langsame Zellwachstum gestaltete die Versuchsdurchführung schwierig, sondern auch die Messung sehr niedriger BrDU-Werte, welche nur wenig über den gemessenen Werten für den mitgeführten Leerwert lagen. Dadurch konnten lediglich sehr kleine – nicht signifikante - Unterschiede festgestellt werden.

Die signifikante Abnahme der DNA-Synthese der hAOSM Zellen unter dem Einfluss physiologischer Dehnung wurde zusätzlich durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl unter dem Lichtmikroskop beleuchtet. Es konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und Dehnung festgestellt werden.

Durch den niedrigen Mitoseindex der hAOSM Zellen sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung (von 0,16 bzw. 0,09 %) erklärt sich, warum trotz signifikanter Abnahme der DNA-Synthese unter Dehnung keine Änderung der Gesamtzellzahl detektiert werden kann. Um einen Unterschied in der Zellzahl zu detektieren, wäre eine Veränderung notwendig, welche bei vorliegendem niedrigen Mitoseindex erst nach einem vergleichsweise langen Zeitraum auftreten würde. Nach 72 h liegen demnach vermutlich nur so minimale Unterschiede in der Zellzahl vor, dass diese zu diesem Zeitpunkt nicht nachvollzogen werden können.

Um zusätzlich eine Aussage zur Zellaktivität der hAOSM und hCASM Zellen zu treffen, wurde parallel zur DNA-Synthese die metabolische Aktivität der vaskulären glatten Muskelzellen untersucht. Bei signifikanter Abnahme der DNA-Synthese von hAOSM Zellen unter physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung war die metabolische Aktivität, gemessen mittels Wst-1-Spaltung, sowohl bei aortalen als auch koronaren glatten Gefäßmuskelzellen nach Dehnung erhöht. Die Wst-1-Spaltung dient zur Messung der gesamten Menge an Zellen sowie zur Messung der metabolischen Aktivität. Da bereits eine messbare Veränderung der Zellzahl ausgeschlossen wurde, schreiben wir die erhöhte Wst-1-Spaltung einer regulären Zellaktivität zu. Eine erhöhte Zellaktivität könnte im Rahmen eines veränderten Phänotyps diskutiert werden.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass die Diskrepanz zwischen verminderter bzw. unveränderter DNA-Synthese und erhöhter metabolischer Aktivität sowie die unveränderte Zellzahl durch eine verstärkte Nekrose oder Apoptose bedingt ist.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand – zur Verifizierung des nekrose-bedingten Zelltodes – zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Dehnung. Vor und nach Dehnung in Kontrolle und Dehnung wurden bei der Bestimmung der LDH-Aktivität Werte gemessen, welche sich

im unteren mit dieser Methode bestimmbar Bereich befanden. Sodass daraus geschlossen werden kann, dass die Zellvitalität von der angelegten physiologischen zyklischen mechanischen Dehnung nicht beeinträchtigt worden ist. Es könnte sich lediglich um minimalste Veränderungen handeln, welche möglicherweise von der verwendeten Methode nicht erfasst werden.

Die Apoptoserate war insgesamt sehr niedrig und wurde durch die physiologische zyklische mechanische Dehnung in der vorliegenden Arbeit nicht beeinflusst.

Bauriedel et al. [13] zeigten im Vergleich von restenotischen und primär arteriosklerotischen Läsionen bei stabiler Angina pectoris an humanen Atherektomiepräparaten einen erhöhten Zelltod infolge Apoptose und stark verminderter Dichte an vaskulären glatten Muskelzellen in primär arteriosklerotischen Läsionen im Vergleich zu restenotischen Läsionen. Es fanden sich jedoch keine Unterschiede bezüglich der Nekrose. Wichtig für die Entwicklung einer Restenose nach Gefäßintervention könnte demnach die niedrige Apoptoserate in solchen Läsionen sein. In vivo scheinen Arteriopathien mit einem erhöhten apoptotisch bedingten Zelluntergang einherzugehen. Andererseits stellten Bayer et al. [15] einen verminderten Blutfluss respektive eine verminderte Wandspannung durch Anlegen einer Manschette an einer A. carotis von Kaninchen durch Segmente der kontralateralen A. carotis her. Dies erfolgte für einen Zeitraum von sechs Monaten. Es zeigte sich, dass in vivo eine verminderte Gefäßwandspannung mit atrophem Remodeling des Gefäßes insbesondere der Media infolge erhöhter Apoptose einhergeht. Es fand sich neben dem damit einhergehenden erniedrigten DNA-Gehalt ein Verlust an Kollagen und Elastin unter erhöhter Expression von Matrixmetalloproteinasen.

Demnach wäre eine erhöhte Apoptoserate ungedehnter gegenüber gedehnter Zellen zu erwarten.

Im vorliegenden in vitro System konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Dehnung hinsichtlich der Apoptose festgestellt werden.

Damit ist für das vorliegende in vitro System ausgeschlossen, dass eine durch physiologische zyklische mechanische Dehnung induzierte Abnahme der DNA-Synthese auf Nekrose oder Apoptose bedingten Zelltod zurückzuführen ist.

Aufgrund der verminderten DNA-Synthese der frühen Passagen von hAOSM Zellen diskutieren wir einen in vivo vorhandenen antiproliferativen Effekt zyklischer mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen. Zumindest nicht im Widerspruch dazu zeigte sich für die höheren Passagen der hAOSM Zellen sowie für die hCASM Zellen kein Einfluss der zyklischen mechanischen Dehnung auf die DNA-Synthese.

Übereinstimmend damit, zeigte – wie bereits erwähnt – Chapman et al [39] an vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten, daß physiologische zyklische Dehnung zu einer Hemmung der Proliferation aufgrund eines Arrestes des Zellzyklus führt. Damit könnte physiologische zyklische Dehnung in vivo ein Gleichgewicht der Vorgänge in der Gefäßwand durch Hemmung der Proliferationskette bedingen.

So konnten Gordon et al. [96] an humanen arteriosklerotisch veränderten Koronararterien und der A. mammaria interna ohne arteriosklerotische Veränderungen mittels PCNA-Reaktivität zeigen, dass in

beiden sehr niedrige Proliferationsraten von vaskulären glatten Muskelzellen (Index PCNA positiver Zellen <1%) vorliegen.

Dieser antiproliferative Effekt ist demnach antagonistisch zu den proliferativen Faktoren, welche von und auf Bestandteile der Gefäßwand wirken, zu sehen. Indikator dafür ist der in vivo niedrige Mitoseindex [39, 169]. Man vermutet, daß unter physiologischen Bedingungen weniger als 0,5% der vaskulären glatten Muskelzellen zum gleichen Zeitpunkt der Zellteilung unterliegen. Der Mitoseindex wird mit 0,01-0,05 veranschlagt.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass zyklische mechanische Dehnung in vivo einen wichtigen Einfluss auf die Gefäßwand hat, ist die bereits erwähnte Untersuchung von Bayer et al. [15], hierbei ging in vivo eine verminderte Gefäßwandspannung mit atrophem Remodeling infolge erhöhter Apoptose einher.

Weiterführend haben O'Brien et al. [169] im Rahmen ihrer Untersuchungen an Atherektomiepräparaten humaner primärer und restenotischer Koronararterien einen interessanten Gedanken formuliert. Die von O'Brien et al. dargestellte niedrige Proliferationsrate der vaskulären glatten Muskelzellen widerspricht nicht angiografischen Untersuchungen, denenzufolge die Entwicklung einer geringgradigen zu einer mittelgradigen primären arteriosklerotischen Läsion ein relativ langsamer Prozess ist (<20% Grad Stenose pro Jahr). Vielmehr kann eine sehr niedrige Proliferationsrate bereits zu einer beträchtlichen Massenzunahme in der Gefäßwand führen. Laut O'Brien et al. führt beispielsweise eine Verdopplung einer  $1\text{mm}^3$  großen Masse pro Woche zu einer  $1\text{cm}^3$  grossen Masse in drei Monaten. Und das ist bei Weitem mehr als gemeinhin für eine relevante Stenose zutrifft.

Nicht ausser acht zu lassen ist im Rahmen der detektierten Veränderungen in der vorliegenden sowie den zitierten Arbeiten der Einfluss des vorliegenden Phänotyps auf die Reaktion der vaskulären glatten Muskelzellen unter physiologischer als auch unphysiologischer zyklischer mechanischer Dehnung. Birukov et al. [22, 23] zeigten an vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta neonataler Kaninchen, dass eine Modulation des kontraktilen zum sekretorischen Phänotypen der Zellen in vitro zum einen bei hoher Ausgangsdichte der Zellen ( $12,5 \times 10^4\text{Zellen/cm}^2$ ), zum anderen bei Verwendung des Serumersatzes Monomed später erfolgt. Frühestens jedoch verloren die vaskulären glatten Muskelzellen ihre Fähigkeit zur Kontraktilität nach 7 Tagen, spätestens nach 13 Tagen. Die damit veränderte Sekretionsleistung bzw. Reaktion auf zyklische mechanische Dehnung, wie sie bereits mehrfach untersucht worden ist [22, 23, 30, 31], ist bei der vorliegenden Arbeit die naheliegende Ursache für die veränderte Reaktion der hAOSM Zellen unter Dehnung in höheren Passagen. Ebenso könnte dies für die fehlende Reaktion der hCASM Zellen gegenüber der zyklischen mechanischen Dehnung zutreffen. Diese befanden sich zwar nicht in einer höheren Passage, jedoch war aufgrund des ausgesprochen langsamen Zellwachstums vor Dehnung eine längere Zeit in Kultur notwendig. Darüberhinaus zeigten Campbell et al. [32] sowie Ang et al. [4], dass in Kultur vaskuläre glatte Muskelzellen zwar eine Modulation des kontraktilen Phänotyps zum sekretorischen Phänotyp vollziehen, jedoch bei damit verbundener Proliferation nach Zusammenwachsen auf der Kulturfläche wieder zum kontraktilen Phänotyp zurückkehren.

So könnten die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der höheren Passagen von hAOSM Zellen sowie der hCASM Zellen am ehesten im Rahmen einer Entdifferenzierung oder Veränderung des Phänotypes mit steigender Passagenzahl bzw. längerer Kulturzeit zu werten sein. Ebenso sind eventuell die widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen zu erklären. Prinzipiell kommt als Ursache dafür auch die Verwendung von humanen Zellen zum einen sowie von Tiermodellen zum anderen in Betracht.

Als nachteilig hat sich im Nachhinein erwiesen, dass die humanen Zellen aus der Aorta und aus einer Koronararterie zum einen von einem 2,5 Monate alten männlichen Europäer und zum anderen von einem 48 Jahre alten männlichen Europäer stammen. Dies lässt jetzt bei den Ergebnissen der hAOSM Zellen und der hCASM Zellen keinen Vergleich zu. Zudem bestehen – was zumindest bei dem 48 Jahre alten Spender von Interesse sein könnte – keine Informationen zum Gefäßstatus bzw. ob die Entnahme aus einem arteriosklerotischen Plaque erfolgte.

Im vorliegenden in-vitro-Modell weisen die Ergebnisse unter Verwendung humaner vaskulärer glatter Muskelzellen der Aorta darauf hin, dass physiologische zyklische mechanische Dehnung selbst einen antiproliferativen Effekt hat. Wie unter anderem von Campbell et al. [32] dargelegt, ist für die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen eine Modulation vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp erforderlich, was auch als Dedifferenzierung beschrieben wird. Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich des antiproliferativen Effektes physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung auf hAOSM Zellen der früheren Passagen kann von einem stärker differenzierten Zustand der hAOSM Zellen ausgegangen werden, welcher dem kontraktilen Phänotyp entspricht. So dass unter physiologischen Bedingungen die zyklische mechanische Dehnung den differenzierten, kontraktilen Phänotyp sichern könnte [23, 196]. Abweichungen davon – in Form einer Gefäßwandschädigung z.B. bei Ballonkatheterisation oder Gefäßnaht – gehen gemäß Poole et al. [32] mit einem zunehmenden Verlust der Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen in Richtung der Läsion einher. Dies wiederum ist mit einer höheren Stoffwechselrate verbunden und entspricht einem sekretorischen Phänotyp.

So könnte zyklische mechanische Dehnung im Zusammenspiel mit vaskulären glatten Muskelzellen - in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen für vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta - als Gegenspieler zu den Faktoren zu verstehen sein, welche die Entwicklung einer arteriosklerotischen oder restenotischen Gefäßläsion bedingen. Physiologische zyklische mechanische Dehnung gewährleistet somit direkt über die Wirkung auf vaskuläre glatte Muskelzellen ein Gleichgewicht der Vorgänge in der Gefäßwand. Unter Verwendung humaner vaskulärer glatter Muskelzellen der Koronararterien zeigte physiologische zyklische mechanische Dehnung keinen Einfluss, demnach weder einen antiproliferativen noch einen proliferativen Effekt.

Um ein besseres Verständnis dieser komplexen Vorgänge zu erreichen, sollte in Zukunft eine engmaschigere und kleinstufigere Versuchsanordnung hinsichtlich Zeitverlauf und Dehnung vaskulärer glatter Muskelzellen mittels möglichst sensibler Methoden erfolgen. Wünschenswert wäre eine parallel dazu durchgeführte Phänotypisierung der vaskulären glatten Muskelzellen. Da die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von Tiermodellen und Modellen unter Verwendung humaner vaskulärer glatter Muskelzellen auffallen, sollte künftig möglichst auf humane Zelllinien oder Operationspräparate

zurückgegriffen werden. Möglich würde so ein umfassenderes Bild über die Vorgänge an und in der Gefäßwand unter dem Einfluss physiologischer Dehnung im Rahmen des pulsatilem Blutflusses. Dies könnte letztendlich auch Grundlage für ein Verständnis der der Pathologie zugrundeliegenden Veränderungen sein.

Die Restenose nach PTCA stellt in der Kardiovaskularmedizin ein wichtiges Problem dar.

Auf die betroffenen Patienten kommen nicht nur signifikant höhere Revaskularisierungsraten mittels PTCA und Stenting, sondern auch eine gehäuft notwendig werdende Bypassoperation zu. Letztenendes haben Patienten mit einer Restenose nach 10 Jahren follow up (NHLBI PTCA Register [33]) eine höhere Mortalität.

Da bisher hauptsächlich an Tiermodellen die Folgen einer PTCA untersucht worden sind, war in der vorliegenden Arbeit von Interesse, ob sich die Situation nach erfolgter PTCA in einem Zellkulturmodell mit humanen vaskulären glatten Muskelzellen nachstellen lassen würde.

Da der Restenose im Wesentlichen eine Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zugrunde liegen soll, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der Einfluss mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen in Abwesenheit sämtlicher zusätzlicher äußerer Faktoren untersucht.

Bei Entwicklung der Restenosen in einem definierten Zeitraum von sechs Monaten wurde in der vorliegenden Arbeit abweichend von den bereits durchgeführten Versuchen mit humanen aortalen Muskelzellen ein vergleichsweise längerer Beobachtungszeitraum von einem Monat gewählt. Wenngleich die PTCA in der Kardiovaskularmedizin in Koronararterien zum Einsatz kommt, wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, welche nahezu ausschliesslich an vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta von Tier oder Mensch arbeiteten, hAOSM Zellen verwendet. Zum anderen wurden hAOSM Zellen – in Anbetracht des geplanten Beobachtungszeitraumes von einem Monat – aufgrund des ausgesprochen langsamen Zellwachstums und der hohen Anfälligkeit der hCASM Zellen in Kultur diesen vorgezogen. Bei klinisch durchgeführter PTCA mit – entsprechend der Literatur [21] – 2 bis 4 Dilatationen mit ansteigenden Drücken von 2 bis maximal 10 atü (im Durchschnitt 4-6 atü, 2 atü=300 kPa) und Dilatationszeiten von 30 bis 120 Sekunden wurde im Zellkulturmodell eine viermalige Dehnung für die Dauer von 120 Sekunden mit einer Dehnung von 80 kPa, entsprechend einer Elongation von 15%, verwendet. Die Amplitude der Dehnung war begrenzt durch den technischen Maximalbereich der genutzten Flexercell strain unit. Weder die DNA-Synthese noch die metabolische Aktivität zeigte zwischen Kontrolle und Dehnung einen signifikanten Unterschied zu den verschiedenen Zeitpunkten nach mechanischer Dehnung. Wie in den Versuchen mit physiologischer Dehnung blieben die Parameter der Zellschädigung auch unter dem Einfluss unphysiologischer nicht zyklischer mechanischer Dehnung in Kontrolle und Dehnung unverändert, sodass ein Nekrose-bedingter Zelltod ausgeschlossen werden konnte.

Die Situation nach PTCA ließ sich im Zellkulturmodell an humanen vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta nicht nachstellen. In vivo könnte bei der Entwicklung einer Restenose die Wirkung der Kofaktoren im Vordergrund stehen.

Wenngleich die verwendete Dauer und Anzahl der Dehnung dem Maximum der in der Literatur bestehenden Angaben entsprach (Dilatationszeiten zwischen 30 und 120 sec, in der Regel 2-4 Dilatationen), muss jedoch beachtet werden, dass die verwendete Amplitude der Dehnung von der in vivo therapeutisch wirksamen abweicht (in vivo im Durchschnitt 2-6 atü, 2 atü=300 kPa), da der technische Maximalbereich der Flexercell strain unit bei 80 kPa liegt.

Die Diskrepanz zu den klinisch nach PTCA auftretenden Restenosevorgänge findet demnach ihre Erklärung möglicherweise darin, dass mittels der Vakuumpumpe für das vorliegende in vitro Modell ein nicht ausreichend nachvollziehbarer Dehnungsvorgang hinsichtlich der Amplitude erzielt werden konnte und damit keine Vergleichbarkeit besteht. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass in vivo zum Zeitpunkt der therapeutischen Indikation mit Vorliegen ausgeprägter arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand nicht davon ausgegangen werden kann, dass die letztendliche Elongation der Zellen tatsächlich proportional zur angelegten Amplitude der Dehnung ist.

Zudem soll betont werden, dass zwar der technische Maximalbereich der genutzten Flexercell strain unit mit 80 kPa deutlich unter der therapeutisch verwendeten Druckamplitude liegt, jedoch im Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit zitierten Forschungsgruppen nur von einzelnen übertroffen wird.

Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit fand Durand et al. [62] im Verlauf von 28 Tagen nach Angioplastie (6 atm=606 kPa, 3 x 60 sec) an arteriosklerotisch veränderten Femoralarterien von Kaninchen ein Maximum der Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen nach drei Tagen. Auffällig war, dass das Maximum der Apoptose 7 Tage nach Angioplastie zu sehen war. Insgesamt betrachtet war die Zellproliferation unabhängig von der resultierenden Restenose und dem arteriellen Remodeling. Dies legt nahe, dass bei nahezu identischem Beobachtungszeitraum eine Diskrepanz zwischen der zeitlichen Entwicklung der Veränderungen bei in-vitro-Modellen von Tier und Mensch bzw. allgemein von Tier und Mensch vorliegen könnte.

Zudem ist der Zeitraum von einem Monat nach Dehnung – vorgegeben durch die Rahmenbedingungen und Anfälligkeiten einer Zellkultur – eventuell auch im Vergleich der in vitro mit den in vivo vorliegenden Veränderungen beim Menschen zu kurz gefasst, da eine Restenose definitionsgemäß bis 6 Monate nach Intervention entsteht, sodass möglicherweise eine Veränderung erst in den kommenden Monaten aufgetreten wäre. Weiterhin darf nicht ausser acht gelassen werden, daß die in vitro untersuchten hAOSM Zellen nicht explizit aus atherosklerotischen Läsionen stammen. Desweiteren könnte eine mögliche Veränderung des Phänotypes sowohl der in vitro untersuchten Zellen als auch der in vivo vorhandenen Zellen eine unterschiedliche Reaktion auf die mechanische Dehnung hervorrufen.

Prinzipiell muss bei den unterschiedlichen Ergebnissen verschiedener in vitro Studien, in welche sich diese einreihen lässt, auch der Einfluss einer variierenden Zelldichte diskutiert werden – wie dies unter anderem den Phänotyp der vaskulären glatten Muskelzellen beeinflussen kann (s. Seite 54) . Zudem variiert die Interpretation der Ergebnisse, da Unterschiede hinsichtlich Fixierungsprotokoll, Zusammensetzung, Alter und weiterer Charakteristika der untersuchten Läsionen bestehen [94, 96,



169, 185]. Hinzu kommen unterschiedlich angesetzte Kriterien, wie die vorliegenden Ergebnisse zu werten seien.

So konnten Clowes et al. [45, 46] an temporär mittels Ligatur isolierten Segmenten der A. carotis von Ratten den Höhepunkt der Proliferation zwei bis drei Tage nach einer akuten Distension des Gefäßes (Druck von 300 mmHg=39,9 kPa) lokalisieren. Demnach führten Clowes et al. [45] eine einmalige Dehnung mit unphysiologischem, nicht therapeutischem (unter 300 – 900 kPa) Druck durch, welcher ebenfalls nicht an die klinisch verwendeten therapeutischen Drücke heranreicht, jedoch mit einem proliferativen Effekt in Gegenwart teils denudierten Endothels einhergeht. Da Clowes et al. die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen kontinuierlich oder bereits am ersten, zweiten, dritten oder siebten Tag autoradiographisch erfasste, zeigt sich, dass bei den unterschiedlichen Ergebnissen der Forschungsgruppen – eingeschlossen die der vorliegenden Arbeit – eine im zeitlichen Verlauf nach initialer Dehnung unterschiedliche Proliferationsrate aufgrund der festgelegten Messzeitpunkte nicht oder unzureichend detektiert worden sein könnte.

Als weiteres Beispiel dient die Untersuchung von Sumpio et al. [226] an Endothelzellen der thorakalen Aorta von Rindern. Bei einer durchschnittlichen Dehnung um 10% unter zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell-Platten, 24 h) zeigte sich eine erhöhte Expression von PDGF-B. Bei einer durchschnittlichen Dehnung um 6% fand sich jedoch keine Veränderung der Expression von PDGF-B. Dies soll veranschaulichen wie gering die Spannbreite, in welcher bereits Veränderungen auftreten, in vitro und wohl auch in vivo ist. So liegt die Gefäßwandexkursion in der Systole unter physiologischen Bedingungen bei 5-6%, unter vorliegender Hypertension bei über 10%.

Die koronare Herzkrankheit ist die nach wie vor die häufigste zum Tode führende Organerkrankung. Abschliessend soll ein Überblick über die bisher etablierten minimal-invasiven und die bis jetzt weitgehend ineffizienten medikamentösen Präventions- und Therapieansätze der Restenose gegeben werden.

Die PTCA stellt heute eine etablierte Methode zur Behandlung der stenosierenden Koronararteriosklerose dar. Aufgrund der hohen Restenoserate nach PTCA wird das Augenmerk auf die Prävention einer Restenose gerichtet.

Die in der Einleitung dargelegten postulierten Erklärungsansätze wurden in zahlreichen klinischen Studien umgesetzt.

Zwei Vorgehensweisen haben sich bewährt und werden mittlerweile im klinischen Alltag genutzt: intracoronare Stents und intracoronare Bestrahlung.

Intracoronare Stents bewirken durch das Verhindern konstriktiven Remodelings eine Reduzierung der Restenose sowie der wiederholten Revaskularisierung um 30% [80, 205]. In der BENESTENT Studie wurde beim Vergleich von Stenting mit alleiniger PTCA über sieben Monate eine signifikante Reduzierung der Restenoserate und der Revaskularisierung festgestellt. Der gesamte Erfolg bei Stenting ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, final einen grösseren Gefäßdurchmesser zu erzielen [132]. Das Stenting führt in der Folge zu einer neuen Komplikation: die in-stent-Restenose. Da Stenting zwar die Inzidenz einer Restenose verringert, diese aber nicht verhindert, finden neue polymere Stents mit verzögerter perivaskulärer Medikamentenfreisetzung Verwendung. Im Tiermodell zeigten

Substanzen wie Heparin, Hirulog, Hirudin plus Iloprost, Prostazyklinanaloga, Abciximab und Rapamycin eine gewisse Effektivität.

Ein weiterer erfolgreicher Schritt ist die intracoronare Radiotherapie. Der Anstoß dazu gründet auf dem beobachteten Erfolg von Radiotherapie bei Behandlung keloidartiger Wundheilung nach chirurgischen Eingriffen. Techniken der Brachytherapie mittels verschiedener  $\gamma$  - (low-energy, hohe Penetration) und  $\beta$  - (high-energy, niedrige Penetration) Strahler weisen deutliche Erfolge bei alleiniger PTCA, Stenting und in-stent-Restenose auf. Zur endovaskulären Brachytherapie werden katheterbasierte Systeme wie Line source wires, radioaktive Seeds, mit radioaktivem Gas oder Flüssigkeit gefüllte Ballone und Stents mit  $\gamma$ - oder  $\beta$ -Strahlern verwendet. In der SCRIPPS Studie beträgt die angiographische Restenoserate nach sechs Monaten in der Placebogruppe 54% im Vergleich zu 17% bei Radiotherapie [231, 237]. Trotz verringerter Inzidenz einer Restenose im Bereich der Läsion beobachtet man ein Auftreten von Restenosen im Randbereich des Stents, welches auf einen Abfall der Strahlendosis zurückgeführt wird. Versucht wird nun eine läsionenbezogene Ausdehnung der Bestrahlung.

Desweiteren wurden verschiedene Möglichkeiten der medikamentösen Prävention von Restenosen untersucht. Die vielversprechende Ergebnisse, welche viele Medikamente in Zellkulturen oder Tierversuchen zeigten, konnten in der klinischen Anwendungen nicht reproduziert werden. Diskutiert wurde hierfür, dass in vitro oder in Tierversuchen im Vergleich zu den später durchgeführten klinischen Studien deutlich höhere Konzentrationen der untersuchten Medikamente angewendet wurden [21].

Negative Ergebnisse liegen mittlerweile für zahlreiche Medikamente/Medikamentengruppen vor. Dazu gehören unter anderem Acetylsalicylsäure, ACE-Inhibitoren, Somatostatinanaloga (Angiopeptin),  $\beta$ -Blocker (Carvedilol), Cilostazol, Ciprostone, Colchizin, CSE-Inhibitoren, Cumarine, Diltiazem, Dipyridamol, Fischöl, Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorinhibitoren, Thrombininhibitoren (Heparin, Hirudin, Hirulog), Ketanserin, LDL-Apherese, Nifedipin, Prostazyklin, Kortikosteroide, Ticlopidin, PDGF-Antagonist Tirofiban [7, 21, 29, CAPTURE 34, 40, 48, 57, 65, EPIC 67, EPILOG 68, ERASER 69, 75, RESTORE 89, 92, 103, 106, IMPACT II 109, 115, CAPARES 116, 122, 136, 137, 138, TRAPIST 149, 152, MERCATOR 153, 171, 174, 184, EUROCORE 207, 209, CADILLAC 223, 234, 243, 244]. Andere Medikamente wie Tranilast zeigten in Kombination mit ACE-Inhibitoren eine signifikant reduzierte Inzidenz von Restenosen [110, 154, 214, 227]. Eine Reduzierung der Restenoserate konnte durch die Senkung des Homocysteinspiegel mittels Folsäure, Vitamin B 12 und Pyridoxin erzielt werden [202]. Zusätzlich oder statt der angiographischen Zielvariablen der Restenose werden zunehmend die klinischen Ereignisse, das klinische Outcome (Tod, Infarkt, erneute Revaskularisation, Hospitalisierung wegen Angina) untersucht. Positive Ergebnisse fanden sich hierfür unter anderem mit Ca-Kanal-Inhibitoren (Amlodipin), Antioxidantien (Probuco) und Pravastatin (im Gegensatz zu den übrigen Statinen) [3, 66, 107, 129, CONGRESS 161, 183, 198, 201, 208, 241, PART 255] .

Weitere periinterventionelle Massnahmen werden hinsichtlich ihrer präventiven Wirkung untersucht, darunter fallen intracoronarer Ultraschall, intravaskuläre Ultraschall-geführte Ballonangioplastie und endoluminaler Laser sowie Photoangioplastie [80, 123, 247]. Weitere Ansätze bestehen im Bereich der aufkommenden Gentherapie für spezifische Inhibitoren von Wachstumsfaktoren [38, 43, 104, 168, 210, 240, 248].

Vor allem die medikamentösen Ansätze bleiben weit hinter den Erwartungen zurück. Doch gerade diese wurden auf der Basis pathogenetischer Modelle restenotischer Läsionen entwickelt. Der oft wenig effektiv präventiven Wirkung der untersuchten Substanzen können verschiedene Ursachen zugrundeliegen. Dosis, Dauer, Art der Anwendung oder gewähltes Patientengut können die häufig fehlende Umsetzung vom Tiermodell in die klinische Studie erklären. In ihrer Gesamtheit zeigen die auf Prävention ausgerichteten Studien, dass die bisher postulierten Erklärungsansätze nicht ausreichen.

Deutlich wird hierbei auch, dass die Restenose ohne Zweifel ein multifaktorielles Geschehen ist.

In Zukunft könnte die weitere Aufschlüsselung der Physiologie und Pathogenese beispielsweise eine effizientere Prävention von Restenosen nach PTCA ermöglichen und diesen minimal-invasiven Therapieansatz einer Vaskulopathie gegenüber dem chirurgischen Eingriff weiterhin optimieren.

## 5. Zusammenfassung

---

Die vorliegende Arbeit behandelt zwei verschiedene Fragestellungen. In der ersten Fragestellung sollte der Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung auf die DNA-Synthese und die metabolische Aktivität von humanen vaskulären glatten Muskelzellen untersucht werden. Dazu wurden primäre vaskuläre glatte Muskelzellen aus der Aorta (hAOSM, 2,5 Monate alter männlicher Europäer) und aus einer Koronararterien (hCASM, 48 Jahre alter männlicher Europäer) des Menschen verwendet.

### 1. Antiproliferativer Effekt zyklischer mechanischer Dehnung auf hAOSM Zellen

Nach zwei- bis dreitägiger zyklischer mechanischer Dehnung (5% Elongation, 0,5 Hz) zeigten die niedrigen Passagen der hAOSM Zellen ( $\leq$  Passage 9) eine signifikant verminderte DNA-Synthese der gedehnten im Vergleich zu den ungedehnten Zellen (um  $32,4 \pm 26,2\%$ ;  $n=6$ ,  $P=0,013$ ). Damit konnte gezeigt werden, dass in vitro eine physiologische Dehnung zu einer Abnahme der DNA-Synthese führt. Dies entspricht einem antiproliferativen Effekt. Gleichzeitig bestand eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität unter dem Einfluss der Dehnung (um  $39,1 \pm 17,9\%$ ,  $n=7$ ,  $P < 0,0001$ ).

### 2. Ausschluss von Artefakten

Eine Abnahme der DNA-Synthese aufgrund eines Nekrose- bzw. Apoptose bedingten Zelltodes konnte mittels Bestimmung der Zellzahl, der LDH-Aktivität und der Apoptose ausgeschlossen werden. Keine der gewählten Methoden zeigte für hAOSM Zellen einen Unterschied zwischen Dehnung und Kontrolle. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht eine Zellschädigung der hAOSM Zellen unter dem Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung zur Abnahme der DNA-Synthese geführt hat. Zudem spricht die Zunahme der metabolischen Aktivität selbst für eine weiterbestehende Vitalität der hAOSM Zellen. Um den Widerspruch von gleichzeitiger Abnahme der DNA-Synthese bei Zunahme der metabolischen Aktivität weiter abzuklären, wurde die Gesamtzellzahl und der Mitoseindex der hAOSM Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich keine signifikante Änderung der Gesamtzellzahl zwischen Kontrolle und Dehnung ( $24,6\%$ ,  $P=0,287$ ). Ebenso wenig bestand eine signifikante Veränderung des Mitoseindex ( $52,8\%$ ,  $P=0,215$ ). Der Mitoseindex der hAOSM Zellen war sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung sehr niedrig (Kontrolle  $0,16 \pm 0,031$ , Dehnung  $0,09 \pm 0,05$ ). Dies erklärt, warum in dem relativ kurzen Zeitfenster trotz einer signifikanten dehnungsinduzierten Abnahme der DNA-Synthese keine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen ist.

### 3. Verlust der antiproliferativen Antwort mit der Passagenzahl

In den höheren Passagen der hAOSM Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen der DNA-Synthese ( $52,5 \pm 40,9\%$ ,  $n=4$ ,  $P=0,063$ ) und der metabolischen Aktivität ( $43,8 \pm 53,8\%$ ,  $n=4$ ,  $P=0,2$ ) unter dem Einfluss physiologischer Dehnung reproduziert werden.

### 4. Negativbefund für die hCASM Zellen

Die untersuchten hCASM Zellen zeigten weder in serumfreiem ( $-4,9 \pm 115,1\%$ ,  $n=4$ ,  $P=0,87$ ) noch in Vollmedium ( $+14,6 \pm 44,2\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,6$ ) eine signifikante Veränderung der DNA-Synthese unter dem Einfluss physiologischer Dehnung. Es bestand ebenso wenig eine signifikante dehnungsinduzierte

Veränderung der metabolischen Aktivität (serumfrei:  $+14,6 \pm 44,2\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,6$ ; Vollmedium:  $+81,66 \pm 61,95\%$ ,  $n=3$ ,  $P=0,085$ ). Weder unter Verwendung von serumfreiem Medium noch von Vollmedium fanden sich signifikante Veränderungen der LDH-Aktivität, womit – wie bereits für die hAOSM Zellen - eine dehnungsinduzierte Zellschädigung der hCASM Zellen ausgeschlossen werden konnte.

#### 5. Negativbefund für das Restenosemodell

In der zweiten Fragestellung sollte untersucht werden, ob die Situation nach einer PTCA im Zellkulturmodell nachgestellt werden kann. hAOSM Zellen zeigten nach viermaliger Dehnung für 120 s im technischen Maximalbereich (15% Dehnung, bis 80 kPa) über einen Zeitraum von einem Monat nach Dehnung keine signifikanten Veränderungen der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität. Auch für diese Versuche konnte mittels Bestimmung der LDH-Aktivität eine dehnungsinduzierte Zellschädigung ausgeschlossen werden.

#### 6. Folgerungen zu zyklischer mechanischer Dehnung

Physiologische zyklische mechanische Dehnung hat einen antiproliferativen Effekt auf humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta in niedriger Passage. Einhergehend mit ansteigender Passagenzahl kommt es zu einem Verlust der antiproliferativen Antwort.

#### 7. Folgerungen zum Restenosemodell

Ein Restenosemodell war unter dem Einfluss mechanischer Dehnung in der Zellkultur nicht erstellbar, da möglicherweise in vivo ein multifaktorielles Geschehen die Entwicklung einer Restenose wesentlich triggert.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- [1] **Abe J**, Deguchi J, Matsumoto T: Stimulated activation of platelet-derived growth factor receptor in vivo in balloon-injured arteries. A link between angiotensin II and intimal thickening. *Circulation* 96(1997)1906
- [2] **Abendschein DR**, Recchia D, Meng YY: Inhibition of thrombin attenuates stenosis after arterial injury in minipigs. *J Am Coll Cardiol* 28(1996)1849
- [3] **Anderson TJ**, Meredith IT, Yeung AC: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 332(1995)488
- [4] **Ang AH**, Tachas G, Campbell JH: Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J* 265(1990)461
- [5] **Asada Y**, Hara S, Tsuneyoshi A: Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: Recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost* 80(1998)506
- [6] **Asundi V**, Cowan K, Matzura D: Characterization of extracellular matrix proteoglycan transcripts expressed by vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 52(1990)98
- [7] **Bairati I**, Roy L, Meyer F: Double-blind, randomized, controlled trial of fish oil supplements in prevention of recurrence of stenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 85(1992)950
- [8] **Banai S**, Wolf Y, Golomb G: PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* 97(1998)1960
- [9] **Banes AJ**, Baird CW, Dorofi D, Calderon M, Upchurch G, Amaya G, Keagy B: Cyclic mechanical load and growth factors stimulate endothelial and smooth muscle cell DNA synthesis. *Eur Respir Rev* 3(1993)618-622
- [10] **Banes AJ**, Link GW, Gilbert JW, Tran Son Tay R, Monbureau O: Culturing cells in a mechanically active environment. *Am Biotechnol Lab* 8(1990)12-22
- [11] **Barker SGE**, Talbert A, Cottam S: Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arterioscler Thromb* 13(1993)70
- [12] **Barron MK**, Lake S, Buda AJ: Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation* 96(1997)3587
- [13] **Bauriedel G**, Schluckebier S, Hutter R, Welsch U, Kandolf R, Lüderitz B, Prescott MF: Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis. Implications for the pathogenesis of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(1998)1132-1139
- [14] **Ballyk PD**, Walsh C, Butany J, Ojha M: Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech* 31(1998)229-37
- [15] **Bayer IM**, Adamson SL, Langille BL: Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1999)1499-1505
- [16] **Belch JJ**, Shaw JW, Kirk G: The white blood cell adhesion molecule E-selectin predicts restenosis in patients with intermittent claudication undergoing percutaneous transluminal angioplasty. *Circulation* 95(1997)2027
- [17] **Bendeck MP**, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA: Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 75(1994)539
- [18] **Berg JM**, Kelder JC, Suttrop MJ: Effect of coumarins started before coronary angioplasty on acute complications and long-term follow-up: A randomized trial. *Circulation* 102(2000)386
- [19] **Bernfield M**, Sanderson RD: Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 327(1990)171

- [20] **Berridge MV**, Tan AS, McCoy KD, Wang R: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4(1996)14-19
- [21] **Bestehorn, Hans-Peter**: Interventionelle Kardiologie. Georg Thieme Verlag
- [22] **Birukov KG**, Frid MG, Rogers JD, Shirinsky VP, Koteliensky VE, Campbell JH, Campbell GR: Synthesis and expression of smooth muscle phenotype markers in primary culture of rabbit aortic smooth muscle cells: Influence of seeding density and media and relation to cell contractility. *Exp Cell Res* 204(1993)46-53
- [23] **Birukov KG**, Shirinsky VP, Stepanova OV, Tkachuk VA, Hahn AWA, Resink TJ, Smirnov VN: Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 144(1995)131-139
- [24] **Blindt R**, Krott N, Hanrath P, vom Dahl J, van Eys G, Bosserhoff AK: Expression patterns of integrins on quiescent and invasive smooth muscle cells and impact on cell locomotion. *J Mol Cell Cardiol* 34(2002)1633-1644
- [25] **Booth RFG**, Martin JF, Honey AC, Hassall DG, Beesley JE, Moncada S: Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis* 76(1989)257-268
- [26] **Bornfeldt KE**, Arnqvist HJ, Capron L: In vivo proliferation of rat vascular smooth muscle in relation to diabetes mellitus insulin-like growth factor I and insulin. *Diabetologia* 35(1992)104
- [27] **Bourcier T**, Sukhova G, Libby P: The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 272(1997)15817
- [28] **Braun-Dullaes RC**, Ziegler A, Bohle RM, Bauer E, He S, Tillmanns H, Haberbosch W: Quantification of the cell-cycle inhibitors p27 and p21 in human atherectomy specimens: Primary stenosis versus restenosis. *J Lab Clin Med* 141(2003)179-189
- [29] **Buchwald A**, Unterberg C, Nebendahl K: Low-molecular weight heparin reduces neointimal proliferation after coronary stent implantation in hypercholesterolemic minipigs. *Circulation* 86(1992)531
- [30] **Calara F**, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Shah PK, Nilsson J: Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(1996)187-193
- [31] **Calvete JJ**: Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost* 72(1994)1
- [32] **Campbell GR**, Campbell JH: Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall. Homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Experimental and molecular pathology?* 42(1985)139-162
- [33] **Cannan CR**, Yeh W, Kelsey SF: Incidence and predictors of target vessel revascularization following percutaneous transluminal coronary angioplasty: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute PTCA Registry. *Am J Cardiol* 84(1999)170
- [34] **CAPTURE Investigators**: Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study. *Lancet* 349(1997)1429
- [35] **Carey DJ**: Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 327(1997)1-16
- [36] **Carrozza JP Jr**, Kuntz RE, Fishman RF, Baim DS: Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 118(1993)344
- [37] **Chandrasekar B**, Tanguay JF: Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol* 35(2000)555
- [38] **Chang MW**, Barr E, Seltzer J: Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 267(1995)518
- [39] **Chapman GB**, Durante W, Hellums JD, Schafer AI: Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(2000)H748-H754
- [40] **Chen JK**, Hoshi H, McKeehan WL: Transforming growth factory type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(1987)5287
- [41] **Cheng GC**, Briggs WH, Gerson DS, Libby P, Grodzinsky AJ, Gray ML, Lee RT: Mechanical strain tightly controls Fibroblast Growth Factor-2 release from cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 80(1997)28-36

- [42] **Cheng L**, Mantile G, Pauly R: Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation* 98(1998)2195
- [43] **Claudio PP**, Fratta L, Farina F: Adenoviral RB2/p130 gene transfer inhibits smooth muscle cell proliferation and prevents restenosis after angioplasty. *Circ Res* 85(1999)1032
- [44] **Clausell N**, Molossi S, Rabinovitch M: Increased interleukin-1b and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 142(1993)1772
- [45] **Clowes AW**, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest* 60(1989)360
- [46] **Clowes AW**, Reidy MA, Clowes MM: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 49(1983)327
- [47] **Colombo A**, Brigouri C: Optimal balloon angioplasty versus elective stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 34(1999)1907
- [48] **Corcos T**, David PR, Val PG: Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 109(1985)926
- [49] **Cote G**, Tardif JC, Lesperance J: Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. *Circulation* 99(1999)30
- [50] **Cuevas P**, Gonzales AM, Carceller F, Baird A: Vascular response to basic fibroblast growth factor when infused onto the normal adventitia or into the infured media of the rat carotid artery. *Circ Res* 69(1991)360
- [51] **Daemen MJAP**, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 68(1991)450
- [52] **Dangas G**, Mintz GS, Mehran R: Preinterventional arterial remodeling as an independent predictor of target-lesion revascularization after nonstent coronary intervention: An analysis of 777 lesions with intravascular ultrasound imaging. *Circulation* 99(1999)3149
- [53] **De Meyer GRY**, Van Put DJM, Kockx MM, Van Schil P, Bosmans R, Bult H, Buysens N, Vanmaele R, Herman AG: Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(1997)1924-1930
- [54] **De Smet BJ**, de Kleijn D, Hanemaaijer R: Metalloproteinase inhibition reduces vasoconstrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: A study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation* 101(2000)2962
- [55] **Delafontaine P**, Bernstein KE, Alexander RW: Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertension* 17(1991)693
- [56] **Delafontaine P**, Lou H, Alexander RW: Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 18(1991)741
- [57] **Desmet W**, Vrolix M, De Scheerder I: Angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril sodium in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 89(1994)385
- [58] **Dethlefsen SM**, Shepro D, D'Amore PA: Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res* 33(1996)405-413
- [59] **Detre K**, Holubkov R, Kelsey S: Percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. The National Heart, Lung and Blood Institute Registry. *N Engl J Med* 318(1988)265
- [60] **Dollery CM**, Humphries SE, McClelland A: Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury. *Circulation* 99(1999)3199
- [61] **Douglas SA**, Loudon C, Vickery-Clark LM: A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty: Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 75(1994)190
- [62] **Durand E**, Mallat Z, Addad F: Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol* 39(2002)1680-5



- [63] **Edelman ER**, Nugent MA, Smith LT, Karnovsky MJ: Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 89(1992)465
- [64] **Elezi S**, Kastrati A, Neumann FJ, Hadamitzky M, Dirschinger J, Schömog A: Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation* 98(1998)1875-1880
- [65] **Ellis SG**, Roubin GS, Wilentz J: Effect of 18- to 24-hour heparin administration for prevention of restenosis after complicated coronary angioplasty. *Am Heart J* 117(1989)777
- [66] **Emanuelsson H**, Beatt KJ, Bagger JP: Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty-reduction of clinical events but not of angiographic restenosis. European Angiopeptin Study Group. *Circulation* 91(1995)1689
- [67] **EPIC Investigators**: Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in a high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 330(1994)956
- [68] **EPILOG Investigators**: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 336(1997)1689
- [69] **ERASER Investigators**: Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce In-stent restenosis: *Circulation* 100(1999)799
- [70] **Erbel R**, Haude M, Hopp HW: Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. *N Engl J Med* 339(1998)1672
- [71] **Espinola-Klein C**, Rupprecht HJ, Erbel R: Impact of restenosis 10 years after coronary angioplasty. *Eur Heart J* 19(1998)1047
- [72] **Fagar G**: Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77(1995)645
- [73] **Fajardo LF**: The nature of arterial restenosis after angioplasty. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 40(1998)761-763
- [74] **Fath KA**, Alexander RW, Delafontaine P: Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor I mRNA levels in rat aorta. *Circ Res* 72(1993)271
- [75] **Faxon DP**, Spiro TE, Minor S: Low molecular weight heparin in prevention of restenosis after angioplasty. Results of Enoxaparin Restenosis (ERA) Trial. *Circulation* 90(1994)908
- [76] **Feng Y**, Yang JH, Huang H, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Lee RT: Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85(1999)1118-1123
- [77] **Ferguson JJ**: Meeting highlights: Highlights of the 20<sup>th</sup> Congress of the European Society of Cardiology. *Circulation* 99(1999)1127
- [78] **Ferns GA**, Raines EW, Sprugel KH: Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 253(1991)1129
- [79] **Fingerle J**, Johnson R, Clowes AW: Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1989)8412
- [80] **Fischman DL**, Leon ML, Baim DS: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 331(1994)496
- [81] **Fitzgerald PJ**, Takagi A, Moore MP: Intravascular sonotherapy decreases neointimal hyperplasia after stent implantation in swine. *Circulation* 103(2001)1828
- [82] **Foegh ML**, Khibabadi BS, Chambers E. Inhibition of coronary artery transplant atherosclerosis in rabbits with angiopeptin, an octapeptide. *Atherosclerosis* 78(1989)229
- [83] **Force T**, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis JM: Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res* 78(1996)947-953
- [84] **Frystyk J**, Ledet T, Moller N, Flyvbjerg A, Orskov H: Cardiovascular disease and insulin-like growth factor. *Circulation* 106(2002)893-895
- [85] **Galis ZS**, Khatri JJ: Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90(2002)251-262

- [86] **Gallo R**, Padurean A, Toschi V: Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 97(1998)581
- [87] **Garg UC**, Hassid A: Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83(1989)1774
- [88] **Gertz SD**, Fallon JT, Gallo R: Hirudin reduces tissue factor expression in neointima after balloon injury in rabbit femoral and porcine coronary arteries. *Circulation* 98(1998)580
- [89] **Gibson CM**, Goel M, Cohen DJ: Six-month angiographic and clinical follow-up of patients prospectively randomized to receive either tirofiban or placebo during angioplasty in the RESTORE trial. *J Am Coll Cardiol* 32(1998)28
- [90] **Gilbert JA**, Banes AJ, Link GW, Jones GL: Surface strain on living cells in a mechanically active, in vitro environment. (1989)
- [91] **Gilbert JA**, Weinhold PS, Banes AJ, Link GW, Jones GL: Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro. *J Biomechanics* 27(1994)1169-1177
- [92] **Gimple LW**, Herrman HC, Winniford M: Usefulness of subcutaneous low molecular weight heparin (ardeparin) for reduction of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 83(1999)1524
- [93] **Gitay-Goren H**, Soker S, Vlodaysky I, Neufeld G: The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem* 267(1992)6093
- [94] **Glagov S**: Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation* 89(1994)2888-2891
- [95] **Goldschmidt ME**, McLeod KJ, Taylor WR: Integrin-mediated mechanotransduction in vascular smooth muscle cells. Frequency and force response characteristics. *Circ Res* 88(2001)674-680
- [96] **Gordon D**, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci, USA* 87(1990)4600-4604
- [97] **Gordon PC**, Gibson CM, Cohen DJ: Mechanisms of restenosis and redilation within coronary stents – Quantitative angiographic assessment. *J Am Coll Cardiol* 21(1993)1166
- [98] **Grainger DJ**, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC: Mitogens for adult rat aortic vascular smooth muscle cells in serum-free primary culture. *Cardiovasc Res* 28(1994)1238-1242
- [99] **Greenbaum AB**, Califf RM, Jones RH: Comparison of medicine alone, coronary angioplasty, and left internal mammary artery bypass for one-vessel proximal left anterior descending coronary artery disease. *Am J Cardiol* 86(2000)1322
- [100] **Hart CE**, Kraiss LW, Vergel S: PDGF $\beta$  receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation* 99(1999)564
- [101] **Hedin U**, Holm J, Hansson GK: Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 139(1991)649
- [102] **Hehrlein C**, Weinschenk I, Metz J: Long period of balloon inflation and the implantation of stents potentiate smooth muscle cell death. Possible role of chronic vascular injury in restenosis. *Int J Cardiovasc Intervent* 2(1999)21-26
- [103] **Hillegass WB**, Ohman EM, Leimberger JD, Califf RM: A meta-analysis of randomized trials of calcium antagonists to reduce restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 73(1994)835
- [104] **Hiltunen MO**, Laitinen M, Turunen MP: Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation* 102(2000)2262
- [105] **Hipper A**, Isenberg G: Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 440(2000)19-27
- [106] **Hoberg E**, Dietz R, Frees U: Verapamil treatment after coronary angioplasty in patients at high risk of recurrent stenosis. *Br Heart J* 71(994)254
- [107] **Hong MK**, Kent KM, Mehran R: Continuous subcutaneous angiopeptide treatment significantly reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary in-stent restenosis model. *Circulation* 95(1997)449
- [108] **Ignarro LJ**, Buga GM, Hua Wei L, Bauer PM, Wu G, del Soldato P: Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *PNAS* 98(2001)4202-4208

- [109] **IMPACT Investigators:** Randomized placebo-controlled trial of effect of eptifibatid on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. *Lancet* 349(1997)1422
- [110] **Inoue T,** Sakai Y, Morooka S: Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 28(1996)1127
- [111] **Ishizaka N,** Kurokawa K, Taguchi J: Inhibitory effect of a single local probucol administration on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* 118(1995)53
- [112] **Iwashina M,** Shichiri M, Marumo F: Transfection of inducible nitric oxide synthase gene cause apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 98(1998)1212
- [113] **Jalkanen M,** Elenius K, Salmivirta M: Syndecan – a cell surface proteoglycan that selectively binds extracellular effector molecules. *Adv Exp Med Biol* 313(1992)79
- [114] **Janssens S,** Flaherty D, Nong Z: Human endothelial nitric oxide synthetase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 97(1998)1274
- [115] **Johansen O,** Brekke M, Seljeflot I: Omega-3 fatty acids do not prevent restenosis after coronary angioplasty: Results from the CART study. *J AM Coll Cardiol* 33(1999)1619
- [116] **Jorgensen B,** Simonsen S, Endresen K: Restenosis and clinical outcome in patients treated with amlodipine after angioplasty: results from the Coronary AngioPlasty Amlodipine REStenosis Study (CAPARES). *J Am Coll Cardiol* 35(2000)592
- [117] **Kakuta T,** Currier JW, Haudenschield CC: Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 89(1994)2809
- [118] **Kamijikkoku S,** Murohara T, Tayama S: Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: A marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis? *Am Heart J* 136(1998)231
- [119] **Katsuda S,** Okada Y, Minamoto T: Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* 12(1992)494
- [120] **Kiechl S,** Willeit J: The natural course of atherosclerosis. Part I: Incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1999)1484-1490
- [121] **Kiechl S,** Willeit J: The natural course of atherosclerosis. Part II: Vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1999)1491-1498
- [122] **Kiesz RS,** Buszman P, Martin JL: Local delivery of enoxaparin to decrease restenosis after stenting: results of initial multicenter trial: polish-american local lovenox NIR assessment study (The POLONIA study). *Circulation* 103(2001)26
- [123] **Kipshidze N,** Sahota H, Komorowski R: Photoremodeling of arterial wall reduces restenosis after balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol* 31(1998)1152
- [124] **Kirber MT,** Guerrero-Hernandez A, Bowman DS, Fogarty KE, Tuft RA, Singer JJ, Fay FS: Multiple pathways responsible for the stretch-induced increase in Ca<sup>2+</sup>-concentration in toad stomach smooth muscle cells. *J Physiol* 524(2000)3-17
- [125] **Kitazume H,** Ichiro K, Iwama T: Repeat coronary angioplasty as the treatment of choice for restenosis. *Am Heart J* 132(1996)711
- [126] **Kollros PR,** Bates SR, Mathews MB, Horwitz AL, Glagov S: Cyclic AMP inhibits increased collagen production by cyclically stretched smooth muscle cells. *Lab Invest* 56(1987)410-7
- [127] **Kornowski R,** Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB: In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *JACC* 31(1998)224-230
- [128] **Kornowski R,** Mintz GS, Kent KM: Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. *Circulation* 95(1997)1366
- [129] **Ku G,** Doherty NS, Wolos JA: Inhibition by probucol of interleukin 1 secretion and its implication in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 62(1988)77B
- [130] **Kumar A,** Hoover JL, Simmonas CA: Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation* 96(1997)4333

- [131] **Kuntz RE**, Baim DS: Defining coronary restenosis. Newer clinical and angiographic paradigms. *Circulation* 88(1993)1310
- [132] **Kuntz RE**, Gibson CM, Nobuyoshi M, Baim DS: Generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty, stenting and directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 21(1993)15
- [133] **Kuntz RE**, Speiser B, Joyal M: Clinical and angiographic outcomes after use of Sr-90 beta radiation for the treatment of de novo and restenotic coronary lesions. Presented at the 50<sup>th</sup> American College of Cardiology Scientific Session, Orlando, Florida, 2001
- [134] **Kwon HM**, Sangiorgi G, Ritman EL: Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: Visualisation and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. *J Am Coll Cardiol* 32(1998)2072
- [135] **Lafont A**, Guzman LA, Whitlow PL: Restenosis after experimental angioplasty: Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 76(1995)996
- [136] **Le Breton H**, Plow EF, Topol EJ: Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 28(1996)1643
- [137] **Leaf A**, Jorgensen MB, Jacobs AK: Does fish oil prevent restenosis after coronary angioplasty? *Circulation* 90(1994)2248
- [138] **Lee CW**, Chae JK, Lim HY: Prospective randomized trial of corticosteroids for the prevention of restenosis after intracoronary stent implantation. *Am Heart J* 138(1999)60
- [139] **Lehoux S**, Tedgui A: Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 36(2003)631-643
- [140] **Li G**, Chen SJ, Oparil S: Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* 101(2000)1362
- [141] **Libby P**, Schwartz D, Brogi E: A cascade model for restenosis. *Circulation* 86Suppl III(1992)47
- [142] **Lindner V**, Fingerle J, Reidy MA: Mouse model of arterial injury. *Circ Res* 73(1993)792-796
- [143] **Lindner V**, Olson NE, Clowes AW, Reidy MA: Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries. Interaction of heparin with basic Fibroblast Growth Factor. *J Clin Invest* 90(1992)2044-2049
- [144] **Lindner V**, Reidy MA: Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1991)3739
- [145] **Lundergan C**, Foegh ML, Vargas R: Inhibition of myointimal proliferation of the rat carotid artery by the peptides, angiopeptin and BIM 23034. *Atherosclerosis* 80(1989) 49
- [146] **Majesky MW**, Giachelli CM, Reidy MA, Schwartz SM: Rat carotid neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. *Circ Res* 71(1992)759
- [147] **Majesky MW**, Lindner V, Twardzik DR: Production of transforming beta-1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest* 88(1991)904
- [148] **Mali M**, Elenius K, Miettinen HM, Jalkanen M: Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J Biol Chem* 32(1993)24215
- [149] **Maresta A**, Balducci M, Cantini L: Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study. Studio Trapidil versus Aspirin nella Restenosi Coronarica. *Circulation* 90(1994)2710
- [150] **Margolin L**, Fishbein I, Banai S, Golomb G, Reich R, Perez LS, Gertz SD: Metalloproteinase inhibitor attenuates neointima formation and constrictive remodeling after angioplasty in rats: augmentative effect of  $\alpha_v\beta_3$  receptor blockade. *Atherosclerosis* 163(2002)269-277
- [151] **Martins LM**, Earnshaw WC: Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Cell Biol* 7(1997)111-114
- [152] **Meneveau N**, Schiele F, Grollier G: Local delivery of nadroparin for the prevention of neointimal hyperplasia following stent implantation: results of the IMPRESS trial. A multicentre, randomized, clinical, angiographic and intravascular ultrasound study. *Eur Heart J* 21(2000)1767

- [153] **MERCATOR** Investigators: Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. Multicenter European Research Restenosis Study Group. *Circulation* 86(1992)100
- [154] **Meurice T**, Bauters C, Hermant X: Effect of ACE inhibitors on angiographic restenosis after coronary stenting (PARIS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 357(2001)1321-1324
- [155] **Miano JM**, Vlastic N, Tota RR, Stemerman MB: Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. *Arteriosc Thromb* 13(1993)211
- [156] **Mickelson JK**, Lakkis NM, Villarreal-Levy G: Leucocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty; a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 28(1996)345
- [157] **Minamino T**, Kurihara H, Takahashi M: Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human atherosclerosis. *Circulation* 95(1997)221
- [158] **Mintz GS**, Kimura T, Nobuyoshi M: Relation between preintervention remodeling and late arterial responses to coronary angioplasty or atherectomy. *Am J Cardiol* 87(2001)392
- [159] **Mintz GS**, Kovach JA; Javier SP: Geometric remodeling is the predominant mechanism of late lumen loss after coronary angioplasty. *Circulation* 88Suppl I(1993)I
- [160] **Mintz GS**, Popma JJ, Pichard AD: Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94(1996)35
- [161] **Mulder HJ**, Bal ET, Jukema JW: Pravastatin reduces restenosis two years after percutaneous transluminal coronary angioplasty (REGRESS trial). *Am J Cardiol* 86(2000)742
- [162] **Nabel EG**, Shum L, Pompili VJ: Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(1993)10759
- [163] **Nabel EG**, Yang ZY, Plautz G: Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 362(1993)844
- [164] **Nakae I**, Fujita M, Fudo T: Relation between preexistent coronary collateral circulation and the incidence of restenosis after successful primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 27(1996)1688
- [165] **Nakamura M**, Yock PG, Kataoka T, Bonneau HN, Suzuki T, Yamaguchi T, Honda Y, Fitzgerald PJ: Impact of deep vessel wall injury on acute response and remodeling of coronary artery segments after cutting balloon angioplasty. *Am J Cardiol* 91(2003)6-11
- [166] **Nakatani M**, Takeyama Y, Shibata M, Yorozuya M, Suzuki H: Mechanisms of restenosis after coronary intervention. Difference between plain old balloon angioplasty and stenting. *Cardiovasc Path* 12(2003)40-48
- [167] **Nikol S**, Isner JM, Pickering JG: Expression of transforming growth factor-beta-1 is increased in human vascular restenotic lesions. *J Clin Invest* 90(1992)1582
- [168] **Noiseux N**, Boucher CH, Cartier R, Sirois MG: Bolus endovascular PDGFR-beta antisense treatment suppressed intimal hyperplasia in a rat carotid injury model. *Circulation* 102(2000)1330
- [169] **O'Brien ER**, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM: Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 73(1993)223-231
- [170] **O'Brien KD**, Allen MD, McDonald TO: Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92(1993)945
- [171] **O'Keefe JH Jr**, Giorgi LV, Hartzler GO: Effects of diltiazem on complications and restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 67(1991)373
- [172] **Ohishi M**, Ueda M, Rakugi H: Upregulation of angiotensin-converting enzyme during the healing process after injury at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans. *Circulation* 96(1997) 3328
- [173] **Okada Y**, Katsuda S, Matsui Y: Collagen synthesis by cultured arterial smooth muscle cells during spontaneous phenotypic modulation. *Acta Pathol Jpn* 40(1990)157

- [174] **Okamoto S**, Inden M, Setsuda M: Effects of trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 123(1992)1439
- [175] **Okazaki H**, Majessky MW, Harker LA, Schwartz SM: Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by  $\alpha$ -thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 71(1992)1285
- [176] **Orbe J**, Rodriguez JA, Arias R, Belzunce M, Nespereira B, Perez-Illzarbe M, Roncal C, Paramo JA: Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis* 167(2003)45-53
- [177] **Osborne BA**, Schwartz LM: Essential genes that regulate apoptosis. *Cell Biol* 4(1994)
- [178] **Osol G**: Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 32(1995)275-292
- [179] **Owens GK**: Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 257(1989)H1755
- [180] **Painter JA**, Mintz GS, Wong SC: Serial intravascular ultrasound studies fail to show evidence of chronic Palmaz-Schatz stent recoil. *Am J Cardiol* 75(1995)398
- [181] **Panda D**, Kundu GC, Lee BI: Potential roles of osteopontin and  $\alpha$ (v) $\beta$ (3) integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1997)9308
- [182] **Papadaki M**, McIntire LV, Eskin SG: Effects of shear stress on the growth kinetics of human aortic smooth muscle cells in vitro. *Biotech Bioengin* 50(1996)555-561
- [183] **Parthasarathy S**, Young SG, Witztum JL: Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* 77(1986)641
- [184] **Pepine CJ**, Hirshfeld JW, Macdonald RG: A controlled trial of corticosteroids to prevent restenosis after coronary angioplasty. M-HEART Group. *Circulation* 81(1990)1753
- [185] **Pickering JG**, Ford CM, Chow LH: Evidence for a rapid accumulation and persistently disordered architecture of fibrillar collagen in human coronary restenosis lesions. *Am J Cardiol* 78(1996)633
- [186] **Post MJ**, Borst C, Kuntz RE: The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty: A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 89(1994)2816
- [187] **Post MJ**, de Smet BJ, van der Helm YJ, Kuntz RE: Arterial remodeling contributes to restenosis after angioplasty, but is prevented by stenting in the atherosclerotic micropig. *J Am Coll Cardiol* 26Suppl(1995)303A
- [188] **Post MJ**, Pasterkamp G, Borst C: Arterial remodeling in atherosclerosis and restenosis: A vague concept of a distinct phenomenon. *Atherosclerosis* 118Suppl(1996)S115
- [189] **Poston RN**, Haskard DO, Coucher JR: Expression of intercellular adhesion molecule 1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140(1992)665
- [190] **Powell JS**, Clozel JP, Muller RKM: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245(1989)186
- [191] **Predel HG**, Yang Z, Von Segesser L, Turina M, Bühler FR, Lüscher TF: Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet* 340(1992)878-879
- [192] **Pyles JM**, March KL, Franklin M, Mehdi K, Wilensky RL, Adam LP: Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries. *Circ Res* 81(1997)904-910
- [193] **Raff M**: Cell suicide for beginners. *Nature* 396(1998)119-122
- [194] **Rensing BJ**, Hermans WRM, Vos J, Beatt KJ, Bossuyt P, Rutsch W, Serruys PW: Angiographic risk factors of luminal narrowing after coronary balloon angioplasty using balloon measurements to reflect stretch and elastic recoil at the dilatation site. *Am J Cardiol* 69(1992)584-591
- [195] **Reusch HP**, Chan G, Ives HE, Nemenoff RA: Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition. *Biochem Biophys Res Commun* 237(1997)239-244
- [196] **Reusch P**, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE: Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79(1996)1046-1053

- [197] **Salmivirta M**, Heino J, Jalkanen M: Basic fibroblast growth factor-syndecan complex at cell surface or immobilized to matrix promotes cell growth. *J Biol Chem* 267(1992)17606
- [198] **Santoian ED**, Schneider JE, Gravanis MB: Angiopeptin inhibits intimal hyperplasia after angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 88(1993)11
- [199] **Sarkar R**, Webb RC: Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation. A critical appraisal. *J Vasc Res* 35(1998)135-142
- [200] **Schini-Kerth VB**, Bassus S, Fisslthaler B: Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured smooth muscle cells via the release transforming growth factor- $\beta$ 1 and platelet derived growth factor AB. *Circulation* 96(1997)3888
- [201] **Schneider JE**, Berk BC, Gravanis MB: Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury: A possible role of antioxidants in restenosis. *Circulation* 88(1993)628
- [202] **Schnyder G**, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR: Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 345(2001)1593-1600
- [203] **Schoebel FC**, Gradaus F, Ivens K: Restenosis after elective coronary balloon angioplasty in patients with end stage renal disease: A case-control study using quantitative coronary angiography. *Heart* 78(1997)337
- [204] **Scott NA**, Cipola GD, Ross CE: Identification of a potential role for the adventitia in a vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 93(1996)2178
- [205] **Serruys PW**, de Jaegere P, Kiemeniej F: A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 331(1994)489
- [206] **Serruys PW**, di Mario C, Piek J: Prognostic value of intracoronary flow velocity and diameter stenosis in assessing the short- and long-term outcomes of coronary ballon angioplasty. The DEBATE study (Doppler Endpoints Ballon Angioplasty Trial Europe). *Circulation* 96(1997)3369
- [207] **Serruys PW**, Foley DP, Hofling B: Carvedilol for prevention of restenosis after directional coronary atherectomy: final results of the european carvedilol atherectomy restenosis (EUROCARE) trial. *Circulation* 101(2000)1512
- [208] **Serruys PW**, Foley DP, Jackson G: A randomized, placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty. Final results of the fluvastatin angiographic restenosis (FLARE) trial. *Eur Heart J* 20(1999)58
- [209] **Serruys PW**, Herman J, Simon R: A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after PTCA. *N Engl J Med* 333(1995)757
- [210] **Serruys PW**, Kutryk MJ, Bruining N: Antisense oligonucleotide against c-myc administered with the transport delivery catheter for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized ITALICS trial. *Circulation* 98(Suppl)(1998)1363
- [211] **Serruys PW**, Luijten HE, Beatt KJ: Incidence of restenosis after succesful coronary angioplasty: A time related phenomenon. *Circulation* 77(1988)361
- [212] **Shi Y**, O'Brien JE, Ala-Kokko L: Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 95(1997)997
- [213] **Shi Y**, Pieniek M, O'Brien J: Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 93(1996)340
- [214] **Shiota N**, Okunishi H, Takai S: Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointimal, formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation* 99(1999)1084
- [215] **Shyy JY**, Chien S: Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 91(2002)769-775
- [216] **Sierevogel MJ**, Pasterkamp G, Velema E: Oral matrix metalloproteinase inhibition and arterial remodeling after balloon dilation. An intravascular ultrasound study in the pig. *Circulation* 103(2001)302
- [217] **Simon DI**, Dhen Z, Seifert P: Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest* 105(2000)293
- [218] **Simons M**, Leclerc G, Safian RD, Isner JM, Weir L, Baim DS: Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *N Engl J Med* 328(1993)608-613

- [219] **Sirois MG**, Simons M, Edelman ER: Antisense oligonucleotide inhibition of PDGF-b receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation* 95(1997)669
- [220] **Spyridopoulos I**, Principe N, Krasinski KL: Restoration of E2F expression rescues vascular endothelial cells for tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Circulation* 98(1998)2883
- [221] **Spyridopoulos I**, Brogi E, Kearney M: Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha: Balance between growth and death signals. *J Mol Cell Cardiol* 29(1997)1321
- [222] **Stankovic G**, Manginas A, Voudris V: Prediction of restenosis after coronary angioplasty by use of a new index: TIMI frame count/minimal luminal diameter ratio. *Circulation* 101(2000)962
- [223] **Stone GW**, Grines CL, Cox DA, Garcia E, Tchong JE, Griffin JJ et al. (CADILLAC): Comparison of angioplasty with stenting, with or without Abciximab, in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 346(2002)957-966
- [224] **Stouffer GA**, Hu Z, Sajid M:  $\beta 3$  integrins are upregulated after vascular injury and modulate thrombospondine- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. *Circulation* 97(1998)907
- [225] **Strauss BH**, Chisholm RJ, Keeley FW: Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 75(1994)650
- [226] **Sumpio BE**, Banes AJ: Response of porcine aortic smooth muscle cells to cyclic tensional deformation in culture. *J Surg Res* 44(1988)696-701
- [227] **Tamai H**, Kato O, Suzuki S: Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT). *Am Heart J* 138(1999)968
- [228] **Tardif JC**, Cote G, Lesperance J: Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 337(1997)365
- [229] **Teeters JC**, Erami C, Zhang H, Faber JE: Systemic  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist inhibits neointimal growth after balloon injury of rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(2003)385-392
- [230] **Tierstein PS**, Hoover CA, Ligon RW: Repeat coronary angioplasty: Efficacy of a third angioplasty for a second restenosis. *J Am Coll Cardiol* 13(1989)291
- [231] **Tierstein PS**, Massullo V, Jani S: Three-year clinical and angiographic follow-up after intracoronary radiation: Results of a randomized clinical trial. *Circulation* 101(2000)360
- [232] **Urata H**, Boehm KD, Philip A: Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 91(1993)1269
- [233] **Valen G**, Yan Z, Hansson GK: Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 38(2001)307
- [234] **Villa AE**, Guzman LA, Chen W: Local delivery of dexamethasone for prevention of neointimal proliferation in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 93(1994)1243
- [235] **von Essen R**, Ostermaier R, Grube E: Effects of octreotide treatment on restenosis after coronary angioplasty. Results of the VERA Study. *Circulation* 96(1997)1482
- [236] **Wahl A**, Billinger M, Fleisch M: Quantitatively assessed coronary collateral circulation and restenosis following percutaneous revascularization. *Eur Heart J* 21(2000)1776
- [237] **Waksman R**, Ajani AE, White RL, Chan RC, Sattler LF, Kent KM, Pichard AD, Pinnow EE, Teirstein P: Intravascular gamma radiation for in-stent restenosis in saphenous-vein bypass grafts. *N Engl J Med* 346(2002)1194-1199
- [238] **Waksman R**, Raizner AE, Yeung AC, Lansky AJ, Vandertie L: Use of localized intracoronary  $\beta$  radiation in treatment of in-stent restenosis: the INHIBIT randomised controlled trial. *Lancet* 359(2002)551-557
- [239] **Wang BY**, Candipan RC, Arjomandi M: Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Coll Cardiol* 28(1996)1573
- [240] **Waugh JM**, Li-Hawkins J, Yuksel E: Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation. *Circulation* 102(2000)332
- [241] **Weintraub WS**, Boccuzzi SJ, Klein JL: Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 331(1994)1331



- [242] **Wexberg P**, Gyongyosi M, Sperker W: Pre-existing arterial remodeling is associated with in-hospital and late adverse cardiac events after coronary interventions in patients with stable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 36(2000)1860
- [243] **Whitworth HB**, Roubin GS, Hollman J: Effect of nifedipine on recurrent stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 8(1986)1271
- [244] **Wilensky RL**, Tanguay JF, Ito S: Heparin infusion prior to stenting (HIPS) trial: final results of a prospective, randomized, controlled trial evaluating the effects of local vascular delivery on intimal hyperplasia. *Am Heart J* 139(2000)1061
- [245] **Wilson E**, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH, Ives HE: Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* 123(1993)741-747
- [246] **Wilson E**, Sudhir K, Ives HE: Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. *J Clin Invest* 96(1995)2364-2372
- [247] **Woodburn KW**, Fan Q, Kessel D: Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. *J Clin Laser Med Surg* 14(1996)343
- [248] **Yamamoto K**, Morishita R, Tomita N: Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation* 102(2000)1308
- [249] **Yang JH**, Briggs WH, Libby P, Lee RT: Small mechanical strains selectively suppress matrix metalloproteinase-1 expression by human vascular smooth muscle cells. *J Bio Chem* 273(1998)6550-6555
- [250] **Yang Z**, Lüscher TF: Basic cellular mechanisms of coronary bypass graft disease. *Eur Heart J* 14(1993)193-197
- [251] **Yang Z**, Noll G, Lüscher TF: Calcium antagonists differently inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells in response to pulsatile stretch and platelet-derived growth factor. *Circulation* 88(1993)832-836
- [252] **Yao S**, Ober JC, Krishnaswami AK: Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation* 86(1992)1302
- [253] **Yasukawa H**, Imaizumi T, Matsuoka H: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function associated antigen-1. *Circulation* 95(1997)1515
- [254] **Yin X**, Yutani C, Ikeda Y, Enyoji K, Ishibashi-Ueda H, Yasuda S, Tsukamoto Y: Tissue factor pathway inhibitor gene delivery using HVJ-AVE liposomes markedly reduces restenosis in atherosclerotic arteries. *Cardiovasc Res* 56(2002)454-463
- [255] **Yokoi H**, Daida H, Kuwabara Y: Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (from the probucol angioplasty restenosis trial [PART]). *Am J Cardiol* 86(2000)550

## 7. Thesen

---

1. Unter dem Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung konnte in den niedrigen Passagen der humanen vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta (hAOSM) eine signifikant verminderte DNA-Synthese nachgewiesen werden.
2. Demnach scheint einwirkende physiologische Dehnung einen antiproliferativen Effekt zu besitzen und so könnte physiologische Dehnung in vivo ein wichtiger Bestandteil des Gleichgewichtes der Vorgänge in der Gefäßwand in einem multifaktoriellen Geschehen sein.
3. Parallel zur dehnungsinduzierten Abnahme der DNA-Synthese von hAOSM Zellen bestand eine dehnungsinduzierte signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität.
4. Unter dem Einfluss physiologischer Dehnung fand sich keine signifikante Änderung der Gesamtzellzahl und des Mitoseindex der hAOSM Zellen
5. Der Mitoseindex der hAOSM Zellen ist sowohl in Kontrolle als auch in Dehnung sehr niedrig, worauf letztendlich zurückzuführen ist, dass bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl noch keine Auswirkungen der dehnungsinduzierten Abnahme der DNA-Synthese nachweisbar war.
6. Die signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität selbst spricht für eine weiterbestehende Vitalität der hAOSM Zellen unter physiologischer Dehnung.
7. Eine Abnahme der DNA-Synthese unter physiologischer Dehnung aufgrund eines Nekrose- bzw. Apoptose-bedingten Zelltodes konnte mittels Bestimmung der Zellzahl, der LDH-Aktivität und der Apoptose ausgeschlossen werden.
8. Abweichend von dem Verhalten der hAOSM Zellen in niedrigen Passagen zeigten hAOSM Zellen der höheren Passagen keine dehnungsinduzierten signifikanten Veränderungen der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität, was möglicherweise auf eine Modulation des Phänotyps der vaskulären glatten Muskelzellen zurückzuführen ist.
9. Unter physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung zeigen humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Koronararterien (hCASM) weder in serumfreiem noch in Vollmedium eine signifikante Veränderung der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität. Ein Nekrose-bedingter Zelltod konnte mit Bestimmung der LDH-Aktivität wie bereits für die hAOSM Zellen ausgeschlossen werden.

10. Da klinisch die pathologische Dehnung mit ihren Folgen im Vordergrund steht, sollte die Restenose - wie sie nach therapeutischer Intervention im Rahmen einer PTCA auftreten kann - in vitro nachgestellt werden. Unter dem Einfluss unphysiologischer Dehnung zeigten hAOSM Zellen über einen Zeitraum von vier Wochen nach Dehnung keine signifikanten Veränderungen der DNA-Synthese oder der metabolischen Aktivität. Ein Nekrose-bedingter Zelltod konnte mit Bestimmung der LDH-Aktivität ebenfalls ausgeschlossen werden.

Ein Restenosemodell war unter dem Einfluss unphysiologischer mechanischer Dehnung in einer Zellkultur humaner vaskulärer glatter Muskelzellen der Aorta nicht nachvollziehbar, da möglicherweise in vivo ein multifaktorielles Geschehen die Entwicklung einer Restenose wesentlich triggert.

## Lebenslauf

---

Tanja Gradištanac

geb. am 21.10.1976 in Böblingen, Baden-Württemberg

1983-87	Grundschule Wildberg, Kreis Calw
1987-96	Otto-Hahn-Gymnasium Nagold
1995/96	Krankenpflegepraktikum Urologie, Kreiskrankenhaus Nagold
1996	Abitur
10/1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg
09/1998	Ärztliche Vorprüfung
10/1998	Beginn der Arbeit zur Dissertation am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie bei Herrn Prof. Dr. G. Isenberg und Frau Dr. rer. nat. A. Hipper; Thema „Einfluss mechanischer Dehnung auf glatte Muskelzellen“
02-03/1999	Famulatur Chirurgie bei Prof. Dr. med. R. Hetzer am Dt. Herzzentrum, Berlin
09/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02-03/2000	Famulatur Allgemeinmedizin Praxis Dr. med. U. Hartmann, Nagold
08/2000	Famulatur Chirurgie bei Prof. Dr. med. L. Addae-Mensah am Lehrkrankenhaus in Kumasi, Ghana
09/2000	Famulatur Pathologie bei Prof. Dr. R. Horvat am AKH, Wien
09/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 - 02/2002	Erstes Tertial des Praktischen Jahres Chirurgie bei Herrn Dr. med. Ch. Richter am Städtischen Krankenhaus Martha-Maria Dörlau, Halle
03/2002 - 05/2002	Zweites Tertial des Praktischen Jahres Innere Medizin bei Herrn Dr. med. R. Sutter an der Klinik Adelheid Unterägeri, Schweiz
06/2002 - 09/2002	Drittes Tertial des Praktischen Jahres Pathologie bei Herrn Prof. Dr. med. habil. H.-J. Holzhausen am Institut für Pathologie, Halle
11/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2003 – 07/2004	Ärztin im Praktikum am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums bei Herrn Prof. Dr. Ch. Wittekind, Leipzig
Seit 08/2004	Assistenzärztin am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums bei Herrn Prof. Dr. Ch. Wittekind, Leipzig

## Selbständigkeitserklärung

---

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß §16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Tanja Gradištanac

## **Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit**

---

1. European Meeting on Vascular Biology and Medicine in Nürnberg, 29. September - 1. Oktober 1999:

Poster "Influence of cyclic mechanical strain on proliferation of human aortic smooth muscle cells"

79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologie in Ulm, 19. - 22. März 2000:

Vortrag „Einfluss mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen des Menschen“