

Untersuchungen zur Pathogenese der "Bypass graft disease"

Dissertation
zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Gudrun Tellmann
geb. in Bremen

Mainz, 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 "Bypass graft disease"	1
1.2 Wissenschaftliche Grundlagen	2
1.2.1 Primäre Atherosklerose versus "Bypass graft disease"	3
1.2.1.1 Ätiologie	3
1.2.1.2 Pathogenese.....	3
1.3 Die Bedeutung der zellulären Proliferation im Verlauf der primären Atherosklerose und der "Bypass graft disease"	7
1.3.1 Analyse der zellulären Proliferation in Gefäßpräparaten	8
1.3.1.1 Nachweistechiken zur Detektion der zellulären Proliferation.....	8
1.3.1.2 Proliferationsstudien: Basisdaten aus der Literatur.....	10
1.3.2 <i>In vitro</i> Modelluntersuchungen zur Analyse der Proliferationsaktivierung in kultivierten humanen Muskelzellen	11
2. Zielsetzung der Arbeit	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1 Material	15
3.2 Histologische Arbeitstechniken	15
3.2.1 Untersuchungsmaterial.....	15
3.2.2 Gewebepräparation und Herstellung von Gewebeschnitten.....	16
3.2.3 Histologische Übersichtsfärbungen.....	16
3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	16
3.2.3.2 Masson-Goldner-Färbung (Trichrom-Färbung)	17
3.2.4 Histomorphologische Klassifizierung humaner Bypass-Gefäße.....	18
3.2.5 Morphometrische Untersuchungen	18
3.2.5.1 Quantifizierung der Querschnittsfläche der Gefäßwand	19
3.2.5.2 Quantifizierung der Zelldichte in der Querschnittsfläche der Gefäßwand.....	19
3.2.6 Immunhistochemie.....	21
3.2.6.1 Einfachfärbungen	21
3.2.6.2 Identifizierung der proliferierenden Zellen (Doppelfärbung)	23
3.2.7 Bestimmung des Proliferationsindex in den humanen Bypass-Gefäßen	23

3.2.8 Bestimmung des prozentualen Anteils eines Zelltyps an der Gesamtzellzahl der proliferierenden Zellen.....	23
3.2.9 Statistische Auswertung.....	24
3.3 Techniken der Zellkultur	24
3.3.1 Isolierung und Kultivierung humaner Muskelzellen der Aorta.....	24
3.3.2 Überprüfung der Reinheit primärkultivierter Muskelzellen.....	25
3.3.3 Überprüfung des Wachstumsverhaltens primärkultivierter Muskelzellen	26
3.3.4 Stimulationsversuche	26
3.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken	27
3.4.1 Standardmethoden der Molekularbiologie	27
3.4.2 Mikrobiologische Arbeitstechniken	28
3.4.2.1 Transformation.....	28
3.4.2.2 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien.....	29
3.4.3 Präparation von Plasmid-DNA	29
3.4.3.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	30
3.4.4 Präparation von Gesamt-RNA	30
3.4.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	31
3.4.6 DNase Verdau der Gesamt-RNA	31
3.4.7 PCR (Polymerase Chain Reaction)	32
3.4.8 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR).....	33
3.4.9 Northern Blot Technik	34
3.4.10 Computergesteuerte Auswertung der RT-PCR- und Northern Blot Ergebnisse	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Histomorphologische Untersuchungen humaner Bypass-Gefäße	37
4.1.1 Etablierung eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für aortokoronare Bypass-Läsionen	37
4.1.1.1 Mikroskopische Anatomie der verschiedenen Typen von Bypass-Läsionen.....	40
4.1.1.2 Ergebnisse der histomorphologischen Klassifizierung der untersuchten Bypass-Gefäße.....	41
4.1.2 Korrelation der histomorphologischen Klassifizierung der untersuchten Bypass-Läsionen (Typ I - III) mit der Implantationsdauer.....	43
4.1.3 Morphometrische Untersuchungen	44
4.1.3.1 Quantifizierung der Querschnittsfläche der Gefäßwand	44
4.1.3.2 Quantifizierung der Zelldichte in der Querschnittsfläche der Gefäßwand	45
4.1.4 Immunhistochemie.....	47
4.1.4.1 Immunhistochemischer Nachweis der Proliferationsaktivität in Bypass-Gefäßen.....	47

4.2 <i>In vitro</i> Zellkulturuntersuchungen humaner glatter Muskelzellen	52
4.2.1 Charakterisierung kultivierter Muskelzellen	52
4.2.2 Untersuchung des mitogenen Einflusses des Wachstumsfaktors PDGF auf kultivierte Muskelzellen	53
4.2.3 Untersuchungen zum Expressionsverhalten der gewählten Kandidatengene	54
4.2.3.1 Analyse des Expressionsverhaltens der gewählten Kandidatengene in humanen Aortagefäßen	54
4.2.3.2 Analyse des Expressionsverhaltens der gewählten Kandidatengene in kultivierten Muskelzellen	55
4.2.4 Untersuchung der Induktionsaktivität des Wachstumsfaktors PDGF auf das Expressionsverhalten der gewählten Kandidatengene in kultivierten Muskelzellen	55
4.2.4.1 Untersuchung der Induktionsaktivität der Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB auf das Expressionsverhalten der "frühen Zellzyklusgene"	56
 5. Diskussion	 63
5.1 Histomorphologische Untersuchungen humaner Bypass-Gefäße	63
5.1.1 Gründe für die Etablierung eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für aortokoronare Bypass-Läsionen	63
5.1.1.1 Gegenüberstellung der histomorphologischen Nomenklaturen: "Bypass graft disease" versus primäre Atherosklerose	64
5.1.2 Die Bedeutung des "Gefäßwand-Remodelings" im progredienten Verlauf der "Bypass graft disease"	67
5.1.2.1 Parameter des "Gefäßwand-Remodelings"	68
5.1.3. Die Bedeutung der zellulären Proliferation im Verlauf der "Bypass graft disease"	69
5.1.3.1 Proliferationsanalysen: Grundlagen aus der Literatur	69
5.1.3.2 Proliferationsanalysen in humanen aortokoronaren Bypass-Läsionen	71
 5.2 <i>In vitro</i> Untersuchungen humaner glatter Muskelzellen	 77
5.2.1 Das Expressionsprofil der Proto-oncogene c-fos und c-myc in humanen Gefäßpräparaten	77
5.2.2 Das Expressionsprofil der Proto-oncogene c-fos und c-myc in kultivierten humanen glatten Muskelzellen der Aorta	78
5.2.3 C-fos und c-myc: Geeignete Targets für gentherapeutische Interventionen?	81
 6. Zusammenfassung	 84
 7. Literatur	 86
 8. Anhang	 99
 9. Lebenslauf	 106

10. Publikationsliste.....	107
11. Danksagung.....	110

Abkürzungen und Fachtermini

A. bidest.	Aqua bidestillata
AD	Adventitia
AHA	American Heart Association
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
IEG(s)	Immediate-early gene(s)
IMA	Arteria mammaria interna
KHK	Koronare Herzerkrankung
ME	Media
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NI	Neointima
OD	optische Dichte
PCNA	Proliferating cellular nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI	Proliferationsindex
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastik
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
Sek.	Sekunde(n)
Taq	Thermus aquaticus
TEA	Thrombendarteriektomie
U	Units, internationale Enzymeinheit
VSM	Vena saphena magna
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 "Bypass graft disease"

Die atherosklerotisch bedingte koronare Herzerkrankung (KHK) zählt zu den führenden Todesursachen in der westlichen Welt.

Neben interventionellen Therapiestrategien, wie z. B. Ballondilatation und Stentimplantation, ist die chirurgische Behandlung der KHK durch Anlage autologer arterieller und / oder venöser Gefäßtransplantate zur Überbrückung stenosierter Gefäßstrecken in den letzten drei Jahrzehnten zum weltweiten Standard geworden (LEWIS und DEHMER, 1985; GRONDIN et al., 1989; HOLTGEN et al., 1993 / Abb. 1.1). Venöse Gefäßtransplantate finden insbesondere bei Mehrgefäßerkrankungen unter Verwendung der Vena saphena magna Einsatz.

Trotz enormer Fortschritte in der operativen Technik bei der Gefäßrekonstruktion und Optimierung der postoperativen Medikation konnte die Langzeitprognose der aortokoronaren Bypässe, gekennzeichnet durch die Gefäßdurchgängigkeit, nicht wesentlich verbessert werden. Postoperative Studien zeigten, dass lediglich 50 % der venösen Bypass-Segmente nach zehn Jahren *in vivo* Laufzeit frei von signifikanten Stenosen sind. 20 % der behandelten Patienten benötigen eine erneute Intervention (MOTWANI und TOPOL, 1998).

Grund für das Versagen der implantierten Gefäße ist die Entwicklung einer Transplantatatherosklerose, die sich im Gegensatz zu den primäratherosklerotischen Läsionen¹⁾, die sich "schleichend" über Jahrzehnte ausprägen (ROSS 1986, 1993), unter Umständen innerhalb von Monaten ausbildet (MOTWANI und TOPOL, 1998). Das damit verbundene Krankheitsbild wird als "Bypass graft disease" bezeichnet.

Die Charakterisierung der verantwortlichen Krankheitsgene sowie der zellulären Mechanismen, welche zur "Bypass graft disease" führen, sind von zentralem Interesse, um neue Ansatzpunkte für Behandlungsstrategien der Bypass-Verschlusskrankheit zu eröffnen.

¹⁾ Der Begriff "primäre Atherosklerose" charakterisiert in dieser Arbeit die atherosklerotische Primärerkrankung arterieller Gefäße, die den "sekundären" atherosklerotischen Gefäßveränderungen der "Bypass graft disease" gegenübergestellt werden.

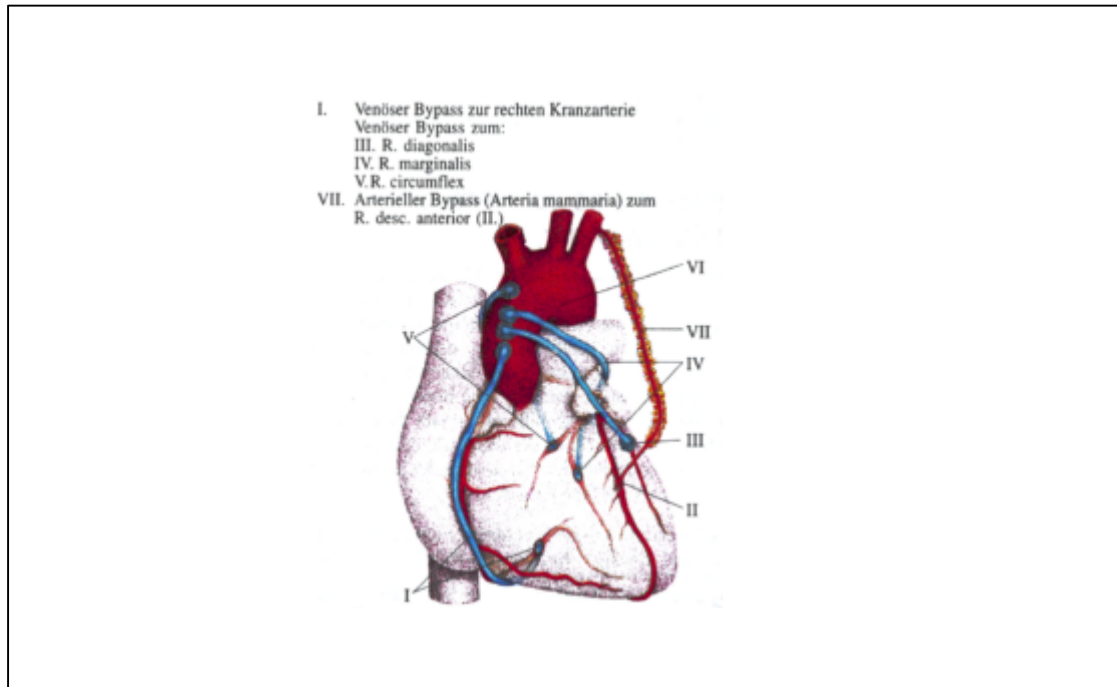


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Bypass-Anlage.

1.2 Wissenschaftliche Grundlagen

Die Pathogenese der "Bypass graft disease" ist in verschiedene Entwicklungsstadien der progredienten Gefäßwandumgestaltung zu untergliedern, die durch histomorphologische Korrelate (Neointima, atherosklerotische Veränderungen) charakterisiert sind (u.a. DILLEY et al., 1988; KALAN und ROBERTS, 1990; SAFIAN et al., 1990; BULKLEY, 1980; VAN DE WAL et al., 1992; MILLS und EVERSON, 1995). Ein Phänomen, das bereits von primäratherosklerotischen Erkrankungen bekannt ist. Doch trotz Gemeinsamkeiten in den Pathomechanismen der Gefäßwandveränderung stellen die "Bypass graft disease" und die primäre Atherosklerose klinisch und pathophysiologisch zwei unterschiedliche Gefäßerkrankungen dar. Wesentlich ist der Unterschied der Ausgangssituation der betroffenen Gefäße. Während die primäre Atherosklerose eine "Primärerkrankung" des nicht-manipulierten arteriellen Gefäßsystems ist (d.h. ohne chirurgische Intervention), entspricht die "Bypass graft disease" einer "Sekundärerkrankung" venöser bzw. arterieller Gefäßsegmente²⁾, die in den arteriellen Kreislauf implantiert wurden.

²⁾ In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der venösen aortokoronaren "Bypass graft disease".

1.2.1 Primäre Atherosklerose versus "Bypass graft disease"

1.2.1.1 Ätiologie

Entsprechend dem heutigen wissenschaftlichen Stand wird die "response to injury" Theorie von RUSSELL ROSS (1986) weitestgehend als Arbeitshypothese für die Entstehung der **primären Atherosklerose** anerkannt. Diese Theorie beschreibt als den auslösenden Moment der atherogenen Gefäßwandveränderung eine lokale Verletzung und / oder Störung der intimalen Endothelzellen, induziert durch mechanische, immunologische, toxische und entzündliche Faktoren sowie Viren (ROSS, 1993).

Ebenso wie für die primäre Atherosklerose wird auch bei der "**Bypass graft disease**" eine Verletzung als Induktor der Pathogenese des Bypass-Gefäßes angenommen ("response to injury" Theorie / ROSS, 1986). Jedoch ist im Fall der "Bypass graft disease" zu beachten, dass neben den genannten kausalpathologischen Risikofaktoren der primären Atherosklerose das Spektrum der multifaktoriellen Ätiologie durch präoperative (pathomorphologische Veränderungen der nativen Vene), perioperative (z.B. Venenpräparation, Lagerlösung der Vene bis zum Zeitpunkt der Implantation, Venendilatation) sowie postoperative Verletzungen (z.B. Implantation des venösen Gefäßes in den arteriellen Kreislauf) des entsprechenden Bypass-Gefäßes erweitert wird (DAVIES und HAGEN, 1995; MILLS und EVERSON, 1995).

1.2.1.2 Pathogenese

1.2.1.2.1 Primäre Atherosklerose: Ein "schleichender" Prozess über Jahrzehnte

Die primäre Atherosklerose stellt einen Prozess dar, der "schleichend" über Jahrzehnte ausgeprägt wird und über viele Dekaden klinisch unauffällig verläuft. Eine Untergliederung der Atherogenese in verschiedene Stadien ist an Hand histomorphologischer Charakteristika möglich.

Ludwig Aschoff unterschied bereits in den dreißiger Jahren zwischen einer "frühen" Gefäßkrankheit bei Kindern und einer "späten" Form bei Erwachsenen. Wobei er zwei Komponenten, die an der pathomorphologischen Veränderung beteiligt waren, differenzierte: Lipideinlagerungen in die Intima bei Kindern, die er als *atherosis* bzw. *atheromatosis* bezeichnete, und fibrotische Auflagerungen (Sklerose, Kollagenbildung) auf die Lipideinlagerung

bei Erwachsenen. Nur das fortgeschrittene Stadium, das sich durch die Kombination der Lipideinlagerung mit fibrotischer Auflagerung auszeichnete, bezeichnete Aschoff als *atherosclerosis* (ASCHOFF, 1930, 1933).

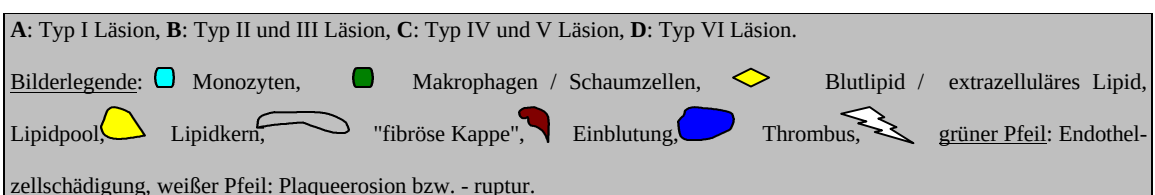
In den fünfziger Jahren klassifizierten Pathologen weitere Stadien: Fettstreifenläsionen, fibröse Plaques, "komplizierte" Läsionen (GORE und TEJADA, 1957; HOLMAN et al., 1958). Eine Weiterentwicklung dieser Klassifizierung wurde schließlich durch die World Health Organization (WHO, 1958) vorgenommen.

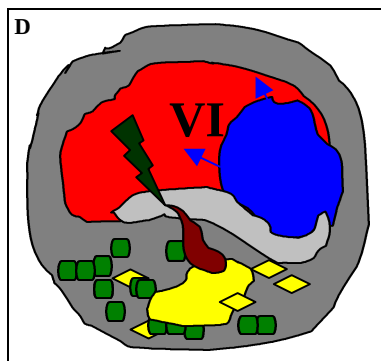
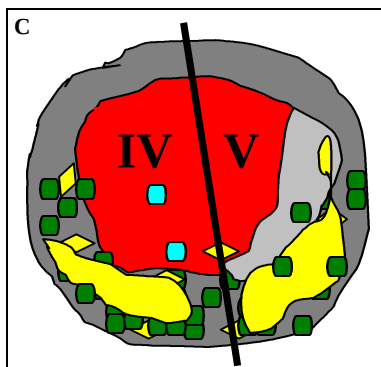
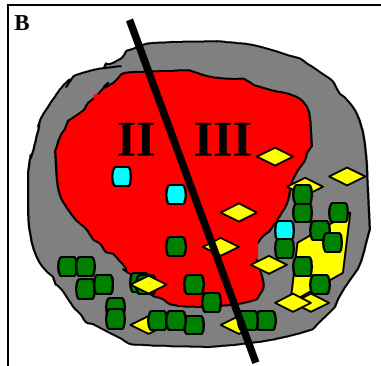
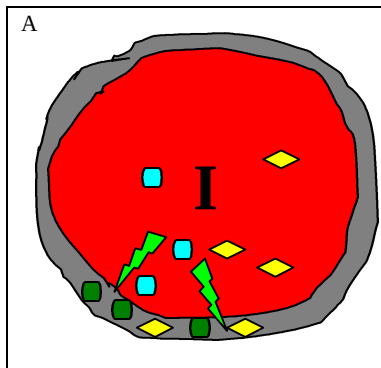
Fortschritte in den technischen Möglichkeiten zur Untersuchung von histologischen Präparaten in den folgenden Jahrzehnten führten zur Differenzierung weiterer Stufen des fortschreitenden Wandumbaus primäratherosklerotischer Läsionen, die durch die American Heart Association (AHA) in einem Klassifizierungsschema definiert wurden (STARY et al., 1994, 1995; STARY 2000). Mit der Etablierung dieser international anerkannten Nomenklatur war ein Bezugssystem entstanden: zum einen für histologische Untersuchungen, zum anderen für eine kooperative Zusammenarbeit von Wissenschaftlern. Dieses hat maßgeblich die Entschlüsselung der Ätiologie und Pathogenese der primären Atherosklerose vorangetrieben.

Die Nomenklatur der AHA beschreibt acht Subtypen (I – VIII nach AHA), die die aufeinander aufbauenden Stadien der primäratherosklerotischen Gefäßwandumgestaltung histomorphologisch charakterisieren (STARY et al., 1994, 1995; STARY, 2000 / Abb. 1.2).

Die "frühen" atherosklerotische Läsionen (Typ I, II nach AHA) werden bereits im frühen Kindesalter manifestiert (STARY et al., 1994), während Typ III Läsionen zumeist erst nach der Pubertät Ausprägung finden. Die Ausbildung "fortgeschrittener" Läsionen (Typ IV, V) beginnt im allgemeinen erst nach der dritten bzw. vierten Lebensdekade (STARY et al., 1995). Klinisch sind die atherosklerotischen Läsionen I – III über viele Jahrzehnte unauffällig. Sogar die "fortgeschrittenen" Typ IV Formen führen auf Grund ihrer begrenzten Lumenstenose häufig zu keinem akuten klinischen Befund. Symptomatisch sind spätestens Typ VI Läsionen (z.B. Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod / STARY et al., 1995).

Abb. 1.2 Darstellung der verschiedenen Stadien der primären Atherosklerose nach dem Klassifizierungsschema der AHA.





Klassifizierungsschema der AHA:

Entsprechend der AHA Typisierung stellt die Infiltration von Entzündungszellen (Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten) sowie das Eindringen von Blutlipiden in den subendothelialen Raum auf Grund einer Verletzung der endothelialen Gefäßwandbarriere den Beginn der Atherogenese dar (Frühläsion: **Typ I** – Abb. 1.2 A / STARY, 1994). Durch die zunehmende Akkumulation modifizierter Makrophagen (Schaumzellen) in die Intima, welche durch intrazelluläre Lipideinlagerung imponieren, kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Fettstreifenläsion (**Typ II** – Abb. 1.2 B / STARY et al., 1994).

Im Zuge der fortschreitenden Läsionsentwicklung wird zusätzlich extrazelluläres Lipid intimal eingelagert (Lipidtröpfchen), das vereinzelt zu kleinen Lipidpools zusammenfließt (Prä-Atherom: **Typ III** – Abb. 1.2 B / STARY et al., 1994). In diesem Stadium der Atherogenese erfolgt ferner die "Aktivierung" der Proliferation der vaskulären Muskelzellen, gekennzeichnet durch eine drastische Größenzunahme der atherosklerotischen Läsion .

Bei der Typ IV Läsion schließlich kommt es durch die Einschmelzung der extrazellulären Lipiddepots zu einem zentralen Lipidkern (Atherom: **Typ IV** - Abb. 1.2 C / STARY et al., 1995), der mit zunehmender Progression durch eine aufgelagerte "fibröse Kappe" (Fibroatherom: **Typ V** – Abb. 1.2 C / STARY et al., 1995) von dem luminalen Blutstrom abgeschottet werden kann. Ausgehend von den Typ IV und V Läsionen ist eine degenerative Weiterentwicklung dieser Zustandsformen durch Kalzifizierung (**Typ VII**) bzw. Fibrosierung (**Typ VIII**) möglich, die von der Gesamtsituation des Gefäßes (Konzentration der Blutfette, Stoffwechselmetabolite und Entzündungsmediatoren; hämodynamische Bedingungen) abhängt (STARY, 2000).

Typ IV und Typ V können auch "komplizierte Läsionen" (**Typ VI** – Abb. 1.2 D) ausprägen, die durch Erosion bzw. Ruptur der Plaqueoberfläche und / oder Einblutung in den Plaque gekennzeichnet sind (STARY et al., 1995; STARY, 2000). Diese Oberflächendefekte bedingen thrombotische Komplikationen, die entweder ein episodisches Plaquewachstum oder aber eine partielle bzw. vollständige Gefäßokklusion mit entsprechender klinischer Ischämiesymptomatik (z.B. Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod) auslösen.

1.2.1.2.2 "Bypass graft disease": Eine "beschleunigte" Form der primären Atherosklerose

Im Gegensatz zu der "schleichenden" Läsionskinetik bei der primären Atherogenese erfolgt die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen bei der "Bypass graft disease", die zu akuten klinischen Symptomen führen, unter Umständen innerhalb von Monaten. Auf Grund dieser Genese wurde der Ausdruck der "beschleunigten Atherosklerose" für die "Bypass graft disease" geprägt (BULKLEY und HUTCHINS, 1977).

Statistische Untersuchungen bezüglich des Restenose- bzw. Okklusionsverhaltens aortokoronarer venöser Umgehungsplastiken zeigten, dass bereits im ersten Jahr nach Anlage eines Bypasses bis zu 15 % dieser Gefäße eine Okklusion aufweisen. Für die Zeitspanne vom ersten bis zum sechsten Jahr nach dem chirurgischen Eingriff wurde eine Verschlussrate zwischen ein bis zwei Prozent und folgend (sechstes bis zehntes Jahr) von vier Prozent pro Jahr ermittelt. Postoperative Kontrolluntersuchungen nach zehn Jahren zeigten lediglich bei 60 % der implantierten Venen eine Durchgängigkeit, und nur 50 % dieser Bypass-Segmente waren frei von signifikanten Stenosen (MOTWANI und TOPOL, 1998).

Als Ursache für die "beschleunigte Atherosklerose" der venösen Bypass-Gefäße wird nach dem heutigen Stand der Wissenschaft zum einen die Integration des venösen Bypass-Gefäßes in das arterielle Drucksystem ("Arterialisierung" / BULKLEY und HUTCHINS, 1977) sowie zum anderen die multifaktorielle Ätiologie der "Bypass graft disease" diskutiert (BADIMON et al., 1993). Ferner sehen DAVIES und HAGEN (1995) in der massiveren initialen Verletzung der Bypass-Gefäße (präoperative, perioperative, postoperative Verletzungen) Induktoren der "beschleunigten Pathogenese".

Ein weiterer Punkt, der als bedeutend im Zusammenhang mit der "beschleunigten Atherosklerose" der Bypass-Gefäße angesehen wird, sind pathomorphologische Veränderungen (Sklerose der Intima und Media), die "native" Venensegmente bereits zum Zeitpunkt ihrer Präparation und somit vor ihrer Implantation als aortokoronare Bypässe aufweisen (THIENE et al., 1980; DILLEY et al., 1988). Diese sklerotischen Anomalien werden häufig unter dem Begriff der Phlebosklerose zusammengefasst (VARTY et al., 1993). PANETTA und Mitarbeiter (1992) postulierten, dass zwei bis fünf Prozent der präparierten nativen Venensegmente eigentlich nicht als Bypass-Präparate verwendbar sind und bis zu 12 % als "erkrankt" einzustufen sind. Vergleichende Studien zeigten, dass implantierte "erkrankte" Venen im Vergleich zu "nicht-erkrankten" Venen eine um 50 % erhöhte Okklusionsrate aufweisen (PANETTA et al.; 1992, VARTY et al., 1993).

Histomorphologische Untersuchungen, welche die analysierten Bypass-Fallgruppen hinsichtlich temporärer Parameter (Implantationsdauer: Stunden, Tage, Wochen, Monate) untergliederten, berichteten "zeitabhängige" pathomorphologische Veränderungen von Bypass-Segmenten (VLODAVER und EDWARDS, 1971; UNI et al., 1974; BULKLEY und HUTCHINS, 1977). Während im Verlauf des ersten Jahres vorrangig eine Intimahyperplasie ("frühe Reaktion") beobachtet werden konnte, wurden atherosklerotische Veränderungen von verschiedensten Arbeitsgruppen als "späte Reaktion" (nach sechs bis zwölf Jahren) im Verlauf der "Bypass graft disease" eingestuft (BARBORIAK et al., 1974; NEITZEL et al., 1986; DILLEY et al., 1988; KALAN et al., 1990).

Abzugrenzen von den histomorphologischen Gefäßwandveränderungen (Intimahyperplasie, atherosklerotische Läsion) ist der thrombotische Frühverschuß, der in drei bis zwölf Prozent der Fälle zu einer Okklusion von Vena saphena magna Bypässen innerhalb des ersten Monats führt (MOTWANI und TOPOL, 1998).

Ein präzise histologische Klassifizierung der verschiedenen pathomorphologischen Stadien der "Bypass graft disease", entsprechend des Entwurfs der AHA für primäratherosklerotische Läsionen (1.2.1.2.1, Abb. 1.2), lag bisher nicht vor und stellte eine Anforderung dieser Arbeit dar. Ziel war es, mit Hilfe einer Nomenklatur für Bypass-Läsionen analysierte Parameter morphometrischer und immunhistochemischer Untersuchungen in Bezug auf das pathomorphologische Stadium der "Bypass graft disease" einordnen und beurteilen zu können.

1.3 Die Bedeutung der zellulären Proliferation im Verlauf der primären Atherosklerose und der "Bypass graft disease"

Differenzierung, Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen sowie die Zunahme der extrazellulären Matrix führen zur Neointimahyperplasie, dem zentralen Befund der primäratherosklerotischen Verschlusskrankheiten (CLOWES et al., 1983; ROSS, 1993; GIBBONS, 1995) und der "Bypass graft disease" (ANGELINI und NEWBY, 1989).

In den letzten Jahren stand insbesondere die pathophysiologische Proliferation der vaskulären Muskelzellen im Mittelpunkt zahlreicher Studien im Tiermodell (u.a. CLOWES et al., 1983; SCHWARTZ et al., 1986; O'BRIEN et al., 1997), in immunhistochemischen Analysen humaner Gewebepreparate (Anhang: Tab. 5.1, 5.2) sowie in *in vitro* Zellkulturuntersuchungen

(u.a. DARTSCH et al., 1990; SOYOMBO et al., 1990; FUJITA et al., 1993). Schwerpunkt dieser Analysen bildeten vorwiegend primäratherosklerotische und restenotische Verschlusskrankheiten.

Zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die immunhistochemische Detektion der Proliferationsaktivität in humanen venösen aortokoronaren Bypass-Präparaten mittels anerkannter Proliferationsmarker (PCNA, Ki-67). Der Proliferationsstatus aortokoronarer Bypass-Läsionen ist zuvor nicht in der Literatur beschrieben worden.

Des Weiteren sollten im *in vitro* Zellkultursystem mittels Expressionsstudien Kandidatengene (c-fos, c-myc) untersucht werden, denen eine Bedeutung bei der Proliferationsaktivierung vaskulärer Muskelzellen zugesprochen wird.

1.3.1 Analyse der zellulären Proliferation in Gefäßpräparaten

1.3.1.1 Nachweistechiken zur Detektion der zellulären Proliferation

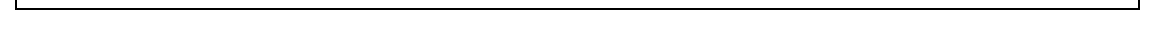
Kernhaltige Zellen teilen sich durch mitotische Zellteilung. Eine komplizierte Abfolge von Zellteilungen lässt einen vielzelligen Organismus entstehen. Auch wenn höhere Tiere oder Pflanzen das adulte Stadium erreicht haben, ist gewöhnlich weiterhin Zellteilung erforderlich, damit die durch natürlichen Verschleiß (Apoptose, Nekrose) zerstörten Zellen ersetzt werden. Die mitotische Zellteilung ist bei einer typischen Eukaryontenzelle in vier aufeinanderfolgende Stadien untergliedert: Mitose (M)-, Gap 1 (G₁)-, Synthese (S)- und Gap 2 (G₂)-Phase (HALL und LEVISON, 1990 / Abb. 1.3).

Zur Analyse der Zellproliferation stehen grundsätzlich zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung (LINDEN et al., 1992):

- Bestimmung der Proliferationsrate durch den Nachweis der DNA Synthese während der S-Phase mittels Nukleotid-Analoga (³H-Thymidin- bzw. BrdU-Markierung / Abb. 1.3). Standardverfahren, die zum Nachweis der Proliferation bei Tierversuchen und Zellkulturuntersuchungen Verwendung finden.
- Bestimmung des aktiven Stadiums des Zellzyklus durch Antikörper, die spezifisch für Antigene sind, deren Expression an bestimmte Phasen des Zellzyklus gekoppelt ist (Abb. 1.3). Nachweisteknik zur Detektion proliferierender Zellen in Gewebsschnitten sowie in der Zellkultur.

- Das Profil der PCNA-Expression ist differentiell über den gesamten Zellzyklus ausgeprägt

- Environ Biol Fish (2015) 98:1031–1041



Darstellung der spezifischen Marker der verschiedenen Zyklusphasen.

G0: Ruhephase, G1: Gap 1-Phase, R: Restriktionspunkt, S: Synthese-Phase, G2: Gap 2-Phase, M: Mitose-Phase.

1.3.1.2 Proliferationsstudien: Basisdaten aus der Literatur

Untersuchungen in den 70er- und 80er-Jahren im Tiermodell zeigten die Bedeutung der Proliferation von Gefäßzellen im Verlauf von Vaskulopathien. Insbesondere die Proliferationsaktivität der vaskulären Muskelzellen wurde in diesen Studien als wesentlicher Faktor zur Ausprägung der Neointimahyperplasie herausgearbeitet.

Aus dem Themenfeld der Vaskulopathien wurden speziell die restenotischen Gefäßerkrankungen in umfangreichen Tiermodelluntersuchungen (Rattenmodell) analysiert (u. a. CLOWES et al., 1983; SCHWARTZ et al., 1986). Nach diesen Berichten zeigten vaskuläre glatte Muskelzellen eine schnelle und starke "Proliferationsantwort" in Folge einer induzierenden Verletzung mit Proliferationsindizes von 30 – 70 %, die nach einigen Wochen (8 – 12 Wochen) wieder auf die basale Proliferationsaktivität "ruhender" Muskelzellen zurückging (0,06 %).

Bezugnehmend auf die Daten des Tiermodells war es anfänglich überraschend, dass Analysen, die zur Bestimmung der Proliferationsaktivität in humanen primäratherosklerotischen und restenotischen Gefäßpräparaten durchgeführt wurden, nur eine sehr geringe zelluläre Proliferation mit einem Index von durchschnittlich unter 3 % erbrachten (u.a. GORDON et al., 1990; PICKERING et al., 1993; KATSUDA et al., 1993; O'BRIEN et al., 1993; BRANDL et al., 1997; MAREK et al., 1998 / Anhang: Tab. 5.1, 5.2). Jedoch gewinnt der ermittelte Proliferationsindex in humanen Geweben losgelöst von den Ergebnissen des Tiermodells an Bedeutung, wenn berücksichtigt wird, dass der Proliferationsindex eines "gesunden" Gefäßes unter 0,1 % liegt, was einer Teilungsrate einer Muskelzelle von einmal in 30 Jahren entspricht (WESTERBAND et al., 1997). Zudem steht dieser niedrige Index im Einklang mit dem "schleichenden" Verlauf der primären Atherogenese beim Menschen (GORDON et al., 1990).

Proliferationsuntersuchungen zur "Bypass graft disease", die im Tiermodell nur begrenzt (u.a. O'BRIEN et al., 1997) und in humanen Präparaten bislang ausschließlich an peripheren Gefäßläsionen vorgenommen wurden (HOFSTRA et al., 1996; WESTERBAND et al., 1997, 1998), zeigten vergleichbare Abweichungen der Proliferationsdaten zwischen den Spezies wie sie bei den primäratherosklerotischen Läsionen beobachtet wurden.

1.3.2 *In vitro* Modelluntersuchungen zur Analyse der Proliferationsaktivierung in kultivierten humanen Muskelzellen

Die zelluläre Proliferation entspricht einem streng regulierten Prozess, der sich aus zahlreichen Einzelreaktionen zusammensetzt. Extrazelluläre Signale (Hormone, Wachstumsfaktoren, Zellkontakte) werden einer Zelle vermittelt, über intrazelluläre Signaltransduktionsketten zum Zellkern weitergeleitet und dort durch gezielte Modulation der Genexpression umgesetzt (NEWBY et al., 1997; Abb. 1.4).

Die Entschlüsselung der Funktion und Regulation der Faktoren der Signaltransduktionsketten ist seit Jahrzehnten Schwerpunkt zahlreicher Forschungsprojekte, da das Verständnis dieser

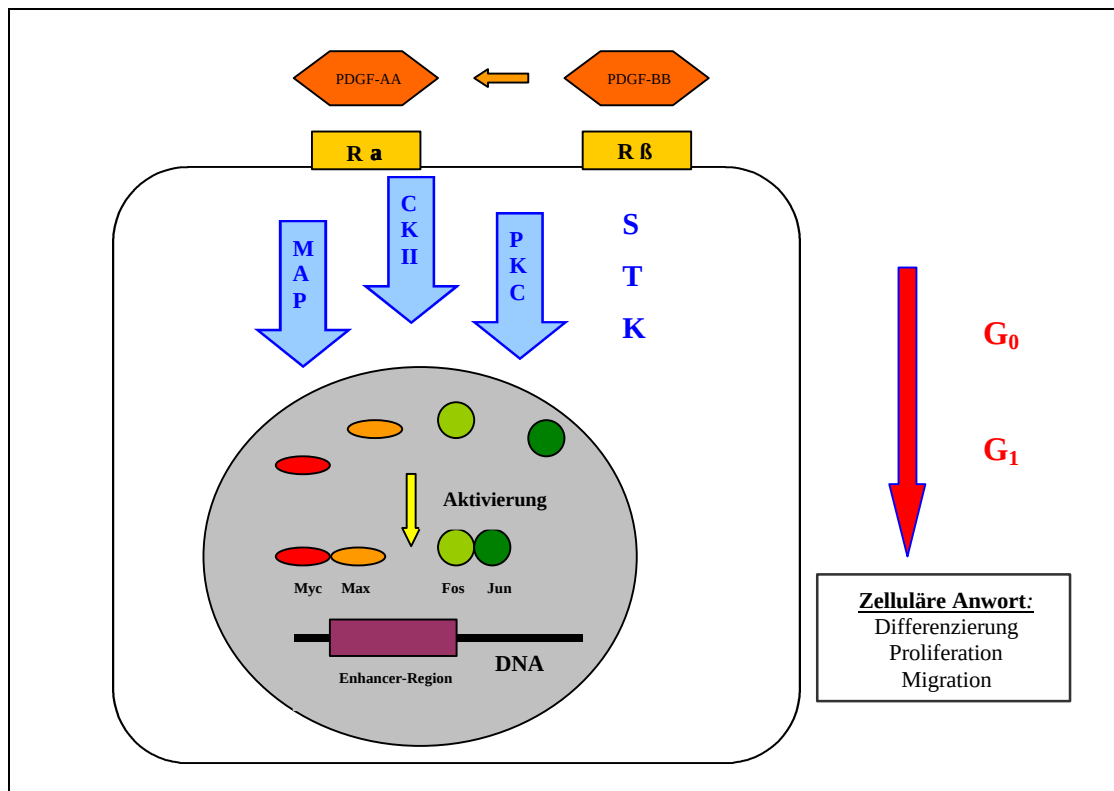


Abb. 1.4 Mitogen-abhängige Stimulation von nukleären Transkriptionsfaktoren.

R α : PDGF-Rezeptor α , R β : PDGF-Rezeptor β , STK: Signaltransduktionskette: MAP ("mitogen-activated kinase"), PKC (Protein Kinase C), CK II (Casein Kinase II).

Das **Fos**-Protein bindet gemeinsam mit seinem Partnerprotein JUN an AP-1 ("activator protein-1") Konsensussequenzen (PIECHACZYK und BLANCHARD, 1994). Die Aktivierung des Fos-Proteins erfolgt u.a. durch die Enzyme der intrazellulären Signaltransduktionskette PKC, cdc 2 ("cell division cycle-regulated protein") und cdk 1 ("cyclin-dependent protein kinase").

Das **Myc**-Protein bildet mit seinem Bindungspartner Max ein Heterodimer und bindet an E-Box-Motive in der DNA-Enhancer-Region (KATO und DANG, 1992). Die Aktivierung des Myc-Proteins erfolgt u.a. durch die Proteinkinasen CK II, MAP und GSK (Glykogen-Synthase-Kinase 3).

Zusammenhänge Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen pathogener Mechanismen bietet. Insbesondere gentherapeutische Behandlungsstrategien zur Unterdrückung der Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand stehen im Fokus für kardiovaskuläre Erkrankungen.

Eine Gengruppe, die in diesem Zusammenhang von Interesse ist, bilden die nukleären Proto-oncogene (u.a. c-fos, c-jun, c-myc). Deren Genprodukte, d.h. nukleären Proteine, fungieren als Transkriptionsfaktoren und bewirken im Zellkern durch die Aktivierung der Expression spezieller Gene die abschließende Umsetzung des extrazellulären Signals. Dadurch kommt es zum Eintritt der Zelle vom "ruhenden" (G₀-Phase) in den "aktiven", kompetenten Zellzykluszustand (G₁-Phase), weshalb diese Genfamilie auch unter dem Begriff "competence genes" zusammengefasst wird (COCHRAN 1983, 1984).

Entsprechend ihrer Aufgabe erfolgt die Expression dieser nukleären Faktoren mitogenabhängig in der frühen Phase des Zellzyklus ("immediate-early genes" (IEGs) / KELLY et al., 1983; LAU und NATHANS, 1987; KATO und DANG, 1992; MEICHLE et al., 1992).

Möglichkeiten zur Untersuchung spezifischer Gene bezüglich ihrer Funktion und zur Identifizierung ihrer Steuerelemente bieten Expressionsstudien im *in vitro* Modellsystem.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im *in vitro* Modell die Regulation der Genexpression des Proto-oncogens c-myc, welches bereits in früheren Studien dieser Arbeitsgruppe Kandidatengen verschiedener Fragestellungen war, unter mitogenabhängiger Stimulation analysiert werden. Zusätzlich sollte der Transkriptionsfaktor c-fos in diese Untersuchungen eingeschlossen werden, da es sich bei diesem Proto-oncogen um ein Gen handelt, das im Zusammenhang mit der zellulären Proliferationsaktivierung bereits gut charakterisiert ist (PIECHACYZK und BLANCHARD, 1994). Als Mitogen sollte der Wachstumsfaktor PDGF (Platelet-derived growth factor) fungieren, dem als Steuerelement der Proliferationsinduktion vaskulärer Zellen in primäratherosklerotischen Gefäßkrankheiten sowie der "Bypass graft disease" eine zentrale Rolle zugesprochen wurde (ROSS, 1993; BRYAN et al., 1994).

Der **Wachstumsfaktor PDGF** setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen, die als A- und B-Ketten bezeichnet werden (ROSS et al., 1986). Unterschiedliche Gene kodieren die beiden Kettenprodukte A und B (BONTHRON et al., 1988; RAO et al., 1986), die in variierender Kombination die drei möglichen PDGF-Dimere (AA, AB oder BB) bilden (NEWBY und GEORGE, 1993). Die Expression der PDGF-Gene wird unabhängig voneinander durch bestimmte

Cytokine (z.B. Interleukin 1) und Wachstumsfaktoren (z. B. Tumornekrosefaktor- α), die von aktivierten Zellen freigesetzt werden, reguliert.

Alle dimeren Formen des PDGF-Proteins stellen potente Mitogene dar, die ferner vasokonstriktiv und chemotaktisch wirken (ROSS et al., 1974; JAWIEN et al., 1992). Ihre biologische Aktivität übermitteln die drei verschiedenen PDGF-Isomere durch zwei verschiedene PDGF-Rezeptor-Subtypen (α - und β -Rezeptor / HELDIN et al., 1988). Die Rezeptor-Subtypen liegen in unstimulierten Zellen in der monomeren Form vor. Hingegen scheint in stimulierten Zellen eine Zusammenlagerung der Monomere zum Dimer in Folge der Bindung dimerer PDGF-Proteine bewirkt zu werden. Der α -Subtyp des PDGF-Rezeptors bindet sowohl die A- als auch die B-Polypeptidkette des PDGF, der β -Subtyp hingegen nur die B-Polypeptidkette. Das bedeutet, dass an den β -Rezeptor die PDGF-BB und vermutlich auch die PDGF-AB Form bindet (DROZDOFF und PLEDGER, 1991), jedoch nicht die PDGF-AA Variante (ROSS et al., 1986 / Abb. 1.4).

2. Zielsetzung der Arbeit

Histomorphologische Untersuchungen und *in vitro* Zellkulturanalysen bilden die Grundlage für Fortschritte im Verständnis der pathologischen Mechanismen der aortokoronaren "Bypass graft disease".

Zielsetzung der histomorphologischen Studien dieser Arbeit war es, ein Klassifizierungsschema zu definieren, das den progressiven Verlauf der Umgestaltung der Bypass-Architektur im Zuge der "Bypass graft disease" charakterisiert. Diese Nomenklatur sollte als Bezugssystem eine optimale Auswertung histologischer Untersuchungen (morphometrischer und immunhistochemischer Analysen) in Korrelation mit dem pathomorphologischen Zustand der Bypass-Präparate ermöglichen.

Morphometrische Analysen, bei denen die Parameter Querschnittsfläche und Zelldichte erfasst wurden, sollten Aufschluss über die Beteiligung der einzelnen Regionen der dreischichtigen Gefäßanatomie bei der progredienten Bypass-Umgestaltung im Verlauf der "Bypass graft disease" geben. Darüber hinaus sollte die Bedeutung der zellulären Proliferation (immunhistochemische Detektion) im Zuge der Bypass-Pathogenese charakterisiert werden.

In vitro Zellkulturanalysen mit humanen Muskelzellen der Aorta wurden zur Untersuchung der mitogenabhängigen Expressionsstimulation der "frühen" Zellzyklus Gene c-fos und c-myc, die maßgeblich an der Induktion der zellulären Proliferation beteiligt sind, durchgeführt. Als Stimulanzen wurden die homodimeren Varianten des Wachstumsfaktors PDGF gewählt, dem eine zentrale Funktion bei der Proliferationsaktivierung bei Vaskulopathien zugesprochen wird.

3. Material und Methoden

3.1 Material

- ◆ Die Chemikalien und Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Serva Feinbiochemica (Heidelberg) bezogen. Alle Chemikalien waren p. a. bzw. von dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.
- ◆ Die Farbstoffe für die histologischen Übersichtsfärbungen wurden von der Firma Chroma Gesellschaft GmbH & Co (Münster) erworben. Produkte für die histologische Präparation der Untersuchungsgewebe wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.
- ◆ Für die Kultivierung der humanen Muskelzellen wurden Substanzen der Firmen Sigma (Deisenhofen), PromoCell (Heidelberg) und Roche (Mannheim) verwendet.
- ◆ Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein) und Pharmacia GmbH (Freiburg) eingesetzt.

3.2 Histologische Arbeitstechniken

3.2.1 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten humanen Bypass-Gefäße wurden bei koronaren Re-Operationen in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Bypässe wurden bei Patienten explantiert, die im Rahmen eines erneuten Koronareingriffs operiert wurden. Hierbei wurden bei insgesamt 30 Patienten stenosierte Bypass-Gefäße entnommen (Arteria mammaria interna (IMA), Vena saphena magna (VSM), Fallgruppe n = 30 / Anhang: Tab. 3.1). Ferner wurden fünf native Bypass-Proben in die Untersuchungsreihen eingeschlossen (VSM, Kontrollgruppe n = 5 / Anhang: Tab. 4.3).

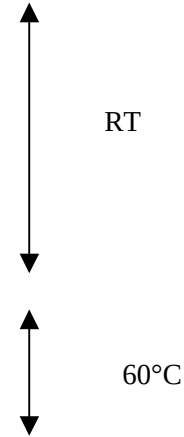
Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in 0,5 cm große Stücke quer zum Restlumen geschnitten und fixiert.

3.2.2 Gewebepräparation und Herstellung von Gewebeschnitten

Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte nach standardisierten histologischen Techniken (KNOCHE, 1979).

Protokoll:

- Gewebefixierung: - 4 %iges Paraformaldehyd bzw. Methanol, über Nacht, 4°C
- Paraffineinbettung:
 - 1 x PBS, 2 h
 - 70 %iges Isopropanol, 1 h
 - 80 %iges Isopropanol, 1 h
 - 96 %iges Isopropanol, 1 h
 - 100 % iges Isopropanol, 1 h
 - Rotihistol, 1 h
 - Rotihistol-Paraffin-Gemisch (1:2), 1 h
 - Paraffin, über Nacht
 - Paraffin, ca. 4 h
 - Aushärtung und Lagerung des eingebetteten Gewebes bei – 20°C
- Herstellung von Gewebeschnitten:
 - Schlittenmikrotom (Leica RM 2155)
 - Aufziehen der Gewebeschnitte auf silanisierte Objektträger (Menzel SuperFrost, Roth, Karlsruhe)



3.2.3 Histologische Übersichtsfärbungen

Übersichtsfärbungen wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die histomorphologische Anatomie der untersuchten Bypass-Präparate zu beurteilen.

3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Protokoll:

- Entparaffinierung:
 - 2x Rotihistol, 20 Min.
 - 100 %iges Isopropanol, 10 Min.
 - 96 %iges Isopropanol, 10 Min.

- 80 %iges Isopropanol, 10 Min.
- 70 %iges Isopropanol, 10 Min.
- A. bidest., 10 Min.
- Färbung:
 - Hämatoxylin nach Mayer, ca. 10 Min.
 - Wässern in Leitungswasser, 15 Min.
 - Differenzieren in 1 %igem HCl in 70 %igem Isopropanol, wenige Sekunden
 - Eintauchen in A. bidest.
 - Eosin, ca. 5 Min.
- Aufsteigende Alkoholreihe:
 - 70 %iges Isopropanol, 5 Min.
 - 80 %iges Isopropanol, 5 Min.
 - 96 %iges Isopropanol, 5 Min.
 - 100 %iges Isopropanol, 5 Min.
 - Rotihistol, 5 Min.
- Eindecken der Präparate: - wasserfreies Eindeckmedium (Roti-Histokit, Roth, Karlsruhe)

Alle Arbeitsschritte der histologischen Färbung wurden bei RT durchgeführt.

Präparate, die im Folgenden für die computerunterstützte Erfassung der Zelldichte verwendet wurden (3.2.5.2), wurden nur mit Hämatoxylin angefärbt.

3.2.3.2 Masson-Goldner-Färbung (Trichrom-Färbung)

Protokoll:

- Entparaffinierung: siehe 3.2.3.1
- Färbung:
 - Hämatoxylin nach Weigert, ca. 5 Min.
 - Wässern in Leitungswasser, 5 Min.
 - Mallory Rot, 5 Min.
 - Kurzes Spülen in A. bidest.
 - Phosphormolybdänsäure, 15 Sek. - 30 Min.
 - Kurzes Spülen in A. bidest.
 - Lichtgrün, 7 Min.
 - Differenzieren in 1 %iger Essigsäure in 100 %igem Ethanol, wenige Sekunden / Eintauchen in A. bidest.

- Aufsteigende Alkohol-
reihe: siehe 3.2.3.1
- Eindecken der Präparate: siehe 3.2.3.1

Alle Arbeitsschritte der histologischen Färbung wurden bei RT durchgeführt.

3.2.4 Histomorphologische Klassifizierung humaner Bypass-Gefäße

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals der Entwurf eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für aortokoronare Bypass-Läsionen. Dieses wurde in Anlehnung an die histomorphologische Nomenklatur der AHA für primäratherosklerotisch veränderte Arterien entwickelt (STARY et al., 1994, 1995; STARY 2000 / 1.2). Die Definition der verschiedenen histomorphologischen Stadien der "Bypass graft disease" wurde in interdisziplinärer Kooperation mit Kollegen der Pathologie und Herzchirurgie vorgenommen.

Grundlage der histomorphologischen Charakterisierung waren mikroskopische Untersuchungen (Mikroskop: Axioplan, Zeiss, Oberkochen) der Bypass-Präparate nach Färbung des Gewebes (histologische Übersichtsfärbungen, 3.2.3) und immunhistochemischer Zelltypcharakterisierung (3.2.6). Parameter der Typisierung bildeten histologische Charakteristika (z.B. Orientierung von Gefäßwandzellen) sowie Merkmale der histomorphologischen Gefäßwandumgestaltung (z.B. Intimaveränderungen, Lipideinlagerungen).

Die Kontrollgruppe der nativen Venen wurden einer histomorphologischen Klassifizierung nach dem Schema von THIENE et al. (1990) unterzogen.

3.2.5 Morphometrische Untersuchungen

Morphometrische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Veränderung der dreischichtigen Gefäßanatomie im Verlauf der "Bypass graft disease" zu erfassen. Dabei erfolgte die Beurteilung der Parameter Querschnittsfläche und Zelldichte. Diese wurden jeweils für die (Neo)Intima, Media und Adventitia bestimmt.

Die Erfassung der gewählten Parameter wurde an Hämatoxylin-Eosin (Quantifizierung der Querschnittsfläche) bzw. Hämatoxylin (Quantifizierung der Zelldichte) gefärbten Präparaten

(3.2.3) computerunterstützt nach einem Protokoll von LEHR et al. (1996, 1997) vorgenommen. Die Präparate wurden mit einer Videokamera (Javelin JE3462 RGB Video Camera), die an ein Mikroskop (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) angeschlossen war, digital aufgenommen und auf einem Macintosh Computer (Macintosh Centris 650) abgespeichert. Die Ausmessungen wurden mit Hilfe des Programms Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountainview, CA, USA) durchgeführt.

Die Messdaten wurden für die einzelnen Bypass-Klassifikationstypen (3.2.4) ausgewertet.

3.2.5.1 Quantifizierung der Querschnittsfläche der Gefäßwand

Zur Bestimmung der Querschnittsflächen der (Neo)Intima, Media und Adventitia wurden diese Regionen mit Hilfe entsprechender "Softwaretools" markiert und ausgemessen (Abb. 3.1, obere Bildreihe). Das resultierende Flächenmaß wurde in der Einheit "Pixel" bestimmt und anschließend in mm^2 umgerechnet.

Als Maßzahl für die Quantifizierung der Neointimabildung wurde das Intima:Media-Verhältnis berechnet.

3.2.5.2 Quantifizierung der Zelldichte in der Querschnittsfläche der Gefäßwand

Für die Bestimmung der Zelldichte wurden exemplarisch vier Regionen einer Wandschicht ausgewählt. Mittels entsprechender "Softwaretools" wurden die Kerneigenschaften jener Kerne, die in die Auszählung mit eingehen sollten, definiert (Abb. 3.1, untere Bildreihe) und die Zellzahl innerhalb der gewählten Wandregionen bestimmt. Die ermittelten Zellzahlen wurden auf die Gesamtfläche der untersuchten Wandregion hochgerechnet ($\text{Zellzahl}/\text{mm}^2$).

Abb. 3.1 Darstellung der computerunterstützten Bestimmung der Querschnittsfläche und Zelldichte der Bypass-Gefäße.

Obere Bildreihe: Markierung der einzelnen Wandregionen zur Quantifizierung der Querschnittsfläche. Untere Bildreihe: Definition der Zellkerneigenschaft (Größe) zur Bestimmung der Zellzahl einer gewählten Wandregion.

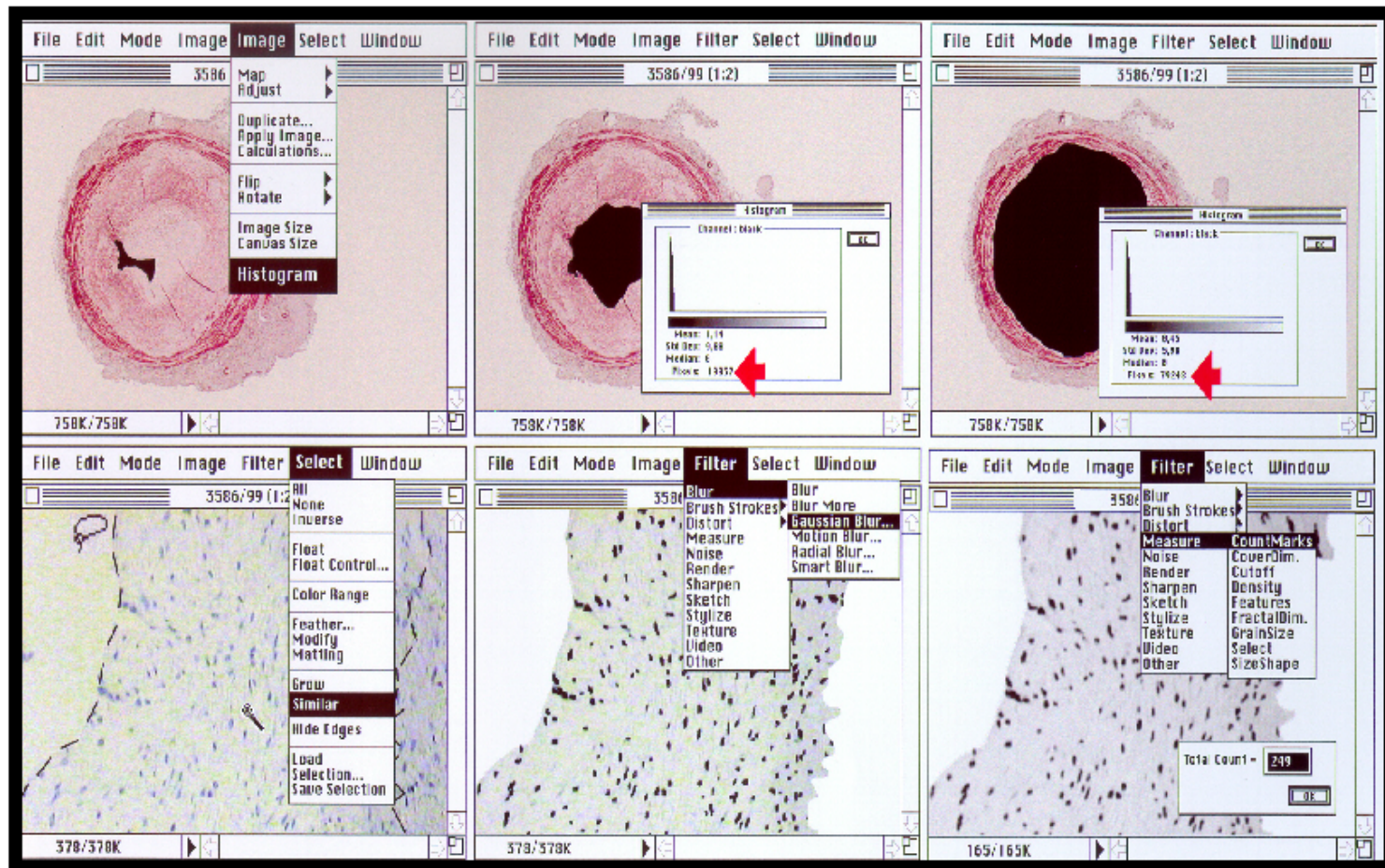


Abb. 3.1 Darstellung der computerunterstützten Bestimmung der Querschnittsfläche und Zelldichte der Bypass-Gefäße.

3.2.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Detektion der Proliferation sowie die Identifizierung der verschiedenen Gefäßwandzellen erfolgte mittels der indirekten Streptavidin-Biotin-Methode unter Verwendung des Super Sensitive Detection Systems (BioGenex, San Ramon, USA) und des LSAB 2-Kits (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Für die Markierung der verschiedenen Antigene wurden die aufgeführten Antikörper in Tab. 3.2 verwendet.

Primärantikörper (Klon)		Hersteller	Antikörperversdünung
Anti-Ki-67	Proliferations- marker	DAKO, Hamburg	1:25
Anti- α -Smooth Muscle Cell Actin, Alkaline Phosphatase Conjugate, Klon 1A4	SMC	Sigma, Deisenhofen	1:60
Anti-CD 45 Ro, Klon OPA4	T-Lymphozyten	DAKO, Hamburg	1:25
Anti-CD 68, Klon PG-M1	Makrophagen	DAKO, Hamburg	1:50
Anti-CD 31, Klon JC/70A	Endothelzellen	DAKO, Hamburg	Ready-to-use
	Zelltyp		

Tab. 3.2 Verwendete Antikörper.

3.2.6.1 Einfachfärbungen

Einfachfärbungen wurden zur Detektion der Zellproliferation sowie zur Charakterisierung der Verteilung der verschiedenen vaskulären Zelltypen in der Gefäß-Anatomie vorgenommen.

Protokoll:

- Entparaffinierung: siehe 3.2.3.1
- Blockierung endogener Peroxidasen: - 3 %iges Wasserstoffperoxid in A. bidest., 5 Min.
- Antigendemaskierung: Kochen der Präparate in der Mikrowelle (Panasonic) in 10 mM Citratpuffer:
 - 750 W, 5 Min.
 - 600 W, 15 Min.
 - 30 Min. abkühlen auf RT

- Blockierung unspezifischer
Hintergrundreaktivität: - 10 %iges Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS (1x), 15 Min.
- Antigen Detektion: - Primär-Antikörper (z.B. Ki-67 Antikörper), über Nacht, 4°C
- Biotin-Streptavidin-
Reaktion: - Biotin-Streptavidin-Reaktion (nach Angaben des Herstellers)
- Substrat-Chromogen-
Reaktion: - DAB (Roche, Mannheim)
- New Fuchsin Red (DAKO, Hamburg)
⇒ nach Angaben des Herstellers
- Gegenfärbung: - Hämatoxylin nach Mayer, 30 – 40 Sek.
- Differenzierung in 37 mM Ammoniakwasser
- Spülen in A. bidest.
- Eindecken der
Präparate: - wasserhaltiges Eindeckmedium (Glycerol Gelantin, Sigma, Deisenhofen)

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Präparate in 1x PBS gespült. Alle Arbeitsschritte der immunologischen Färbung wurden, wenn nicht anders aufgeführt, bei RT durchgeführt.

Zur Überprüfung der Spezifität der immunhistochemischen Färbung wurden bei jedem Versuch Verfahrenskontrollen mitgeführt. Bei der Detektion der Proliferationsaktivität wurde zusätzlich eine Gewebekontrolle (humanes Tonsillengewebe) eingesetzt.

Puffer:

Citratpuffer (10mM):
Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure in A. bidest.
Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat in A. bidest.
=> Gebrauchslösung:
9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B,
pH 6,0

PBS
(Phosphate Buffered Saline):
2,7 mM KCl
9,6 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

3.2.6.2 Identifizierung der proliferierenden Zellen (Doppelfärbung)

Bei Doppelfärbungen zur Identifizierung der proliferierenden Zellen wurde bis einschließlich der Chromogen-Substrat-Reaktion wie unter 3.2.6.1 verfahren. Ausgehend von diesem Punkt wurde die zweite Antigendetektion entsprechend dem Protokoll der Einfachfärbung begonnen (Inkubationszeit für die zelltypspezifischen Antikörper: 1 h, RT).

3.2.7 Bestimmung des Proliferationsindex in den humanen Bypass-Gefäßen

Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurde die Anzahl der proliferierenden Zellen nach der immunhistochemischen Detektion (3.2.6.1) manuell unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Dabei wurde eine differenzierte Auswertung für jede Wandregion der Gefäßanatomie vorgenommen ((Neo)Intima, Media, Adventitia).

Die Berechnung des Proliferationsindex wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$\text{Proliferationsindex} = \frac{\text{Proliferierende Zellen pro Wandregion}}{\text{Gesamtzellzahl dieser Region (3.2.5.2)}}$

3.2.8 Bestimmung des prozentualen Anteils eines Zelltyps an der Gesamtzellzahl der proliferierenden Zellen

Hierfür wurde in Gefäß-Präparaten nach der Doppelfärbung (Kombination: Ki-67 Detektion und Zelltypcharakterisierung / 3.2.6.2) manuell die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen des detektierten Zelltyps unter dem Mikroskop bestimmt. Wiederum wurde die Auswertung pro Wandregion der Gefäßanatomie vorgenommen ((Neo)Intima, Media, Adventitia). Der ermittelte Wert proliferierender Zellen eines Zelltyps wurde prozentual zum Verhältnis der Gesamtzahl der proliferierenden Zellen einer Wandregion ausgedrückt.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die Bewertung der Daten der morphologischen Untersuchungen (histomorphologische Klassifizierung (3.2.4), morphometrische Untersuchungen (3.2.5), Immunhistochemie (3.2.6)) erfolgte mittels einer deskriptiven Statistik der analysierten Parameter. Zur Charakterisierung der Häufigkeitsverteilung eines quantitativen Merkmals (z.B. Querschnittsfläche, Zelldichte) wurden statistische Maßzahlen (u.a. Median, arithmetischer Mittelwert, Standardfehler) berechnet und graphisch dargestellt (Box-Plot). Hierfür wurden die Computerprogrammen Excel und SPSS verwendet.

Zur Untersuchung statistischer Auffälligkeiten einzelner quantitativer Merkmale zwischen den verschiedenen Stichproben (z.B. Fallgruppe <-> Kontrollgruppe) wurde der Wilcoxon-Test berechnet. Als statistisch auffällig wurden Gruppenunterschiede mit einem p-Wert unter 0,05 eingestuft. Eine Korrektur der p-Werte wurde nicht vorgenommen.

3.3 Techniken der Zellkultur

3.3.1 Isolierung und Kultivierung humaner Muskelzellen der Aorta

Für die Isolierung humaner Muskelzellen zur Herstellung von Primärkulturen wurde die Explantattechnik gewählt (CHAMLEY-CAMAPBELL et al., 1979). Hiefür wurde aus frischen Aortasegmenten (n = 8, Spenderalter: 46 – 79), die bei chirurgischen Eingriffen (Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätskliniken Mainz) entnommen wurden, die Media freipräpariert. Gewebestücke der Media (Größe: 1 – 2 mm) wurden in Petrischalen (Durchmesser: 3,5 cm²) überführt, mit kommerziellem Spezialmedium bedeckt (Smooth Muscle Cell Medium, PromoCell, Heidelberg) und im Brutschrank (37 °C, 0,5 bar CO₂) inkubiert. Innerhalb von einer Woche migrierten die Muskelzellen aus den Gewebestücken heraus und proliferierten, sodass ein dichter Zellrasen entstand. Nach ca. vier Wochen konnten die Primärkulturen in Kulturflaschen (Normalmedium) zur weiteren Vermehrung umgesetzt werden. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte nach üblichen Protokollen für humane Muskelzellen (u.a. GIMBRONE und COTRAN, 1975; CHAMLEY-CAMAPBELL et al., 1979).

Neben den selbst isolierten Zellen wurde zusätzlich eine kommerzielle Zelllinie humaner Muskelzellen der Aorta (Spenderalter: 6 Jahre) für die geplanten Stimulationsversuche dieser

Studie (3.3.4) kultiviert. Die Haltung dieser Zellen erfolgte nach Empfehlungen des Anbieters (PromoCell, Heidelberg).

Die Qualität der kultivierten Muskelzellen wurde durch die Kriterien Erscheinungsbild der konfluenten Kulturen, Wachstumsverhalten, Zellmorphologie und Gehalt an glatten Muskelzellen definiert.

Das Erscheinungsbild konfluent kultivierter Muskelzellen, das charakteristischerweise ein "hill und valley" Muster zeigt (FALLIER-BACKER et al., 1990), wurde mikroskopisch beurteilt. Die Morphologie dieser Zellen war in der frühen Phase der Kultivierung, d.h. in den ersten Passagen, typischerweise spindelförmig.

Zur Beurteilung des Gehalts der glatten Muskelzellen in einer Kultur wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen (3.3.2) und das Wachstumsverhalten der Zellen an Hand von Wachstumskurven (3.3.3) überprüft.

Zellkulturmedium:

Normalmedium:

M 199-Medium (Gibco BRL, Eggenstein)
10% Fetal Calf Serum (FCS / Gibco BRL, Eggenstein)
100 U/ml Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)

3.3.2 Überprüfung der Reinheit primärkultivierter Muskelzellen

Zur Überprüfung der primärkultivierten Muskelzellen auf Kontaminationen durch vaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Tab. 3.3).

Für die Stimulationsversuche (3.3.4) wurden ausschließlich Kulturen mit einem Anteil von mindestens 80 % Muskelzellen eingesetzt.

Primärantikörper (Klon)	Charakterisierter Zelltyp	Hersteller	Antikörperverdünnung
a-Smooth Muscle Cell Actin, Klon HHF 35	SMC	Sigma, Deisenhofen	1:50
von Willebrand Faktor	Endothelzellen	Sigma, Deisenhofen	1:2000

Tab. 3.3 Verwendete Primärantikörper zu Zelltypcharakterisierung der kultivierten Zellen.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Zellen für mindestens 1 h mit eisgekühltem Methanol (0,02 % EGTA, -20°C) fixiert. Die Detektion mittels der aufgeführten Primärantikörper (Inkubationsdauer: 1 h, RT) erfolgte mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (Inkubationszeit: 1 h, RT / Sigma, Deisenhofen).

3.3.3 Überprüfung des Wachstumsverhaltens primärkultivierter Muskelzellen

Das Wachstumsverhalten der kultivierten Zellen wurde mit Hilfe von Wachstumskurven überprüft.

Protokoll:

Für die Versuchsdurchführung wurden die Muskelzellen subkonfluent ausgesät (Tag 0: $0,5 \times 10^5$ Zellen). Nach einer Anwuchsphase (24 h) erfolgte eine definierte "Hungerphase" der Zellen mit Minimalmedium (48 h), wodurch die Überführung der Myozyten aus dem logarithmischen Wachstum unter Normalkulturbedingungen in den "ruhenden Zellzykluszustand" (G_0) bedingt wurde. Ausgehend von dieser Situation wurde das Wachstumsverhalten der Zellen unter Herstellung von Normalkulturbedingungen bzw. stimulierenden Bedingungen (Wachstumsfaktorzugabe) über mehrere Tage beurteilt.

Zellkulturmedium:

Minimalmedium:

M 199-Medium (Gibco BRL, Eggenstein)
0,5 % Fetal Calf Serum (FCS / Gibco BRL, Eggenstein)
100 U/ml Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)

3.3.4 Stimulationsversuche

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsverhalten bestimmter Kandidatengene unter Einfluss der Mitogene PDGF- AA und -BB zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden Stimulationsversuche vorgenommen.

Neben den selbstkultivierten Zellen wurde in diese Versuchsreihe eine kommerzielle Zelllinie (3.3.1) mit einbezogen. Diese diente in der Expressionsstudie als Kontrollzelllinie für die selbstkultivierten Muskelzellen, denn bekanntermaßen beeinflussen die Präparationsmethode als auch die Kulturbedingungen das Verhalten primärkultivierter Zellen (CAMPBELL und CAMPBELL, 1993).

Protokoll:

Für die Stimulationsversuche wurden die kultivierten Muskelzellen (Passage: 3 – 4) vor Versuchsbeginn in die G_0 Phase überführt (Hungerphase: 48 h). Ausgehend von diesem Zustand

erfolgte eine definierte PDGF-Induktion (AA bzw. BB: 50 ng/ml) der Zellen für 30, 60, 90, 120 Minuten, 4 h, 6 h und 24 h.

Nach Versuchsabschluss wurden die Zellen direkt in dem Isolierungsreagenz (AGS, Heidelberg) für die Gesamt-RNA Gewinnung lysiert (3.4.4). Bis zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung wurden die Proben nach Angaben des Herstellers bei -20 °C gelagert.

3.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.4.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Die molekularbiologischen Standardmethoden dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach Protokollen von SAMBROOK et al. (1989) durchgeführt.

- Die **Restriktion** von DNA mit Hilfe von Endonukleasen sowie die **Ligation** von DNA-Molekülen wurden nach Empfehlungen der Enzym- bzw. Vektorhersteller durchgeführt.

Verwendete Vektoren:

- pGEM-T (Promega, Mannheim)
- pGEM-T Easy (Promega, Mannheim)

- Die **elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen** erfolgte auf 0,8 – 2,0 %igen horizontalen Agarosegelen bei einer Spannung von 3 - 5 V/cm. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer verwendet. Als Molekulargewichtsstandards wurden kommerzielle Produkte eingesetzt (DNA Molecular Weight Marker III und VI, Roche, Mannheim; 100 bp Ladder, Gibco BRL, Eggenstein).

Sowohl die DNA-Proben als auch die Standards wurden für die Elektrophorese mit DNA-Probenpuffer versetzt.

Die Anfärbung der DNA-Moleküle erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,5 µg/ml A. bidest., 10 Minuten) im Anschluss an die Elektrophorese.

Puffer:

TAE-Puffer:

40 mM Tris / Acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

DNA-Probenpuffer:

0,25 % Bromphenolblau
15 % [w/v] Saccharose in A. bidest.

- Die **Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten** nach elektrophoretischer Auftrennung **aus Agarosegelen** wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers vorgenommen.
- Die **elektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen** erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (Zusatz von 36,5 – 38 % Formaldehyd) in 1 %igen Agarosegelen in (1x) MOPS (3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz)-Puffer. Der Gellauf wurde bei einer Spannung von 5 V/cm durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde bei Gelen zur Überprüfung der RNA-Qualität (3.4.4) der 16 S / 23 S rRNA-Marker (Roche, Mannheim) und bei Gelen, die folgend zur Northern Blot Analyse (3.4.9) dienen sollten, der RNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche, Mannheim) eingesetzt. Sowohl die RNA-Proben als auch der Standard wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit RNA-Ladepuffer versetzt. Die Anfärbung der aufgetrennten RNA wurde, wie bei der DNA-Elektrophorese beschrieben, durch Inkubation in einem Ethidiumbromidbad nach der Elektrophorese vorgenommen.

Puffer:

10x MOPS-Puffer:
0,2 M MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
⇒ pH 7,0

RNA-Ladepuffer:
(stets frisch angesetzt)
250 µl Formamid
83 µl Formaldehyd
50 µl MOPS (10x)
0,01 % [w/v] Bromphenolblau

- Die **Herstellung nichtradioaktiv markierter RNA-Sonden mit Digoxigenin-UTP** durch *in vitro* Transkription, eine Technik die von KASSAVETIS et al. (1982) und DUNN und STUDIER (1983) beschrieben wurde, erfolgte in dieser Arbeit unter Einsatz eines kommerziellen Kits nach Empfehlungen des Herstellers (DIG RNA Labeling Kit, Roche, Mannheim).

3.4.2 Mikrobiologische Arbeitstechniken

3.4.2.1 Transformation

Das eingesetzte Protokoll für die Transformation entsprach den Angaben des Herstellers der verwendeten kompetenten Zellen (*Escherichia coli* XL1-Blue, Stratagene, Heidelberg).

Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Nährböden ausplattiert.

3.4.2.2 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA zur Charakterisierung von Bakterienklonen (5 ml Kulturen) bzw. zu Präparationszwecken (15 - 20 ml Kulturen) wurden Flüssigkulturen verwendet. Hierfür wurden Einzelkolonien von Agarplatten in das Flüssigmedium überimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte für 12 – 18 Stunden unter ständigem Schütteln (260 rpm / Schüttler: GFL 3005, Labotec, Wiesbaden).

Bakteriologische Nährmedien & Nährböden:

LB-Medium
(Luria Bertani-Medium):
(nach SAMBROOK et al., 1989)
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Casein (Trypton)
10 g/l NaCl
⇒ pH 7,0

LB-Nährboden:
15 g/l Agar in LB-Medium
150 µg/ml Ampicillin
0,02 % 2-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal)
1 mM β-Isopropylthiogalactosid (IPTG)

SB-Medium
(Super Broth-Medium):
(nach Stratagene, Heidelberg)
20 g/l Hefeextrakt
35 g/l Casein (Trypton)
5 g/l NaCl
⇒ pH 7,0

Die Nährmedien wurden nach der Herstellung bei 121 °C (Druck: 1,0 bar) für 30 Minuten autoklaviert. Die Zugabe notwendiger Substanzen sowie das Ausgießen des Agars in Petrischalen erfolgte nach Abkühlen der Medien auf 55 °C.

Zur Archivierung spezifischer Bakterienklone wurden **Glycerinkulturen** (maximale Endkonzentration: 17 % Glycerin in Nährmedium) bei –20 °C eingefroren.

3.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der optimierten alkalischen Lyse von Bakterienzellen (BIRNBOIM und DOLY, 1979) mit nachfolgender Präzipitation der bakteriellen Proteine unter Verwendung von kommerziellen Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

Zur Charakterisierung klonierter DNA-Fragmente wurden Mini-Plasmidpräparationen von 1,5 – 5 ml Suspensionskulturen durchgeführt (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden / DNA-Ausbeute: ~ 10 µg). Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen (DNA-Ausbeute bis zu 100 µg) wurde eine Midi-Plasmidpräparation vorgenommen (QIAprep Spin Midiprep Kit, Qiagen, Hilden).

3.4.3.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die **DNA-Aufreinigung** von organischen Verunreinigungen und Proteinen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion nach SAMBROOK et al. (1989) vorgenommen.

Zur **Konzentrierung** als auch Reinigung von Phenol- und Chloroformresten der DNA-Proben nach Phenol-Chloroform-Extraktionen fand die Methodik der DNA-Präzipitation in Gegenwart hoher Konzentrationen von monovalenten Kationen (0,1 – 0,5 M) Einsatz (EICKBUSH und MOUDRIANAKIS, 1978).

Hierfür wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und dem 2,5fachen Volumen eiskaltem absoluten Ethanol versetzt und über Nacht bei –20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 h, 16000 x g, 4 °C) wurde die DNA nochmals mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen. Die Trocknung des DNA-Pellets erfolgte bei 37 °C. Resuspendiert wurde die DNA in A. bidest.

3.4.4 Präparation von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA-Präparation aus Zellkulturzellen sowie Gewebeproben erfolgte nach der Methode von CHIRGWIN et al. (1979) unter Verwendung eines kommerziellen Isolierungsreagenz (RNA-CleanTM, AGS, Heidelberg). Die Vorgehensweise wurde entsprechend der Empfehlung des Anbieters vorgenommen.

Die Konzentration der präparierten RNA wurde mittels photometrischer Messung (3.4.5) bestimmt. Zur Qualitätsüberprüfung der RNA wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben durchgeführt (3.4.1).

Bei den Arbeiten mit RNA wurden Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz der Proben vor Degradation durch RNasen getroffen:

- Alle notwendigen Lösungen wurden vor Gebrauch mit 0,1 % Dimethylpyrocarbonat (DMPC), einem effizienten, unspezifischen RNase-Inhibitor, versetzt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 2 h erfolgte die Zerstörung des karzinogenen DMPCs durch Autoklavieren (1 h). Puffer und Lösungen, die Substanzen beinhalten, die durch den Autoklaviervorgang zerstört werden (z.B. Sodium Dodecylsulfat (SDS)) oder aber mit DMPC Reaktivität aufweisen (z.B. Tris-Hydroxyethylaminomethan (Tris)), wurden in bereits autoklaviertem DMPC-behandeltem A. bidest. angesetzt.
- Glaswaren wurden durch Sterilisation bei 180 °C für mindestens 5 h gebacken, um RNasen zu zerstören.
- Plastikwaren wurden vor Verwendung für RNA-Arbeiten zur Inhibition der RNase-Aktivität mit kommerziellen Lösungen (z.B. RNase Away, Gibco BRL, Eggenstein) behandelt oder in 0,5 %iger SDS-Lösung über Nacht eingelegt.

3.4.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ausbeute der DNA- bzw. RNA-Präparation wurde mit Hilfe der UV Spektrometrie bestimmt. Die Reinheit der DNA bzw. RNA wurde über den Quotienten 260 nm zu 280 nm bestimmt, der optimalerweise zwischen 1,8 bis 2,0 liegt (GeneQuant, Pharmacia, Freiburg).

dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 µg DNA/ml

RNA: 1 OD₂₆₀ = 40 µg RNA/ml

3.4.6 DNase Verdau der Gesamt-RNA

Die präparierte Gesamt-RNA wurde vor Einsatz in der RT-PCR (3.4.8) einem DNase Verdau unterzogen. Hierbei wurde 1 µg RNA mit 1 Unit DNase (DNase (RNase free), Roche, Mannheim) unter Zusatz von RNase Inhibitor (Roche, Mannheim) für 20 Minuten (37 °C) verdaut. Abschließend wurde die DNase bei 75 °C (10 Minuten) inaktiviert.

Puffer:

**10x Reaktionspuffer
(DNase Verdau):**
200 mM Tris/HCl, pH 8,3
500 mM KCl
10 mM MnCl₂
⇒ Verwendung: 1x konzentriert

3.4.7 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die PCR stellt ein *in vitro* Verfahren dar, bei dem selektiv eine definierte Zielsequenz aus einem komplexen Gemisch aus Nukleinsäuremolekülen angereichert wird (SAIKI et al., 1985).

Die Amplifikation spezifischer Zielsequenzen mittels PCR fand in dieser Arbeit zu präparativen Zwecken für nachfolgende Klonierungen und zur Überprüfung rekombinanter Vektor-Insert-Produkte Einsatz. Ferner diente die PCR zur Anreicherung spezifischer cDNA Fragmente (3.4.8).

Protokoll:

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das Temperaturprofil der PCR-Läufe sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 aufgeführt.

Eingesetzte Primer:

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

c-myc Primer (Amplifiziertes PCR-Fragment: 479 bp):
c-myc (Upstream Primer): 5' TACCCTCTCAACGACAGCAGCTCGCCCAACTCCT 3'
c-myc (Downstream Primer): 5' TCTTGACATTCTCCTCGGTGTCCGAGGACCT 3'
(Referenz: COLBY et al., 1983; Accession: J00120; Primer Design: Clontech, Heidelberg)

c-fos Primer (Amplifiziertes PCR-Fragment: 300 bp):
c-fos (Upstream Primer): 5' AGAATCCGAAGGGAAAGGAA 3'
c-fos (Downstream Primer): 5' GGTGAAGGCCTCCTCAGACT 3'
(Referenz: VAN STRAATEN et al., 1983; Accession: V01512)

GAPDH Primer (Amplifiziertes PCR-Fragment: 397 bp):
GAPDH (Upstream Primer): 5' GTCCATGCCATCACTGCCACCCAGA 3'
GAPDH (Downstream Primer): 5' GTCTGACAAAGTGGTCGTGTGGGC 3'
(Referenz: ERCOLANI et al., 1988; Accession: J04038)

Komponenten	Endkonzentration
=> genomische DNA	100 – 500 ng
=> cDNA	2 µl (1:2 vorverdünnt mit A. bidest.)
Primer	jeweils 10 – 20 pmol
PCR-Puffer (10x)	1x
DMSO	5 %ig*
dNTP-Mix	200 µM pro dNTP
Taq-Polymerase	2,5 – 5 U
A. bidest.	auffüllen auf Endvolumen
Endvolumen	50 µl

Tab. 3.4 Zusammensetzung der durchgeführten PCR-Ansätze.

Die Produkte Taq-Polymerase, PCR-Puffer und dNTP-Mix wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen.

* Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde nach Bedarf bei PCR Ansätzen zugegeben, bei denen unspezifische Zusatzprodukte neben dem Zielprodukt hochamplifiziert wurden.

Bei jeder PCR wurde eine Negativekontrolle (ohne DNA bzw. cDNA Matrize) durchgeführt.

PCR-Programm		
PCR-Phase	Zeitdauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	4 Minuten	94 °C
Denaturierung	30 Sekunden	94 °C
Annealing	30 Sekunden	58 – 62 °C
Elongation	1 Minute	72 °C
	=> Zyklenzahl: 23 - 29	
Abschließende Elongation	10 Minuten	72 °C
Abkühlen	unbegrenzt	4 °C

Tab. 3.5 PCR-Programm.

Die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Zielfragmente wurden im Rahmen der angegebenen Grenzbereiche jeweils optimal eingestellt (PCR-Gerät: Primus 96 Plus, MWG-Biotech, Ebersberg).

3.4.8 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Die RT-PCR stellt eine Technik dar, die zur Detektion und Analyse von spezifischen mRNA Transkripten dient. Bei dieser Methode wird die reverse Transkription, bei der die Herstellung

komplementärer DNA (cDNA) aus der mRNA erfolgt, kombiniert mit der PCR durchgeführt (POWELL et al., 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RT-PCR Methode zur Analyse des Expressionsverhaltens bestimmter Kandidatengene in kultivierten humanen Muskelzellen nach mitogener Stimulation (3.3.4) eingesetzt

Protokoll:

Für die cDNA-Synthese wurde das Enzym AMV (Avian myeloblastosis virus) Reverse Transkriptase (Roche, Mannheim) verwendet. Als Primer wurde der Oligo-p(dT)₁₅ Primer (Roche, Mannheim) eingesetzt. Bei jeder Synthese wurde eine Negativkontrolle (ohne RNA Zusatz) mitgeführt. Die Erststrangherstellung erfolgte nach Angaben der Firma Roche (PCR Applications Manual, 2nd edition, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

Die anschließende Amplifikation der spezifischen cDNA-Fragmente mittels der PCR-Technik erfolgte nach den Angaben unter 3.4.7. Hierbei wurde für jede Probe in jedem PCR-Lauf neben der Amplifikation der Zielfragmente eine Positivkontrolle mit GAPDH-Primern extern mitgeführt. Diese Kontrollen gingen in die Auswertung der PCR-Daten mit ein (3.10).

3.4.9 Northern Blot Technik

Das Northern Blot Verfahren erlaubt den spezifischen Nachweis von RNA-Sequenzen, die nach elektrophoretischer Gelaufentrennung auf eine Nylonmembran transferiert werden (ALWINE et al., 1977). In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der Zielsequenzen durch den Einsatz von nichtradioaktiv markierten RNA-Sonden (3.4.1).

Die Northern Blot Analyse wurde in dieser Arbeit zur Überprüfung der erzielten RT-PCR Daten (3.4.8) stichprobenweise durchgeführt.

Protokoll:

Die Übertragung der RNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran (positiv geladene Nylonmembran, Roche, Mannheim) erfolgte über Nacht mit der Kapillarblot-Technik (SAMBROOK et al., 1989). Die Transfereffizienz wurde durch Anfärben der Membran, nachdem die Nukleinsäuren auf dieser immobilisiert wurden (Crosslinker, Stratagene), mit Methylenblau überprüft. Sichtbar wurden dadurch die 28S und 18S rRNA Banden. Diese wurden markiert und

dienten zum einen als Längenstandards (28 S: 5,1 kb, 18 S: 1,9 kb) und zum anderen zum Nachweis von Kreuzreaktionen eingesetzter Sonden mit der ribosomalen RNA bei der folgenden Hybridisierung.

Die beladenen Membranen wurden zunächst mit spezifischen Sonden der untersuchten Kandidatengene hybridisiert. Nach abgeschlossener Detektion der resultierenden Hybridisierungssignale wurden die Membranen zur Kontrolle mit GAPDH rehybridisiert. Von einem Stripping der Membranen zwischen den beiden Versuchen wurde abgesehen, da auf Grund der mRNA Größen der untersuchten Targets (c-fos: 2,2 kb, c-myc: 2,0 – 2,4 kb) und der des Haushaltgens (GAPDH: 1,27 kb) keine Signalüberlagerung resultierte.

Die Bedingungen für die Hybridisierung (Hybridisierungsöfen, HYBAID, Teddington, Middlesex) und Detektion (Chemilumineszenz-Technik: DIG Luminescent Detection Kit, Roche, Mannheim) der DIG-markierten RNA-Sonden wurden nach Angaben der Firma Roche (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) gewählt.

Puffer & Lösungen:

Methylenblau-Färbelösung:

0,5 M Natriumacetat, pH 5,3
0,04 % Methylenblau (1 %ige Stammlösung)
⇒ Färbung: 5 – 10 Minuten

⇒ Entfärbung des überschüssigen Farbstoffs: 5 – 10 Minuten 25 %iges Ethanol

**20x SSC
(Natriumchlorid-Natriumcitrat):**
3 mM NaCl
300 mM Natrium-Citrat
⇒ pH 7,0

Maleinsäurepuffer:
100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
⇒ pH 7,5

Blocking-Puffer:
1% Blockingreagenz (Roche, Mannheim)
in Maleinsäurepuffer

Detektionspuffer:
100 mM Tris/HCl, pH 9,5
100 mM NaCl

3.4.10 Computergesteuerte Auswertung der RT-PCR- und Northern Blot Ergebnisse

Die semiquantitative Auswertung der RT-PCRs (3.4.8) und Northern Blots (3.4.9) erfolgte computerunterstützt unter Verwendung des Kodak Digital Science Elektrophoresis Documentation Systems (EDAS) 120 (Gibco BRL, Deisenhofen).

Agarosegele der PCR Amplifikate wurden über die Kamera des EDAS 120 Systems, die an einem Personal Computer angeschlossen war, digital erfasst und abgespeichert. Röntgenfilme der Northern Blot Untersuchungen wurden zur densitometrischen Ausmessung eingescannt.

Mit Hilfe der Kodak Digital Science Software wurde die Quantifizierung der Banden der RT-PCR- und Northern Blot Analysen vorgenommen. Die ermittelten relativen Signalintensitäten der untersuchten Kandidatengene (c-fos, c-myc) wurden mit der entsprechenden Signalintensität des Haushaltsgens GAPDH ins Verhältnis gesetzt (Kandidatengen : GAPDH).

Die Ergebnisse der RT-PCR Analysen wurden in Form von Liniendiagrammen dokumentiert, wobei jeweils die Daten eines Versuchskomplexes zusammengefasst wurden (3.3.4).

4. Ergebnisse

4.1 Histomorphologische Untersuchungen humaner Bypass-Gefäße

4.1.1 Etablierung eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für aortokoronare Bypass-Läsionen

In Anlehnung an die histomorphologische Klassifizierung atherosklerotischer Arterienläsionen durch die American Heart Association (STARY et al., 1994, 1995; STARY, 2000 / 1.2.1.2.1, Abb. 1.2) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Typisierungsschema für humane Bypass-Läsionen etabliert.

Die Definition der Bypass-Läsionen erfolgte auf Grund morphologischer Parameter (3.2.4), die in histologischen Übersichtsfärbungen (3.2.3) sowie immunhistochemischen Zelltypisierungsnachweisen (3.2.6) mikroskopisch beurteilt wurden.

Ziel war die Erstellung eines einfachen Einteilungsschemas, das eine präzise Charakterisierung der verschiedenen Läsionsstadien der "Bypass graft disease" erlaubt und als Bezugssystem für die Auswertung und Diskussion histomorphologischer Studien herangezogen werden kann.

Entsprechend dieser Anforderung wurden drei Entwicklungsstufen typisiert (Tab. 4.1):

- ◆ primäre proliferative Intimaverdickung (**Typ I**)
- ◆ fibrosierende Intimaverdickung (**Typ II**)
- ◆ "komplexe Bypass-Läsion" (**Typ III**)

Zusätzlich erfolgte eine Subtypisierung der verschiedenen Läsionsklassen. Diese differenzierte bei den Typ I und II Läsionen zwischen beginnender (A) und ausgeprägter (B) Intimaverdickung bzw. "fibröser Kappe". Bei den "komplexen Typ III Läsionen" wurden auf Grund primäratherosklerotischer Merkmale drei Subtypen (A, B, C) unterschieden.

Läsions-typ	Subtypen	Läsionsart (Morphologische Gefäßwandveränderungen)	Histologische Charakteristika
I	A / B	Proliferative Intimaläsion (Neointimahyperplasie) (adaptiv ⇔ progressiv)	Hyperzelluläre Intimaverdickung: vorwiegend glatte Muskelzellen, geringer Anteil extrazellulärer Matrixsubstanzen; luminale Endothelzellschicht größtenteils intakt; vereinzelt subendotheliale Infiltrationen von Monozyten / Makrophagen und T-Lymphozyten
II	A / B	Fibrosierende Intimaläsion Auflagerung einer lumenseitigen, kollagenfaserreichen " fibrösen Kappe " auf die Neointima (prominent ⇔ progressiv)	Hypo Zelluläre Intimaverdickung: hauptsächlich extrazelluläre Matrixsubstanzen, vereinzelt glatte Muskelzellen; luminale Endothelzellschicht größtenteils intakt; verstärkte subendotheliale Infiltrationen von Monozyten / Makrophagen und T-Lymphozyten
III	A B C	"Komplexe Bypass-Läsion" <u>Merkmale des atherosklerotischen "Gefäßwand-Remodelings":</u> ♦ Einlagerung von intra- und extrazellulärem Lipid in die Neointima ♦ Einschmelzung des intimalen extrazellulären Lipids zu einem Lipidkern, lumenseitige Auflagerung einer kollagenfaserreichen "fibrösen Kappe" (Fibroatherom) ♦ Auftreten verschiedener Läsionskomplikationen (Plaquerosion, -ruptur)	Akkumulation von Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten und Schaumzellen Akkumulation von Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten und Schaumzellen in die atheromatösen Plaqueschulterregionen; Lipidkern zusammengesetzt aus Lipidtröpfchen und Cholesterinkristallen Einblutungen in den Lipidkern

Tab. 4.1 Histomorphologische Definition der verschiedenen Typen von Bypass-Läsionen.

Der blaue Pfeil beschreibt das fortschreitende "Gefäßwand-Remodeling" im Verlauf der "Bypass graft disease". Der graue Pfeil kennzeichnet die Zunahme der sklerotischen Gefäßwandumgestaltung (Neointime, Media, Adventitia) im Zuge der Progression der Typ III Läsionen.

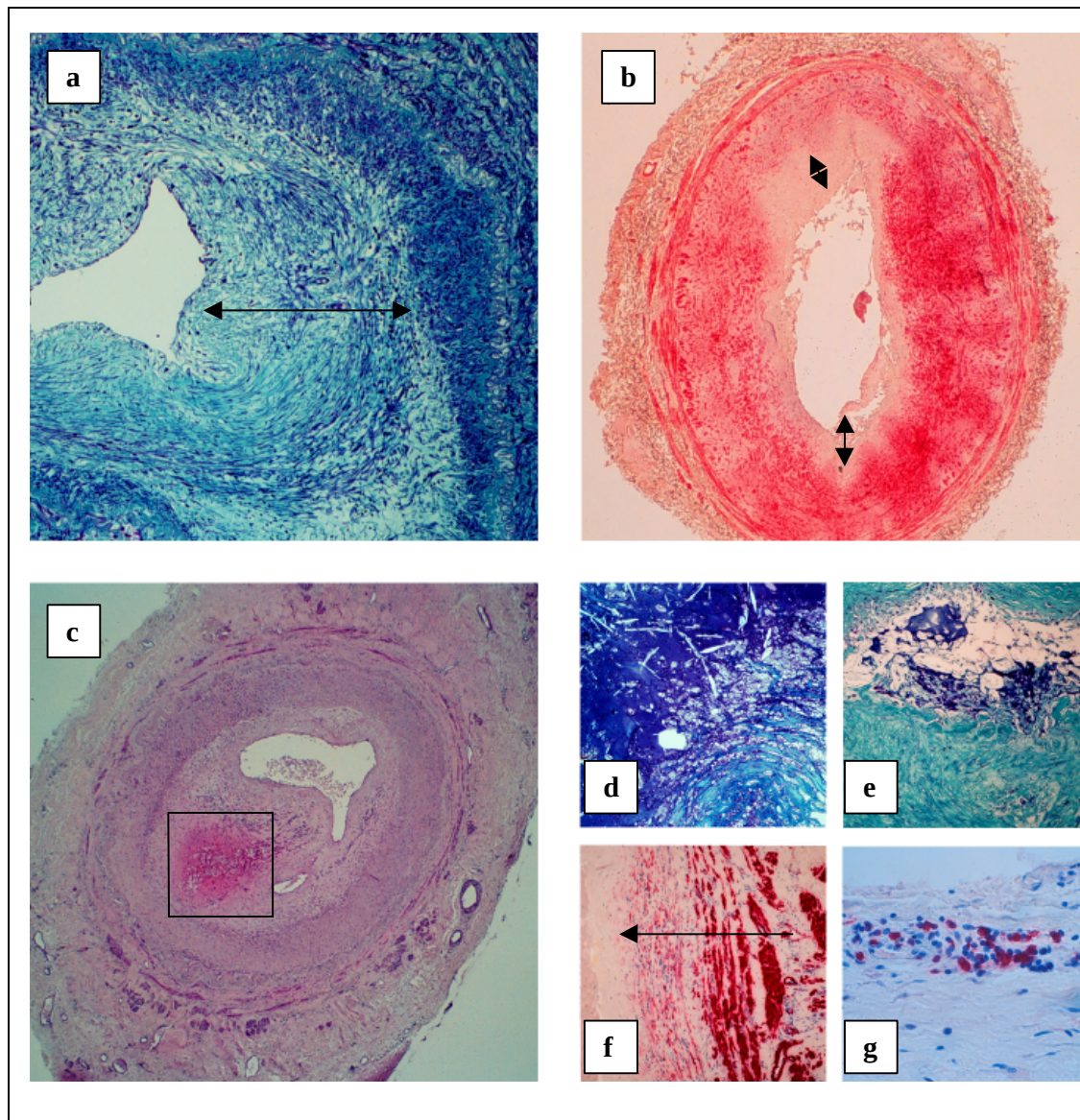


Abb. 4.1 Darstellung der histomorphologischen Anatomie der verschiedenen Typen der Bypass-Läsionen.

(a) Typ I Läsion (Subtyp B): Hyperzelluläre Intimaverdickung (Pfeilmarkierung) bestehend aus glatten Muskelzellen (violett-rot) sowie extrazellulären Matrixsubstanzen (grün).

(b) Typ II Läsion (Subtyp B): Hyperzelluläre Intimaverdickung charakterisiert durch glatte Muskelzellen (rotes Präzipitat) mit aufgelagerter azellulärer "fibröse Kappe" (Pfeilmarkierung) aus extrazellulären Matrixkomponenten.

(c) Typ III Läsion: Innerhalb der markierten Neointimaregion (Kasten) der Übersichtsaufnahme sind die atherosklerotischen Merkmale A, B und C "komplexer Läsionen" ausgeprägt (Tab. 4.1), die zusätzlich in Ausschnittsvergrößerungen gezeigt werden: (d) Lipidkern mit Lipidtröpfchen und Cholesterinkristallen, (e) Einlagerung extrazellulären Lipids umgeben von nekrotischem Gewebe, (g) Akkumulation von Entzündungszellen. (f) fortgeschrittene Sklerose der zirkulären Media (Pfeilkopf zeigt in Richtung Gefäßlumen, ausgehend von der Adventitia).

Legende zur Gewebefärbung:

(a), (d), (e): Masson-Goldner-Färbung; (b), (f): Immunhistochemische Färbung gegen glattmuskuläres α -Aktin; (c): Hämatoxylin-Eosin-Färbung; (g): Immunhistochemische Makrophagencharakterisierung.

4.1.1.1 Mikroskopische Anatomie der verschiedenen Typen von Bypass-Läsionen

Die frühen pathomorphologischen Stadien der "Bypass graft disease" (**Typ I** und **II** Läsionen – Subtypen A und B) konnten histologisch durch eine Intimaverdickung (Neointima) charakterisiert werden (Tab. 4.1). Immunhistochemische Untersuchungen detektierten glatte Muskelzellen als das zelluläre Korrelat dieser Region (Abb. 4.1 a, b). Während in den proliferativen, hyperzellulären Typ I Läsionen die Neointima nur einen geringen Anteil extrazellulärer Matrixbestandteile aufwies, bildeten Matrixsubstanzen den Hauptbestandteil der "fibrösen Kappen" der fibrosierenden Typ II Läsionen.

Die luminale Endothelauskleidung dieser Läsionen war größtenteils intakt. Auffällig war der Anstieg der infiltrierten Entzündungszellen in die subendotheliale Region (Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten) ausgehend von den Typ I zu den Typ II Läsionen.

Die "komplexen Läsionen" (**Typ III: A - C**) der "Bypass graft disease" zeigten histomorphologische Charakteristika der primären Atherogenese (Tab. 4.1 / Abb. 4.1 c - g). Primär war eine intimale extra- und intrazelluläre Lipidakkumulation (Typ III A) zu beobachten, die fortschreitend zu einem Lipidkern (Atherom) verschmolz (Typ III B). Die Lipidkerne bestanden aus Lipidtröpfchen ("weiche" Cholesterinester) und Cholesterinkristallen ("harte" Cholesterinester) sowie Zelltrümmern und waren mit mehr oder weniger gut ausgeprägten "fibrösen Kappen" vom Restlumen abgegrenzt (Fibroatherom). Typ III C Läsionen waren durch Einblutungen in den Lipidkern gekennzeichnet, deren Ursprung (Plaquerosion, -ruptur) nur teilweise erkenntlich war.

Als Ausdruck der Progression des "Gefäß-Remodelings" der "komplexen Läsionen" war eine zunehmende Sklerose der Gefäßwand (Neointima, Media, Adventitia) zu beobachten, gekennzeichnet durch die Abnahme des Anteils an glatten Muskelzellen (Abb. 4.1 f).

Endothelzellen waren in den Typ III Läsionen auf der Lumenseite der Bypässe nur vereinzelt vorhanden, jedoch stieg ihre Gesamtzahl im Gefäßquerschnitt auf Grund einer ansteigenden Vaskularisierung der Neointima, Media und Adventitia an.

Der Anteil an Entzündungszellen nahm in den "komplexen Läsionen" deutlich in den intimalen, medialen sowie adventitialen Regionen zu. Ihre Topographie orientierte sich im Gefäßquerschnitt an Versorgungsgefäßen, Lipidakkumulationen (Abb. 4.1 g) bzw. Plaqueschultern.

4.1.1.2 Ergebnisse der histomorphologischen Klassifizierung der untersuchten Bypass-Gefäße

4.1.1.2.1 Ergebnisse der histomorphologischen Klassifizierung der Fallgruppe der Bypass-Läsionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Fallgruppe von 30 aortokoronaren Bypass-Läsionen (3.2.1) histomorphologisch charakterisiert (3.2.4). Nach dem beschriebenen Klassifizierungsschema (Tab. 4.1) unterteilte sich die Untersuchungsgruppe in zehn Typ I, sechs Typ II und vierzehn Typ III Läsionen (Anhang: Tab. 4.2).

4.1.1.2.2 Ergebnisse der histomorphologischen Klassifizierung der nativen Bypass-Gefäße der Kontrollgruppe

Segmente nativer, nicht-implantierter Venen (n = 5 / 3.2.1) wurden als Kontrollgruppe in die histomorphologischen Untersuchungen (morphometrische Untersuchungen (4.1.3), Immunhistochemie (4.1.4)) mit einbezogen, um die pathomorphologischen Veränderungen der Fallgruppe der Bypass-Läsionen im Vergleich zu dem nativen Zustand von venösen Bypass-Gefäßen darzustellen.

Die Morphologie der Kontrollvenen wurde nach dem histologischen Klassifizierungsschema von THIENE et al. (1980 / 3.2.4) charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dokumentieren, dass bereits das native Venenmaterial vor dessen Implantation als aortokoronare Bypässe pathomorphologische Veränderungen aufwies (Abb. 4.2 / Anhang: Tab. 4.3). Dabei handelte es sich um sklerotische und / oder fibrotische Veränderungen der Media bzw. Intima der nativen Venen.

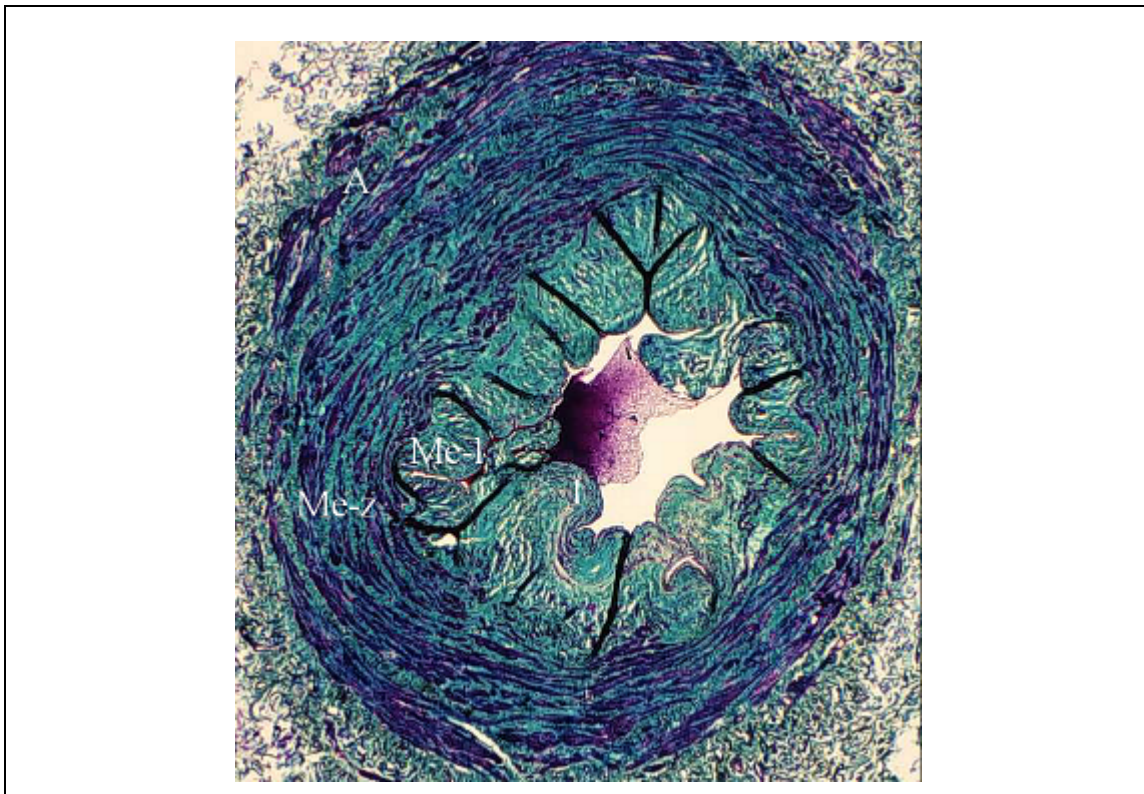


Abb. 4.2 Darstellung der mikroskopischen Anatomie einer nativen nicht-implantierten Vene der Kontrollgruppe. Dokumentiert ist die dreischichtige venöse Gefäßwandanatomie ohne histomorphologische Veränderungen: I: Intima, Me: Media (l: longitudinale Mediaschicht, z: zirkuläre Mediaschicht), A: Adventitia (Klassifizierung nach THIENE et al., 1980; Typ 0).

4.1.2 Korrelation der histomorphologischen Klassifizierung der untersuchten Bypass-Läsionen (Typ I – III) mit der Implantationsdauer

Die statistische Analyse der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Läsionstypen (Typ I, II, III) in Bezug auf ihre Implantationsdauer zeigte, dass Bypässe mit längerer Implantationsdauer progressivere histomorphologische Gefäßwandveränderungen aufwiesen (Abb. 4.3 / Anhang: Tab. 4.4).

Dementsprechend benötigten Typ III Läsionen eine deutlich längere Zeitspanne zur Ausprägung ihrer charakteristischen histomorphologischen Merkmale als Typ I und II Läsionen, wie die graphische Box-Plot Darstellung zeigt.

Ein statistisch auffälliger Gruppenunterschied des Merkmals Implantationsdauer (p -Wert $< 0,05$) bezogen auf die verschiedenen Läsionstypen (I – III) konnte durch die Berechnung des Wilcoxon-Tests nicht belegt werden. Lediglich der Vergleich der Typ I und III Läsionen erbrachte einen p -Wert ($p = 0,056$), der annähernd eine statistische Auffälligkeit zeigte (Abb. 4.3).

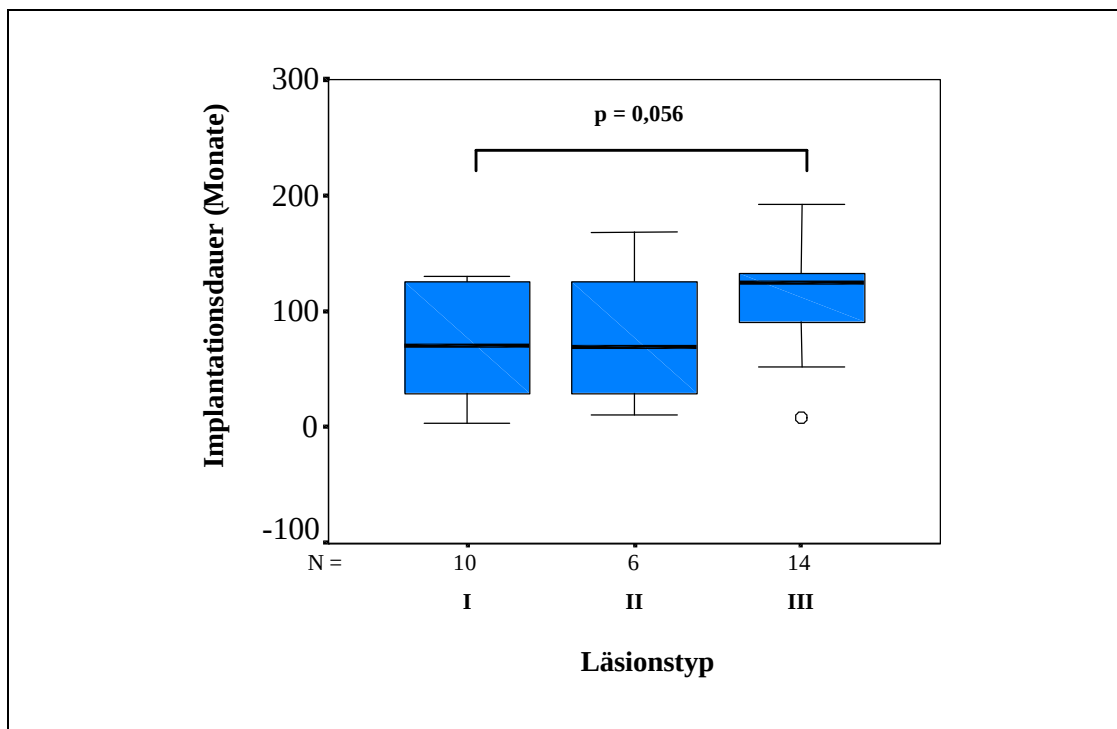


Abb. 4.3 Graphische Box-Plot Darstellung der verschiedenen Läsionstypen (I – III) der untersuchten Fallgruppe (n = 30) in Abhängigkeit der Implantationsdauer (Monate) als aortokoronare Bypässe.
(0) Ausreißer des untersuchten Datensatzes, (N) Fallzahl der Untersuchungsgruppe.

4.1.3 Morphometrische Untersuchungen

Um Informationen über die pathomorphologischen Veränderungen der Gefäßarchitektur im Verlauf der "Bypass graft disease" zu erhalten, wurden computergesteuerte morphometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei erfolgte die Quantifizierung der Parameter Querschnittsfläche (3.2.5.1) sowie Zelldichte (3.2.5.2) der Gefäßwand.

Die computergesteuerten Ausmessungen und Auszählungen wurden vergleichend an histologischen Präparaten der Bypass-Läsionen sowie der Kontrollvenen nach Hämatoxylin-Eosin- bzw. Hämatoxylin-Färbung vorgenommen (3.2.5).

4.1.3.1 Quantifizierung der Querschnittsfläche der Gefäßwand

Die explantierten Bypass-Gefäße und die nativen Venen zeigten deutliche Unterschiede in der intimalen und medialen Querschnittsfläche (Tab. 4.6 / Anhang: Tab. 4.4).

Während die Intimafläche bei erkrankten Bypass-Gefäßen im Vergleich zu nativen Venen zunahm, zeigte die Media umgekehrt eine Flächenabnahme.

Innerhalb der Fallgruppe der Bypass-Läsionen kam es von Stadium I bis III parallel mit der pathomorphologischen Progression zu einer Zunahme sowohl der neointimalen als auch der medialen Querschnittsfläche.

Gefäßwandregion	Native Venen (n = 5)	Bypass-Läsionen		
		Typ I (n = 10)	Typ II (n = 6)	Typ III (n = 14)
Gesamtfläche der (Neo) Intima (mm ²)	0,88	1,61	2,60	3,96
Gesamtfläche der Media (mm ²)	3,07	1,51	2,04	2,26
Intima:Media-Relation	0,41	1,38	1,24	2,93

Tab. 4.6 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Flächenquantifizierung (Anhang: Tab. 4.4).
Aufgeführt sind jeweils die Mediane der Quantifizierungsuntersuchungen.

Die Berechnung des Intima:Media-Verhältnisses, einer Maßzahl für die Quantifizierung der Neointimabildung, unterstützte die Aussage der Basisdaten der Flächenquantifizierung (Abb. 4.4). Die stärkste Veränderung der Intima:Media-Relation trat bei dem Vergleich der Typ III Läsionen (Intima:Media-Relation: 2,93) mit den nativen Venen (Intima:Media-Relation: 0,41) hervor, der

sich in einem 7fach höheren Intima:Media-Quotienten der Typ III Läsionen ausdrückte. Die Intima:Media-Verhältnisse der Typ I und II Läsionen lagen um das 3fache über dem Quotienten der nativen Venen.

Die deutliche Verschiebung der Intima-Media-Relation ausgehend von den nativen Venen zu den Typ III Läsionen der "Bypass graft disease" ($p = 0,001$) sowie innerhalb der Fallgruppe der Bypass-Läsionen (I zu III: $p = 0,012$; II zu III: $P = 0,039$) konnte durch statistisch auffällige p-Werte ($p < 0,05$) bestätigt werden.

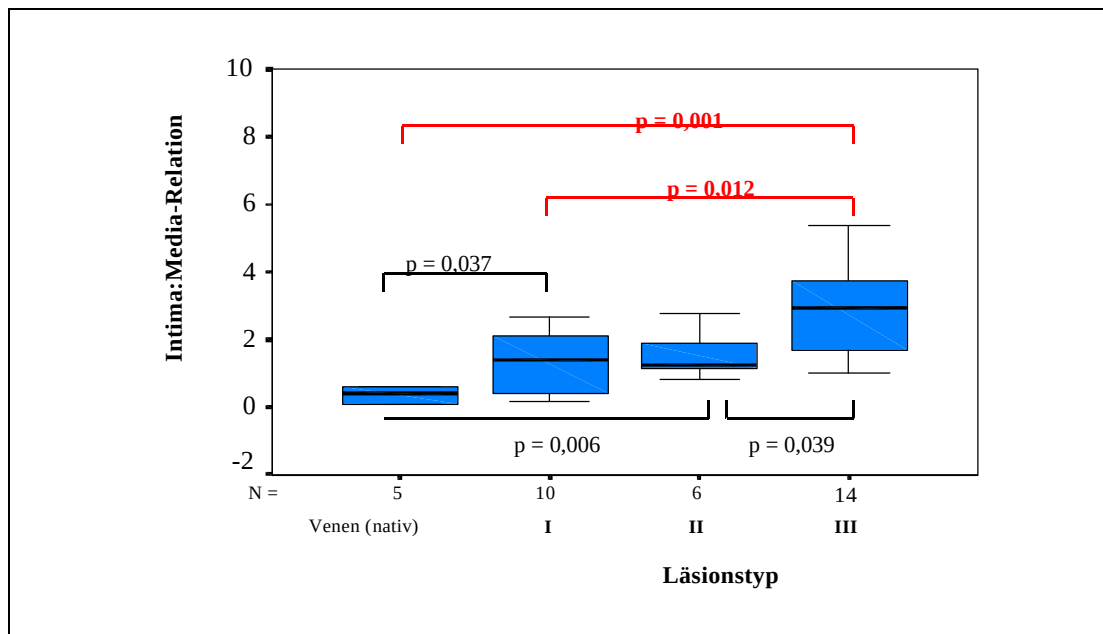


Abb. 4.4 Graphische Box-Plot Darstellung der Intima:Media-Relation der untersuchten Kontrollgruppe (n = 5) und Fallgruppe der Bypass-Läsionen (n = 30).
(N) Fallzahlen der Untersuchungsgruppe.

4.1.3.2 Quantifizierung der Zelldichte in der Querschnittsfläche der Gefäßwand

Die Quantifizierung der Zelldichte in der Gefäßwand zeigte deutliche Unterschiede bei der Gegenüberstellung der Fallgruppe der Bypass-Läsionen mit den nativen Venen der Kontrollgruppe (Tab. 4.7, Abb. 4.5 / Anhang: Tab. 4.5).

Generell wiesen die Bypass-Läsionen eine deutlich höhere Zelldichte in allen Gefäßbereichen auf. Innerhalb der Fallgruppe der Bypass-Läsionen nahm die Zelldichte in einzelnen Wandregionen (Neointima, Media, Adventitia) von Typ I zu III ab. Davon abweichend präsentierte die Neointima die höchste Zelldichte in den Typ II Läsionen.

Bei allen untersuchten Gefäßpräparaten wies die Media die höchste Zelldichte auf.

Gefäßwandregion	Native Venen (n = 5)	Bypass-Läsionen		
		Typ I Läsionen (n = 10)	Typ II Läsionen (n = 6)	Typ III Läsionen (n = 14)
Zelldichte der (Neo) Intima (x 10 ³ Zellen/mm ²)	1,04	2,50	2,72	2,08
Zelldichte der Media (x 10 ³ Zellen/mm ²)	1,33	4,07	3,30	3,04
Zelldichte der Adventitia (x 10 ³ Zellen/mm ²)	0,73	2,63	2,59	2,38

Tab. 4.7 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der Quantifizierung der Zelldichte (Anhang: Tab. 4.5).
Aufgeführt sind jeweils die Mediane der Quantifizierungsuntersuchungen.

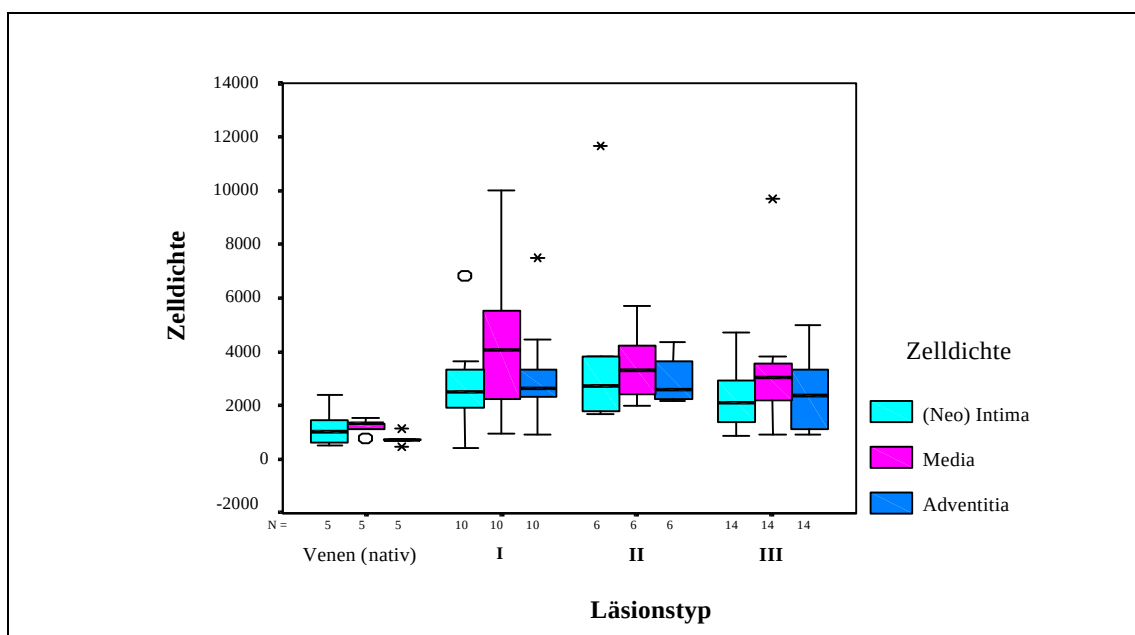


Abb. 4.5 Graphische Box-Plot Darstellung der Zelldichte (mm²) in den verschiedenen Gefäßwandanteilen der Kontrollgruppe (n = 5) und der Fallgruppe der Bypass-Gefäße (n = 30).
(0 bzw. *) Ausreißer des untersuchten Datensatzes, (N) Fallzahl der Untersuchungsgruppe.

4.1.4 Immunhistochemie

4.1.4.1 Immunhistochemischer Nachweis der Proliferationsaktivität in Bypass-Gefäßen

Das Ausmaß der zellulären Proliferationsaktivität in den explantierten Bypass-Gefäßen im Vergleich zu den nativen Venen wurde an Hand des immunhistochemischen Nachweises des nukleären Antigens Ki-67 bestimmt, das als ein Markerprotein des aktiven Stadiums des Zellzyklus gilt (1.3.1, 3.2.6).

I. Detektion der zellulären Proliferationsaktivität

Die Bypass-Läsionen zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe der nativen Venen eine deutlich stärkere Proliferationsaktivität (Tab. 4.8 / Anhang: Tab. 4.9).

Bei der manuellen mikroskopischen Auszählung der proliferierenden Zellen in den nativen Venen waren maximal zwei positive Zellen im gesamten Gefäßquerschnitt zu beobachten. Hingegen erbrachte die Begutachtung der explantierten Bypass-Läsionen eine Spannbreite von 0 bis 170 aktiver Zellen pro Präparat. Die Berechnung der Proliferationsindizes (3.2.7) bestätigte diesen Unterschied bezüglich des Proliferationsverhaltens der Untersuchungsgruppen der Bypass-Läsionen und der nativen Venen.

Innerhalb der dreischichtigen Gefäßwandarchitektur zeigte die Media, sowohl bei den nativen Venen als auch bei der Gesamtgruppe der Bypass-Läsionen, die stärkste Proliferationsaktivität. Während bei den nativen Venen ausschließlich eine Proliferationsaktivität in der Media zu detektieren war, präsentierte die Gruppe der Bypass-Läsionen aktive Zellen in allen Wandregionen.

Ein statistisch auffälliger Unterschied des Merkmals Proliferationsaktivität (p -Wert $< 0,05$) zwischen der Stichprobe der Bypässe und der nativen Venen, bezogen auf die einzelnen Wandregionen, konnte jedoch nur für die (Neo)Intima ($p^{\text{NI}} = 0,02$) ermittelt werden ($p^{\text{ME}} = 0,29$, $p^{\text{AD}} = 0,12$).

Gewebeart	PI - NI	PI - ME	PI - AD
Native Venen (n = 5)	0.0000	0.0325	0.0000
Bypass-Läsionen (n = 30)	0.0280	0.0435	0.0300

Tab.4.8 Zusammenfassung der Mediane der Proliferationsindizes (Anhang: 4.9).

PI: Proliferationsindex, NI: Neointima, ME: Media, AD: Adventitia.

Die differenzierte Auswertung des Proliferationsverhaltens innerhalb der Fallgruppe der Bypässe zeigte, dass nicht bei allen Läsionsstadien der "Bypass graft disease" (Typ I – III) die Media die Gefäßwandregion mit der stärksten Proliferationsaktivität darstellte (Tab. 4.10, Abb. 4.6 / Anhang: Tab. 4.9). Bei den proliferativen Intimaläsionen (Typ I), jenen explantierten Bypässen mit der kürzesten *in vivo* Laufzeit, wies im Gegensatz zu den Typ II und III Läsionen die Neointima den höchsten Proliferationsindex auf.

Gewebeart	PI - NI	PI - ME	PI - AD
Native Venen (n = 5)	0.0000	0.0325	0.0000
Typ I Läsionen (n = 10)	0.0195	0.0144	0.0071
Typ II Läsionen (n = 6)	0,0000	0,0186	0,0000
Typ III Läsionen (n = 14)	0,1107	0,1638	0,0567

Tab. 4.10 Zusammenfassung der Mediane der Proliferationsindizes (Anhang: 4.9).

PI: Proliferationsindex, NI: Neointima, ME: Media, AD: Adventitia.

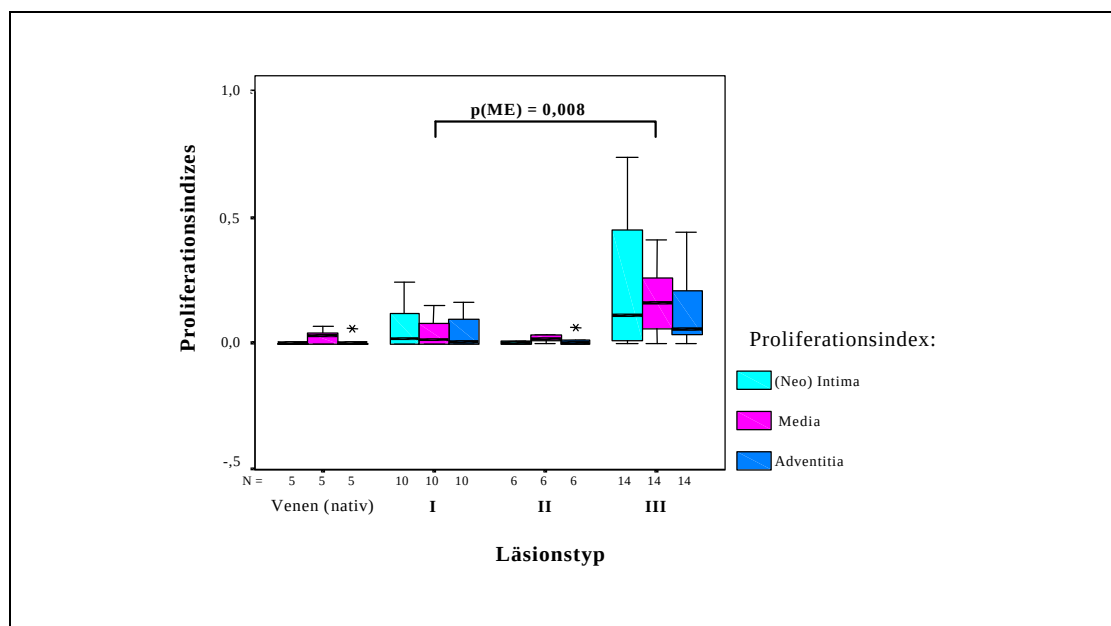


Abb. 4.6 Graphische Darstellung der Proliferationsindizes in den verschiedenen Gefäßwandregionen der untersuchten Kontrollgruppe (n = 5) und der Fallgruppe der Bypass-Läsionen (n = 30).

(*) Ausreißer der untersuchten Fallgruppe.

Insgesamt konnte eine deutliche Zunahme der Proliferationsindizes über den Gefäßquerschnitt (Neointima, Media, Adventitia) ausgehend von frühen Typ I Läsionen zu "komplexen Läsionen" (Typ III) der "Bypass graft disease" festgestellt werden. Für die mediale Wandregion konnte diese Beobachtung mit einem statistisch auffälligen p-Wert ($p^{\text{ME}} = 0,008$) belegt werden (p^{NI} und $p^{\text{AD}} > 0,05$).

Auffallend war bei der vergleichenden Auswertung der Bypass-Läsionen, dass die Typ II Bypässe die geringste Proliferationsaktivität innerhalb dieser Fallgruppe (I – III) zeigten, die noch unterhalb jener der Kontrollgruppe der nativen Venen lag.

II. Korrelation der Parameter: Proliferationsaktivität und Implantationsdauer

Korrelierte man die Ergebnisse der statistischen Analyse Läsionstyp / Implantationsdauer (4.1.2) mit der Proliferationsaktivität (4.1.4.1), so war eine Abhängigkeit dieser Parameter voneinander zu beobachten. Je höher der Grad der Bypass-Läsion war und daran gekoppelt die Implantationsdauer, desto höher war im Mittel der nachgewiesene Proliferationsindex eines Präparates (vgl. Abb. 4.3 und 4.6).

III. Charakterisierung der proliferierenden Zellen

Immunhistochemische Doppelfärbungen (3.2.6.2) zur Zelltypcharakterisierung markierten Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten im aktiven Zellzykluszustand (Abb. 4.7). Darüber hinaus traten proliferierende Zellen auf, die mit keinem der verwendeten Charakterisierungsantikörper detektiert werden konnten und als nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen eingeordnet wurden (Tab. 4.11).

In nativen Venen sowie Typ I und II Läsionen bildeten Endothelzellen den Hauptanteil der proliferierenden Zellen im Bypass-Querschnitt, gefolgt von glatten Muskelzellen. Allerdings bildeten bereits bei den Typ II Läsionen nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen (50 %) die Hauptfraktion der proliferierenden Zellen in der neointimalen Wandregion, die bei den Typ III Läsionen schließlich den wesentlichen Anteil der proliferierenden Zellen in der Neointima und Media einnahmen. Lediglich in der Adventitia der "komplexen Läsionen" wurde die Anzahl der "aktiven" mesenchymalen Zellen durch jene der proliferierenden Zellen der Vasa Vasorum (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) überschritten.

Auffallend war die Zunahme der proliferierenden Entzündungszellen in der Neointima der "komplexen Läsionen" im Vergleich zu den Typ I und II Läsionen.

Tab. 4.11 Prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden, bezogen auf die drei Gefäßwandregionen (Kontrollgruppe (n = 5), Fallgruppe der Bypass-Läsionen (n = 30)).

NI: Neointima, ME: Media, AD: Adventitia, E: Endothelzellen, S: glatte Muskelzellen, Mph: Makrophagen, T: T-Lymphozyten, N: nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen.

Gewebeart	Zelltyp	NI (%)	ME (%)	AD (%)
Native Venen (n = 5)	E / S:	0 / 0	88 / 12	100 / 0
	Mph / T:	0 / 0	0 / 0	0
	N:	0	0	0
Typ I Läsionen (n = 10)	E / S:	82 / 9	90 / 10	100 / 0
	Mph / T:	9 / 0	0	0
	N:	0	0	0
Typ II Läsionen (n = 6)	E / S:	38 / 12	75 / 12,5	100 / 0
	Mph / T:	0	0	0
	N:	50	12,5	0
Typ III Läsionen (n = 14)	E / S:	6 / 2	25 / 18	51 / 18
	Mph / T:	18 / 0	1 / 3	4 / 12
	N:	74	53	15

Tab. 4.11 Prozentualer Anteil der verschiedenen Zelltypen, die sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden, bezogen auf die drei Gefäßwandregionen (Kontrollgruppe (n = 5), Fallgruppe der Bypass-Läsionen (n = 30)).

IV. Topographie der proliferierenden Zelltypen in der Gefäßwandanatomie

Die aktiven Zellen der Neointima der Typ I und II Läsionen waren vorrangig luminal Endothelzellen sowie vereinzelt glatte Muskelzellen und Entzündungszellen. Proliferierende Zellen der Media dieser Klassifikationstypen bildeten zumeist Bestandteile von Versorgungsgefäßen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) oder waren in ihrer Umgebung orientiert (glatte Muskelzellen, nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen).

In "komplexen Läsionen" (Typ III) wurde in der Neointima und Media ein Ki-67 Detektionsmuster beobachtet, das jenem der Typ I und II Läsionen entsprach. Jedoch traten zusätzlich proliferierende Zellen in den charakteristischen atherosklerotisch veränderten neointimalen Arealen auf (Zonen extrazellulärer Lipideinlagerung, Plaqueschultern mit Ausrichtung auf den Lipidkern). In diesen Regionen war der Anteil nicht-charakterisierbarer mesenchymaler Zellen und Entzündungszellen überwiegend.

In der Adventitia aller Läsionstypen wurden proliferierende Zellen überwiegend der Vasa Vasorum (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) und ihrer unmittelbaren Umgebung zugeordnet (Makrophagen, T-Lymphozyten, nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen).

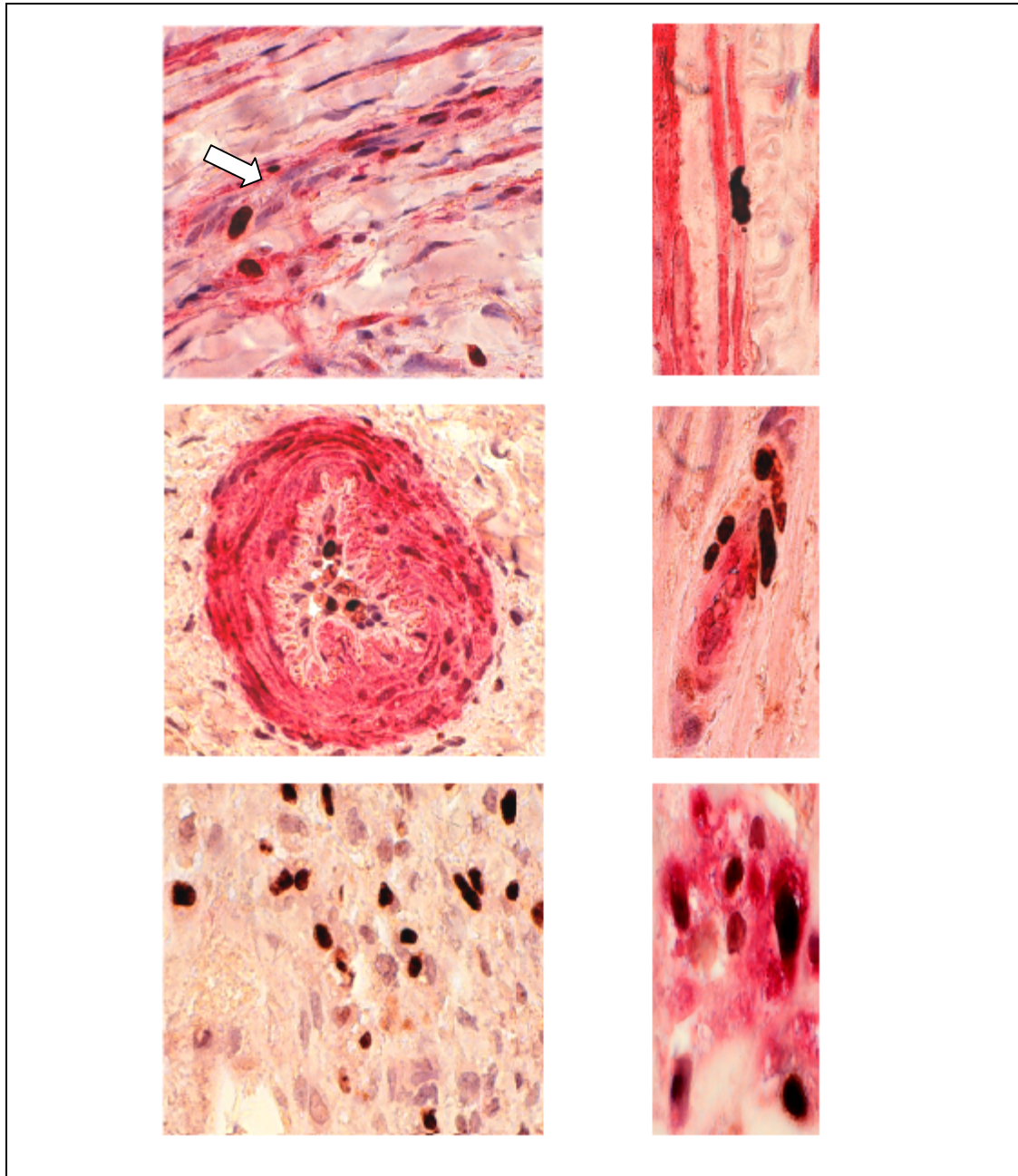


Abb. 4.7 Immunhistochemische Detektion der zellulären Proliferation.

Oben links: Ausschnitt aus der Media einer Bypass-Läsion. Dokumentiert sind proliferierende Muskelzellen der zirkulären Mediaschicht in unmittelbarer Nähe eines Vasa Vasorum (Versorgungsgefäß gekennzeichnet durch einen Blockpfeil). Oben rechts: Vergrößerung einer proliferierenden medialen Muskelzelle. Mitte links: Darstellung eines Versorgungsgefäßes der Adventitia, das lediglich im Lumen proliferierende Zellen aufweist, die nicht mit dem muskelzellspezifischen Antikörper detektiert werden konnten. Mitte rechts: Vasa Vasorum innerhalb der Media eines Bypass-Präparates, dessen Gefäßwand proliferierende Muskelzellen aufweist. Unten links: Proliferierende Zellen in der atherosklerotischen neointimalen Region einer Typ III Läsion (Zone extrazellulärer Lipideinlagerung). Unten rechts: Aktivierte Makrophagen im Bereich extrazellulärer Lipideinlagerung der Neointima (Typ III Läsion).

Legende zur immunhistochemischen Detektion:

Oben und Mitte (links / rechts): Doppelfärbung: Anti-Ki-67 (braunes Kernsignal) / Anti- α -Smooth Muscle Cell Actin (rotes cytoplasmatisches Signal). Unten links: Einfachfärbung: Anti-Ki-67 (braunes Kernsignal). Unten rechts: Doppelfärbung: Anti-Ki-67 (braunes Kernsignal) / Anti-CD 68 (rotes cytoplasmatisches Signal).

4.2 *In vitro* Zellkulturuntersuchungen humaner glatter Muskelzellen

4.2.1 Charakterisierung kultivierter Muskelzellen

Für die *in vitro* Zellkultur-Untersuchungen wurden mediale glatte Muskelzellen aus humanen Aortasegmenten mittels Explantattechnik gewonnen (3.3.1). Als Parameter der Zellqualität der primärkultivierten Zelllinien galt ein gutes Zellwachstumsverhalten (3.3.3), eine intakte Zellmorphologie als auch die Reinheit, bezogen auf den Anteil glatter Muskelzellen der Zelllinien (3.3.2).

Zur Überprüfung der Reinheit der Zelllinien wurden immunhistochemische Färbungen unter Verwendung zelltypspezifischer Antikörper für glatte Muskelzellen und Endothelzellen durchgeführt (3.3.2, Abb. 4.9). Stimulationsversuche erfolgten ausschließlich mit Zelllinien, die mindestens einen Anteil von 80 % glatter Muskelzellen zeigten.

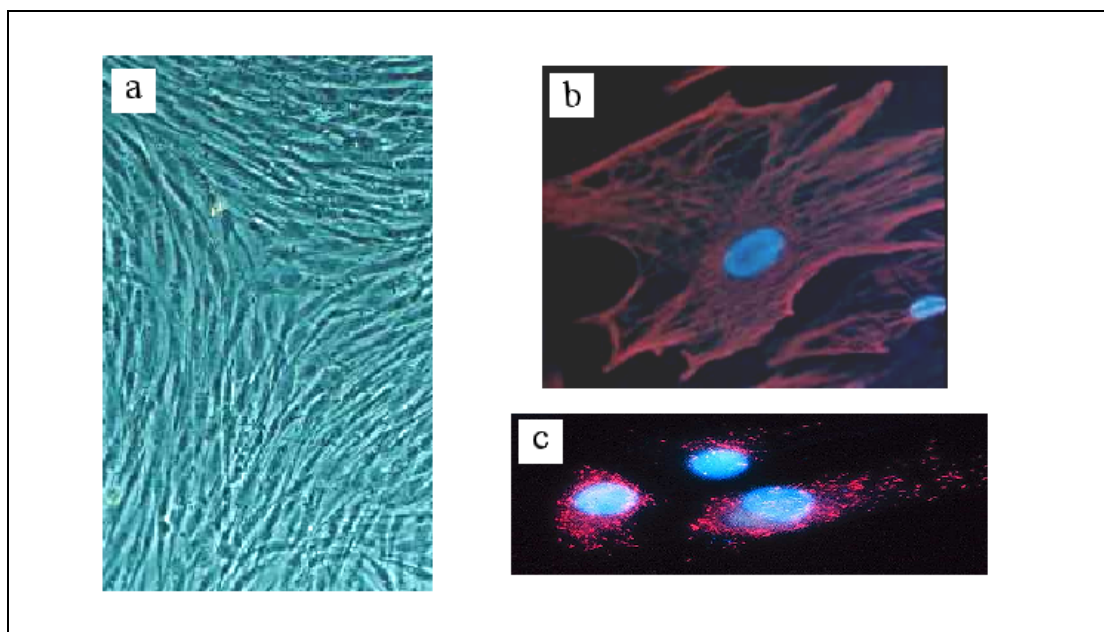


Abb. 4.8 Primärkultivierte Aortazellen.

(a) Charakteristisches "hill und valley" Wachstumsmuster kultivierter glatter Muskelzellen (Vergrößerung: 200fach), (b) Zellcharakterisierungsnachweis glatter Muskelzellen mittels " α -smooth muscle cell actin" Detektion (Vergrößerung: 200fach), (c) Zellcharakterisierungsnachweis von Endothelzellen mittels "von Willebrand Faktor" Detektion (Vergrößerung: 400fach).

4.2.2 Untersuchung des mitogenen Einflusses des Wachstumsfaktors PDGF auf kultivierte Muskelzellen

Wesentlich für die Untersuchungen dieser Arbeit war der Nachweis der Proliferationsinduktion primärkultivierter Muskelzellen durch die homodimeren Varianten (AA / BB) des Wachstumsfaktors PDGF.

Zur Analyse des Einflusses der PDGF Isotypen (AA / BB) wurden Wachstumskurven angelegt, um das Wachstumsverhalten der Zelllinien unter normalen Kulturbedingungen (Kontrollansatz) sowie nach Mitogen-abhängiger Stimulation zu analysieren (3.3.3).

Abbildung 4.9 dokumentiert den zeitlichen Verlauf eines repräsentativen Induktionsversuches zur Analyse des Einflusses der Wachstumsfaktoren PDGF-AA und -BB. Das Liniendiagramm zeigt, dass der Isotyp PDGF-BB eine stärkere Proliferationsaktivierung als PDGF-AA induzierte, beschrieben durch die Fläche zwischen den Linienverläufen der Stimulationsversuche und dem Kontrollansatz (siehe Pfeilmarkierungen). Mittelwertberechnungen der Zellzahlzunahme in den verschiedenen Stimulationsansätzen in Bezug zu dem Kontrollansatz belegten diese Beobachtung. Die Zellzahl unter PDGF-BB Stimulation nahm um das 2fache zu, während sich der Zellzuwachs unter PDGF-AA Gabe nur auf das 1,7fache belief.

Beide PDGF-Isotypen bewirkten eine deutlich stärkere Proliferationsinduktion der kultivierten Zellen als die normalen Kulturbedingungen des *in vitro* Systems.

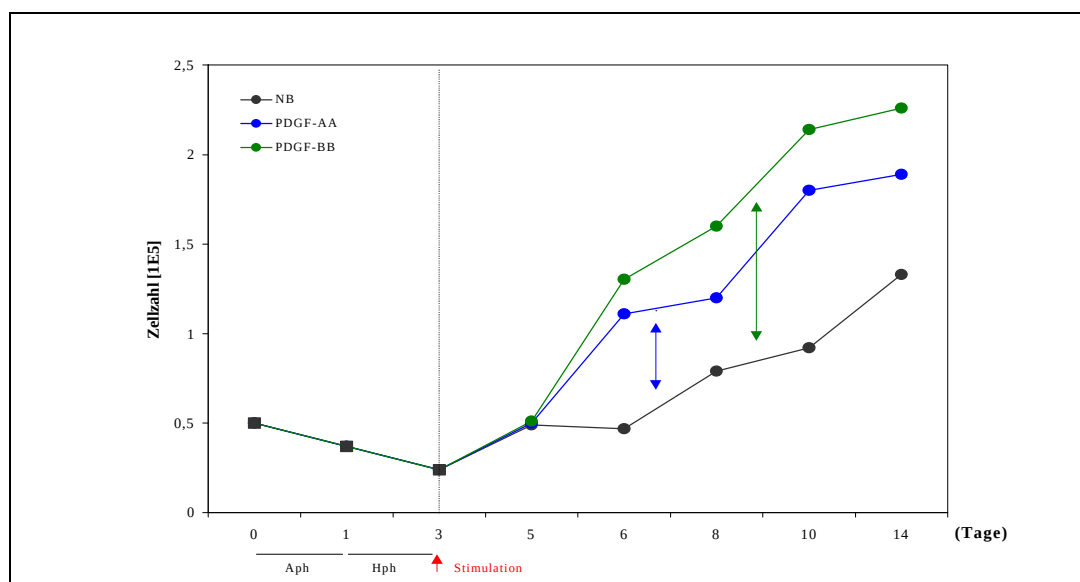


Abb. 4.9 Graphische Darstellung einer typischen Wachstumskurve kultivierter Muskelzellen aus der Aorta.

Abb. 4.9 Graphische Darstellung einer typischen Wachstumskurve kultivierter Muskelzellen aus der Aorta.

Aph: Anwachsphase der kultivierten Zellen nach der Aussaat, NB: Normalbedingungen.

Kurvenlegende: (NB): Versuchsansatz, in dem Zellen direkt nach der "Hungerphase" wieder unter Normalbedingungen kultiviert wurden; (PDGF-AA): Versuchsansatz, in dem Zellen nach der "Hungerphase" einer initialen Stimulation mit PDGF-AA [50 ng/ml] ausgesetzt wurden; (PDGF-BB): Versuchsansatz, in dem die Zellen nach der "Hungerphase" einer initialen Stimulation mit PDGF-BB [50 ng/ml] ausgesetzt wurden.

Charakterisierung der Zellen des Versuchsansatzes: 80 - 100 % glatte Muskelzellen (mediale Aortenzellen, Passage 3).

4.2.3 Untersuchungen zum Expressionsverhalten der gewählten Kandidatengene

Die Untersuchung der gewählten Kandidatengene (c-fos, c-myc) erfolgte auf Ribonukleinsäureniveau durch die RT-PCR Technik (3.4.8) und die Northern Blot Analyse (3.4.9).

4.2.3.1 Analyse des Expressionsverhaltens der gewählten Kandidatengene in humanen Aortagefäßen

Um Informationen über das Expressionsverhalten der gewählten Kandidatengene (c-fos, c-myc) im Ausgangsgewebe der primärkultivierten Muskelzellen zu erhalten, wurden Aortasegmente nicht-erkrankter Probanden (n = 2) untersucht.

Die mRNA Detektion der Kandidatengene erfolgte aus Gesamt-RNA Extrakten (3.4.4) des Probenmaterials mittels RT-PCR Analyse.

Die erzielten Ergebnisse zeigten für alle Kandidatengene eine mRNA Expression in den untersuchten Aortaprobe, dokumentiert durch cDNA Amplifikate spezifischer Größe (Abb. 4.10).

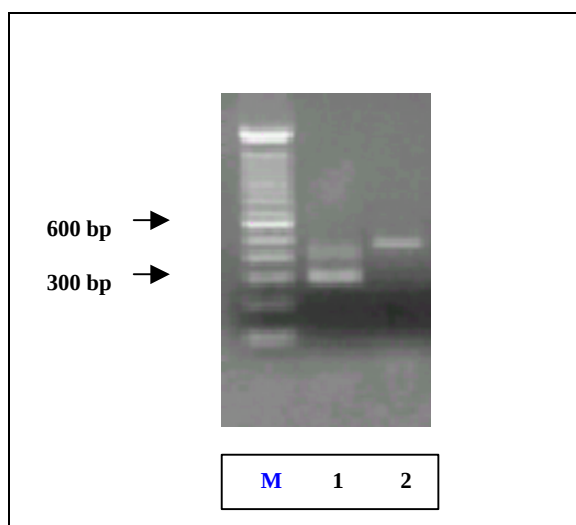


Abb. 4.10 Nachweis der Expression der gewählten Kandidatengene in der Aortenwand eines Probanden.

Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung (2 %iges Agarosegel) der generierten RT-PCR Produkte.

Neben dem Molekulargewichts-Marker (M) wurden jeweils 10 µl der Amplifikate der Kandidatengene aufgetragen:

(1): c-fos (300 bp), (2): c-myc (479 bp).

Spur 1:

Bei der größeren Zusatzbande, die bei der c-fos PCR hervortritt, muss es sich um den Nachweis genomischer DNA Verunreinigungen handeln (Exon 2 / 3 übergreifendes cDNA Amplifikat (300 bp) + Intron 3 (113 bp) = 413 bp Fragment).

4.2.3.2 Analyse des Expressionsverhaltens der gewählten Kandidatengene in kultivierten Muskelzellen

Zur Analyse der Expressionsaktivität der untersuchten Gene (c-fos, c-myc) in primärkultivierten Muskelzellen unter Zellkultur-Normalbedingungen wurden RT-PCR Analysen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser PCR Analysen zeigten eine deutliche Expression sowohl der "frühen Zellzyklusgene" (c-fos, c-myc) als auch des gewählten Kontrollgens GAPDH in kultivierten Muskelzellen, dokumentiert durch deutliche PCR Produktbanden spezifischer Länge der verschiedenen cDNA Fragmente nach elektrophoretischer Gelaufentrennung (Abb. 4.11).

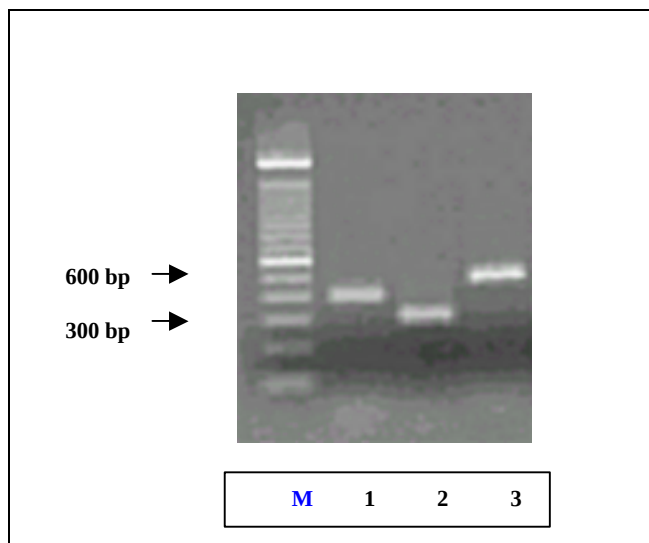


Abb. 4.11 Nachweis der Expression der gewählten Kandidatengene in primärkultivierten Muskelzellen unter Zellkultur-Normalbedingungen.

Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung (2 %iges Agarosegel) der generierten RT-PCR Produkte.

Neben dem Molekulargewichts-Marker (M) wurden jeweils 10 µl der Amplifikate der Kandidatengene aufgetragen:
(1): GAPDH (397 bp), (2): c-fos (300 bp), (3): c-myc (479 bp).

4.2.4 Untersuchung der Induktionsaktivität des Wachstumsfaktors PDGF auf das Expressionsverhalten der gewählten Kandidatengene in kultivierten Muskelzellen

Durch diesen Versuchskomplex wurde die Induktionsaktivität der Modulatoren PDGF-AA und -BB auf das Expressionsverhalten der "frühen Gene", c-fos und c-myc, in zeitabhängigen Stimulationsversuchen (3.3.4) charakterisiert.

Zur Analyse des spezifischen mRNA Expressionsverhaltens wurde die Technik der RT-PCR (3.4.8) sowie die Northern Blot Analyse (3.4.9) eingesetzt, wobei Northern Blot Untersuchungen stichprobenweise zur Überprüfung der Ergebnisse der RT-PCR Experimente vorgenommen wurden.

4.2.4.1 Untersuchung der Induktionsaktivität der Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB auf das Expressionsverhalten der "frühen Zellzyklusgene"

I. Analyse des Expressionsverhaltens unter Einsatz der RT-PCR Technik

Die erzielten Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen bezüglich des Expressionsverhaltens des Kandidatengens **c-fos** sind in Abbildung 4.12 dargestellt:

- Die Kurvenverläufe der Induktionsversuche zur Charakterisierung der c-fos Transkriptionsaktivität nach **PDGF-AA** Stimulation zeigten eine transiente monophasische Ausprägung, gefolgt von einem sekundären Expressionsanstieg (Abb. 4.12 - oben).

Die vergleichende Auswertung der fünf verschiedenen Experimente erbrachte für vier untersuchte Zelllinien (STV 1 – 4) einen nahezu identischen Kurvenverlauf. Diese Zelllinien zeigten zu Beginn des Stimulationsversuches, nach Arretierung der Zellen in der G₀ Phase, keine c-fos Expression. Somit hatte die Haltung der Zellen unter Minimalbedingungen eine negative Nivellierung der beobachteten c-fos Grundexpression unter Zellkultur-Normalbedingungen bewirkt (siehe 4.2.3.2). Ausgehend von diesem Nullpunkt präsentierten die Linienverläufe dieser Versuche unter PDGF-AA Stimulation einen kontinuierlichen Anstieg der c-fos Expression, die nach einer Stunde eine maximale Transkriptionsaktivität erreichte. Eine Gegenregulation der Expression erfolgte kontinuierlich innerhalb von einer Stunde bei drei der vier betrachteten Stimulationsversuche (STV 1, 3, 4), während Versuch 2 erst nach sechs Stunden die Nulllinie erreichte. Nach vier (STV 1, 3) bzw. sechs (STV 2, 4) Stunden konnte ein erneuter Anstieg der spezifischen mRNA Konzentration beobachtet werden.

Stimulationsversuch 5 hingegen zeigte eine verzögerte Arretierung in die G₀ Phase, eine c-fos Expression, die erst nach zwei Stunden ein Maximum aufwies und keinen sekundären Anstieg des Kurvenverlaufs zeigte.

- Die c-fos Expressionskinetik unter **PDGF-BB** Stimulation zeigte monophasische sowie biphasische Kurven (Abb. 4.12 - unten).

Während sich die monophasischen Versuchsverläufe hinsichtlich ihrer Expressionsmaxima (STV 4: 2 Stunden, STV 7: 60 Minuten) unterschieden, zeigten die biphasischen Kurven (STV 3, 6, 8) zeitabhängige Gemeinsamkeiten, gekennzeichnet durch eine geringere Primärreaktion nach 30 Minuten und ein stärker ausgeprägtes Maximum nach zweistündiger Stimulation.

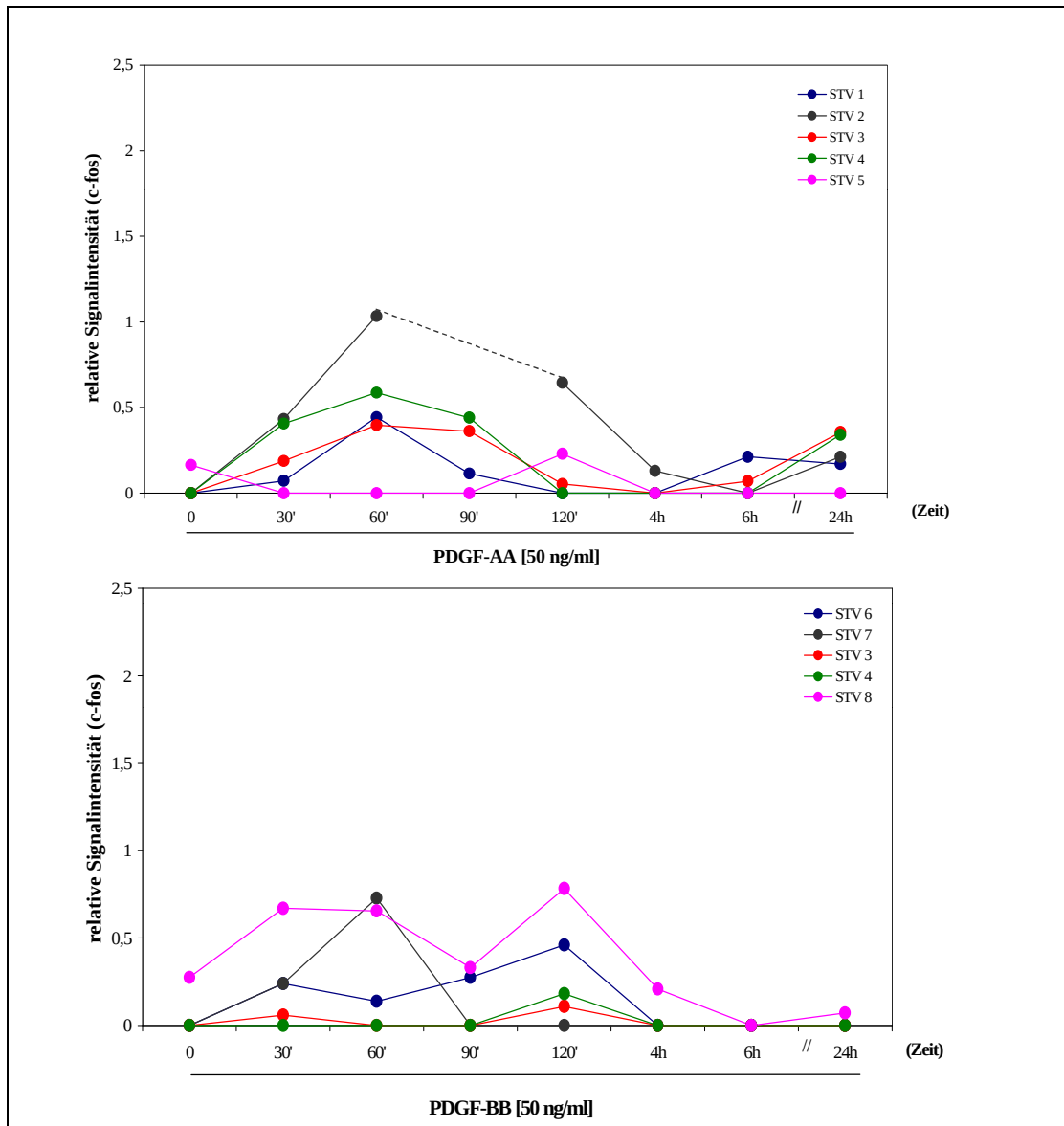


Abb. 4.12 Graphische Darstellung der Zeitkinetik der c-fos mRNA Expression unter PDGF-AA (oben) bzw. PDGF-BB (unten) Induktion.

Die Liniendiagramme zeigen jeweils fünf unabhängige Experimente, die unter PDGF-AA bzw. BB Stimulation vorgenommen wurden (3.3.4). Dokumentiert sind die ermittelten relativen Signalintensitäten der RT-PCR Analysen (c-fos : GAPDH Verhältnis / 3.4.10) in Abhängigkeit der Stimulationsdauer der Zellen.

Bei den Stimulationsversuchen 3 und 4 erfolgte die Induktion der Zellen einer Zelllinie in parallelen Versuchsansätzen durch PDGF Isotypen AA bzw. BB, um eine vergleichende Beurteilung der Modulationsaktivität dieser Faktoren auf das untersuchte Kandidatengen zu ermöglichen.

----- Gestrichelte Linienverläufe überbrücken nicht erfasste Stimulationswerte.

Zelllinienbeschreibung:

=> STV 4: kommerzielle Zelllinie (Passage 6 / Spenderalter: 16)

=> STV 1 – 3, 5 – 8: selbstkultivierte Zelllinien (Passage: 3 – 4 / Spenderalter: 46 – 79).

Bei vergleichender Auswertung der c-fos Expression unter PDGF-AA bzw. -BB Stimulation war auffallend, dass die PDGF-AA Modulation zu einer definierteren Expressionsreaktion führte als die PDGF-BB Stimulation, die eine indifferentere Antwort zeigte.

Ferner deuteten die Experimente 3 und 4, bei denen Zellen der gleichen Zelllinie in parallel durchgeführten Versuchansätzen mit PDGF-AA bzw. -BB stimuliert wurden, darauf hin, dass die PDGF-AA Stimulation eine stärkere c-fos Expressionsreaktion induziert. Die Versuchansätze zeigten bezüglich ihrer Expressionsmaxima eine 3,6fach (STV 3) bzw. 3,2fach (STV 4) schwächere Ausprägung unter PDGF-BB im Vergleich zur PDGF-AA Stimulation, die ferner zeitverzögert erst eine Stunde später auftrat.

Eine Bewertung der c-fos Transkriptionsdaten hinsichtlich des Alters der Gewebespenders zeigte keinen Zusammenhang mit dem ermittelten Expressionsverhalten der primärkultivierten Muskelzellen.

Ein Unterschied der Expressionskinetiken zwischen der kommerziellen Zelllinie (STV 4) und den selbstkultivierten Zelllinien war nicht zu beobachten.

Die Ergebnisse zur Charakterisierung der Modulationskapazität der PDGF Isotypen auf die Expression des Kandidatengens **c-myc** werden durch die Liniendiagramme in Abbildung 4.13 dokumentiert:

- Das Liniendiagramm der c-myc Expression nach **PDGF-AA** Stimulation zeigte einen mehr oder weniger ausgeprägten biphasischen Kurvenverlauf der Induktionsversuche (Abb. 4.13 - oben).

Ausgehend von einer c-myc Basalexpression der Zellen nach der Arretierung in der G₀ Phase, die lediglich bei den Zelllinien 2 und 3 nicht ausgeprägt war, zeigten die Expressionskurven einen biphasischen Verlauf mit geringem Anstieg. Hervorzuheben ist, dass die Minimalwerte nach Abschluss der ersten Kurvenphase oberhalb der Grundexpression zu Beginn des Versuches lagen und dass die zweiten Peaks, ausgenommen Stimulationsversuch 1, höhere Signalintensitäten als die ersten Kurvenmaxima aufwiesen.

Die beiden Maxima präsentierten eine zeitabhängige Ausprägung. Das erste war mit Abweichungen von 30 Minuten (STV 4: 30 Minuten, STV 1: 90 Minuten) bei der Mehrzahl der Zelllinien nach einer Stunde (STV 2, 3, 5) manifestiert. Ein zweiter Peak trat nach vier

(STV 1, 4) bzw. sechs Stunden (STV 2, 3) auf. Abweichend verhielt sich Stimulationsversuch 5, dessen zweiter Kurvenanstieg mit Abschluss des Versuches noch nicht beendet war.

- Das Liniendiagramm zur Analyse der c-myc Expression nach **PDGF-BB** Stimulation zeigte kein gemeinsames Kurvencharakteristikum (Abb. 4.13 - unten).

Die Ergebnisse hierzu zeigten eine Inhomogenität sowohl bezüglich ihres graphisch dargestellten Kurvenverlaufes (mono- bzw. biphasisch) als auch der Zeitkinetik ihrer Maxima (30', 60', 120', 6 h). Als Gemeinsamkeit der Zelllinien dieser Versuchsreihe, mit Ausnahme von Experiment 3, konnte lediglich die Basalexpression der Zellen (Zeitpunkt G_0) vor der Stimulation hervorgehoben werden.

Eine Aussage hinsichtlich einer variierenden Modulationsfähigkeit der beiden PDGF Isotypen auf die c-myc Expression konnte nicht getroffen werden.

Eine Bewertung der c-myc Transkriptionsdaten bezüglich des Alters der Gewebespende zeigte keinen Zusammenhang mit dem Expressionsverhalten der primärkultivierten Muskelzellen.

Ferner konnte auch kein nennenswerter Unterschied zwischen dem Transkriptionsverhalten der kommerziellen Zelllinie (STV 4) und den selbstkultivierten Zelllinien beobachtet werden.

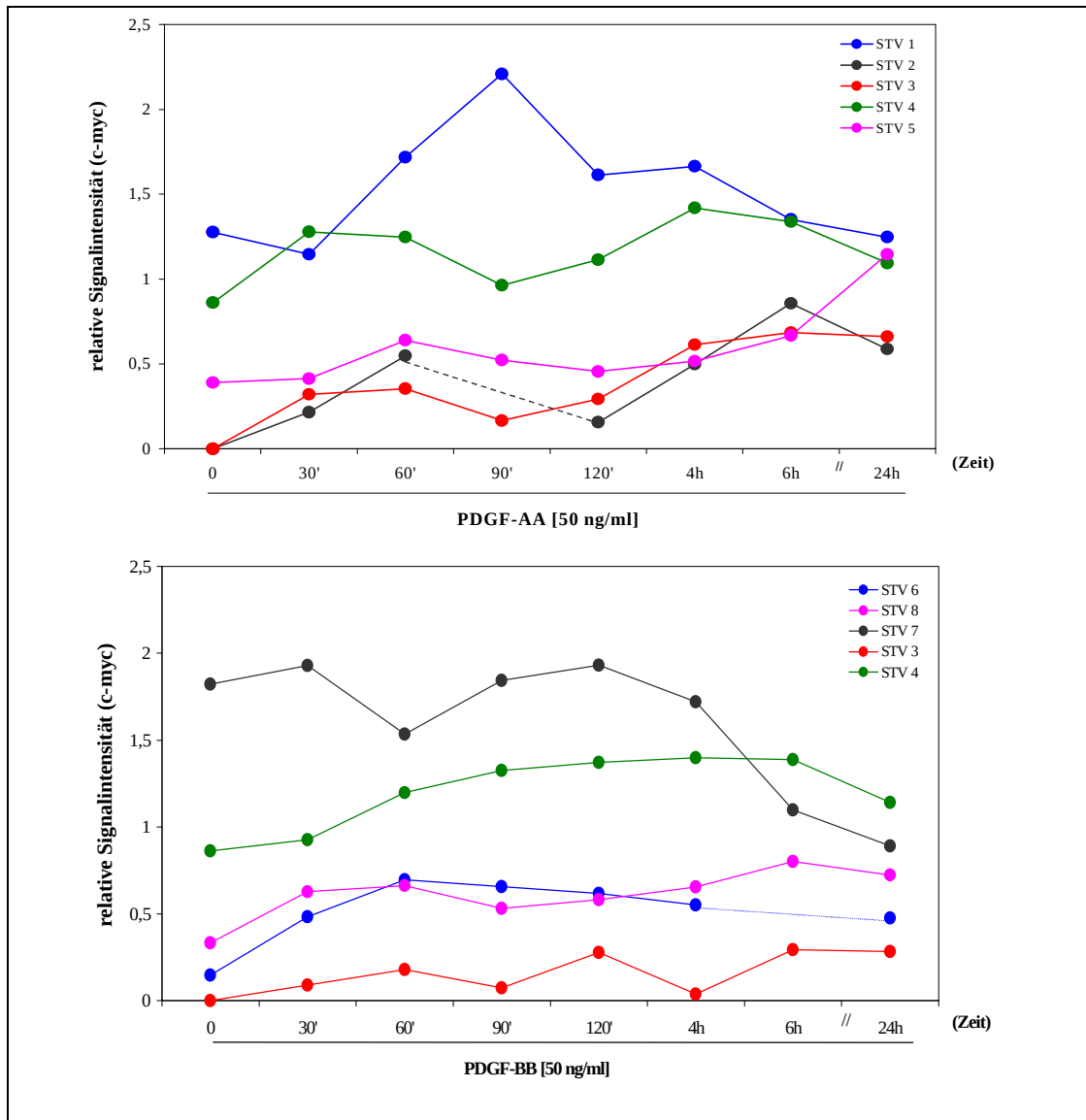


Abb. 4.13 Graphische Darstellung der Zeitkinetik der c-myc mRNA Expression unter PDGF-AA (oben) bzw. PDGF-BB (unten) Induktion.

Die Liniendiagramme zeigen jeweils fünf unabhängige Experimente, die unter PDGF-AA bzw. BB Stimulation vorgenommen wurden (3.3.4). Dokumentiert sind die ermittelten relativen Signalintensitäten der RT-PCR Analysen (c-myc : GAPDH Verhältnis / 3.4.10) in Abhängigkeit der Stimulationsdauer der Zellen.

Bei den Stimulationsversuchen 3 und 4 erfolgte die Induktion der Zellen einer Zelllinie in parallelen Versuchsansätzen durch PDGF Isotypen AA bzw. BB, um eine vergleichende Beurteilung der Modulationsaktivität dieser Faktoren auf das untersuchte Kandidatengen zu ermöglichen.

----- Gestrichelte Linienverläufe überbrücken nicht erfasste Stimulationswerte.

Zelllinienbeschreibung:

=> STV 4: kommerzielle Zelllinie (Passage 6 / Spenderalter: 16)

=> STV 1 – 3, 5 – 8: selbstkultivierte Zelllinien (Passage: 3 – 4 / Spenderalter: 46 - 79).

II. Analyse des Expressionsverhaltens unter Einsatz der Northern Blot Technik

- Die Northern Blot Analysen bestätigten die erzielten Expressionsprofile, die mit der RT-PCR Technik ermittelt wurden, für das Kandidatengen **c-fos**.

In der Abbildung 4.14 ist ein repräsentativer Vergleich der gewonnenen Northern Blot und RT-PCR Ergebnisse eines Stimulationsversuches dokumentiert.

Wie bereits visuell erkennbar und durch die densitometrische Ausmessung der Versuchsdaten belegt, präsentierten beide Untersuchungsmethoden ein zeitabhängiges transientes Expressionsverhalten. Das Maximum der c-fos Expression wurde jeweils nach einer einstündigen PDGF-BB Stimulation gemessen.

- Die c-myc RT-PCR Daten konnten ebenfalls durch die Northern Blot Hybridisierung bestätigt werden.

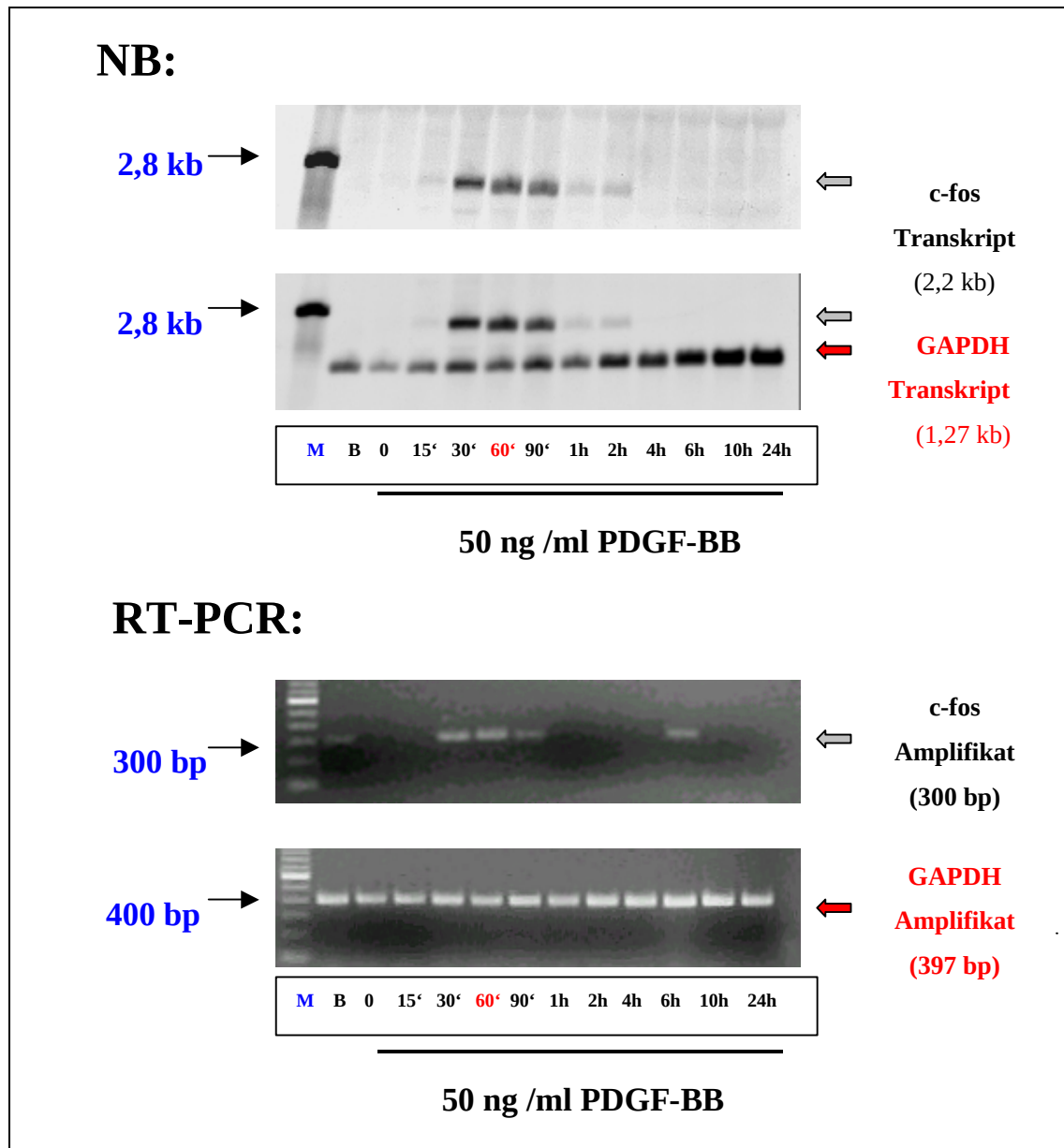


Abb. 4.14 Gegenüberstellung der Northern Blot Technik (oben) und RT-PCR Analyse (unten) zum Nachweis des c-fos Expressionsprofils.

Dokumentiert ist der Stimulationsversuch 7 aus der Untersuchungseinheit zur Überprüfung des Einflusses der PDGF-BB [50 ng/ml] Stimulation auf die c-fos Expression in kultivierten Muskelzellen (siehe Abb. 4.12 – unten). Dargestellt sind die Messwerte des Expressionszustandes vor Versuchsbeginn (Basalexpression (B) unter Zellkultur-Normalbedingungen) und nach Arretierung der Zellen in der G₀ Phase (0) sowie nach definierten Stimulationszeiten (15', 30', 60', 90', 1h, 2h, 4h, 6h, 10h, 24h). Die rot unterlegten Stimulationszeiten entsprechen den ermittelten Maximalexpressionen.

Northern Blot Analyse (NB):

Der obere Blot zeigt neben dem Molekulargewichtsmarker (M) den Nachweis für die c-fos Transkriptbande (2,2 kb) nach spezifischer Hybridisierung mit einer DIG-markierten c-fos cRNA Antisense Sonde.

Der untere Blot repräsentiert denselben Blot nach Rehybridisierung mit einer spezifischen GAPDH cRNA Antisense Sonde. Nachgewiesen wurde das 1,27 kb GAPDH Transkript unterhalb der c-fos RNA Bande.

RT-PCR Analyse:

Das obere Bild präsentiert die gelelektrophoretische Auftrennung (2 %iges Agarosegel) der spezifischen c-fos RT-PCR Produkte (300 bp) neben dem Molekulargewichtsstandard (M).

Das untere Bild zeigt die Gelaufrennung (2 %iges Agarosegel) des extern amplifizierten GAPDH Standards (397 bp).

5. Diskussion

5.1 Histomorphologische Untersuchungen humaner Bypass-Gefäße

5.1.1 Gründe für die Etablierung eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für aortokoronare Bypass-Läsionen

Die Pathogenese der "Bypass graft disease" entspricht einem Prozess, der sich in verschiedene Stadien der progredienten Gefäßumgestaltung untergliedern lässt. Die einzelnen Entwicklungsstufen sind durch histomorphologische Merkmale der veränderten Bypass-Anatomie gekennzeichnet (1.2.1.2.2).

Grundlegend für die Erforschung von Krankheitsbildern mit progressiver Organumgestaltung ist die histomorphologische Definition der verschiedenen Entwicklungszustände, um ein Bezugssystem für diagnostische sowie wissenschaftliche Untersuchungen zu haben.

Beispielhaft für die Bedeutung einer international anerkannten Nomenklatur im Bereich der Gefäßerkrankungen ist die histologische Klassifikation der Läsionen der primären Atherosklerose durch die AHA, die maßgeblich die Studien zum Verständnis der Pathomechanismen der primären Atherogenese vorangetrieben hat (STARY et al., 1994, 1995; STARY, 2000 / 1.2.1.2.1).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lag für die Läsionen der "Bypass graft disease" keine histomorphologische Nomenklatur vor.

Vorgelegte histomorphologische Studien zur Analyse der "Bypass graft disease" verwendeten vorrangig zur Untergliederung der untersuchten Stichproben temporäre Gruppenmerkmale (Implantationsdauer: Stunden, Tage, Monate, Jahre / BARBORIAK et al., 1974; NEITZEL et al., 1986; DILLEY et al., 1988; KALAN und ROBERTS, 1990 / 1.2.1.2.2). Eine Vorgehensweise, die auf Grund der starken individuellen Schwankungen der zeitlichen Progression von Bypass-Läsionen nicht exakt ist und somit kein Kriterium zur präzisen pathomorphologischen Definition eines Läsionsstadiums der "Bypass graft disease" darstellt (u.a. BULKLEY, 1980; NEITZEL et al., 1986; MOTWANI und TOPOL, 1998). Somit ist zum heutigen Zeitpunkt die Diskussion der publizierten Daten von histomorphologischen Studien als auch von Expressionsanalysen spezieller Kandidatengene in Bypass-Läsionen nur bedingt möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine histomorphologische Klassifikation für Bypass-Läsionen in Anlehnung an die Nomenklatur der AHA für primäratherosklerotische Läsionen definiert.

Charakterisiert wurden drei Läsionsklassen (I – III) sowie Subtypen (A – C), die zeitlich aufeinander aufbauend im Verlauf der "Bypass graft disease" ausgeprägt werden (4.1.1):

- ◆ primäre proliferative Intimaverdickung (**Typ I**, Subtyp: A, B)
- ◆ fibrosierende Intimaverdickung (**Typ II**, Subtyp: A, B)
- ◆ komplexe Bypass-Läsion" (**Typ III**, Subtyp: A - C)

Mit der Definition dieses Klassifikationsschemas für Bypass-Läsionen ist erstmalig ein Bezugssystem geschaffen worden, dass die Zuordnung histologischer Befunde, z.B. aus morphometrischen Studien und immunhistochemischen Expressionsanalysen, zu den verschiedenen Stadien der "Bypass graft disease" ermöglicht.

Sicherlich ist eine Weiterentwicklung dieses Systems basierend auf der Untersuchung größerer Untersuchungsgruppen sinnvoll, sowie es bei der Nomenklatur der AHA für primäratherosklerotische Läsionen geschah, die über Jahrzehnte modifiziert wurde (ASCHOFF, 1930, 1933; GORE und TEJADA, 1957; HOLMAN et al., 1958; STARY et al., 1994, 1995; STARY, 2000).

5.1.1.1 Gegenüberstellung der histomorphologischen Nomenklaturen: "Bypass graft disease" versus primäre Atherosklerose

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, bestehen trotz des gemeinsamen Merkmals der progredienten Gefäßwandumgestaltung im Zuge der Pathogenese der "Bypass graft disease" und der primären Atherogenese auch Unterschiede zwischen diesen Vaskulopathien.

Ein wesentliche Divergenz zwischen diesen Gefäßkrankheiten besteht in der Zeitspanne, die für die Ausprägung "komplexer Läsionen" benötigt wird (1.2). Korrelationsstudien dieser Arbeit bestätigten den bereits zuvor beschriebenen Trend (4.1.2), dass "späte" atherosklerotische Läsionen von Bypass-Gefäßen innerhalb von Jahren ausgeprägt werden (Typ III Läsionen: 9,6 Jahre ($\pm 1,1$) / u.a. BULKLEY, 1980; NEITZEL et al., 1986; MOTWANI und TOPOL, 1998), während ihre Ausbildung bei der primären Atherogenese Jahrzehnte benötigt (STARY et al., 1994, 1995; STARY, 2000). Diese "beschleunigte" Läsionskinetik war ebenfalls bei den "frühen" Bypass-Läsionen (Typ I Läsionen: 5,9 Jahre ($\pm 1,3$) / Typ II Läsionen: 6,5 Jahre ($\pm 2,1$)) im

Vergleich zu der "schleichenden" Entwicklung der intimalen Läsionen der Atherogenese zu beobachten (STARY et al., 1992, 1994).

Weitere Unterschiede zwischen der "Bypass graft disease" (BGD) und der primären Atherosklerose (pA / nach AHA) treten bei dem Vergleich der histomorphologischen Klassifizierungsschemata hervor (Abb. 5.1):

Bei der Gegenüberstellung der histomorphologischen Nomenklaturen zeigt sich ein wesentlicher Unterschied bei den "frühen Läsionen" (BGD Typ I und II $\Leftrightarrow$ Typ I – III nach AHA). Während die Typ I und II Läsionen der "Bypass graft disease" durch eine massive Umgestaltung der Intima (Intimahyperplasie, Auflagerung einer "fibrösen Kappe") gekennzeichnet sind, weisen die "frühen Läsionen" der primären Atherosklerose eine "schleichende" Veränderung der Intima in Form einer Infiltration und Akkumulation von Entzündungszellen auf.

Nach dem heutigen Wissensstand ist die intimale Proliferation venöser aortokoronarer Bypässe als eine Adaptation dieser Gefäße auf die Integration in das arterielle System zu betrachten (GIBBONS und DZAU, 1994; GIBBONS, 1995; MILLS und EVERSON, 1995). Dabei handelt es sich um einen zumeist limitierten Prozess, der lediglich zu einer Gefäßstenose und keiner Obliteration führt und normalerweise zwei Jahre nach Bypass-Implantation zur Ruhe kommt (FUSTER et al., 1990).

Adaptive Intimaverdickungen infolge hämodynamischer Druckveränderung wurden von STARY und Mitarbeitern (1992) auch für native arterielle Gefäße beschrieben und als Regionen charakterisiert, die bevorzugte Ursprungsorte atherogener Gefäßwandveränderungen darstellen ("atherosclerosis-prone regions" / STARY et al., 1992). MOTWANI und TOPOL (1998) bestätigten dieses Phänomen für implantierte Bypass-Segmente, das auch in dieser Arbeit beobachtet wurde (4.1.1). Somit ist es wahrscheinlich, dass Areale adaptiver Neointimaausbildung (hyperplastische Anteile der Neointima (BGD Typ I) mit luminal aufgelagerter "fibröser Kappe" (BGD Typ II)) im Zuge der frühen "Bypass graft disease" Ausgangspunkte ("atherosclerosis-prone region") für spätere atherosklerotische Bypass-Umgestaltungen bilden.

Als Ursache für die "beschleunigte" Gefäßwandumgestaltung der venösen Bypass-Segmente wird die Bedeutung bereits vorhandener pathomorphologischer Veränderungen der nativen Gefäße (Phlebosklerose / THIENE et al., 1980; DILLEY et al., 1988; PANETTA et al., 1992; VARTY et al., 1993 / 1.2.1.2), perioperativ bedingter Verletzungen der Gefäßtransplantate als auch endogener Noxen (Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hypertonie) diskutiert (DAVIES und HAGEN, 1995; MILES und EVERS, 1995; GIBBONS, 1995).

Histomorphologische Untersuchungen der nativen Venen der Kontrollgruppe dieser Arbeit bestätigten, dass nahezu alle Bypass-Präparate minimale bzw. schwache pathomorphologische Befunde vor ihrer Implantation aufwiesen (4.1.1.2.2), die sicherlich auf kausalpathologische Risikofaktoren sowie das Lebensalter der Patienten zurückzuführen sind.

Atherosklerotische Prozesse sind im Verlauf der "Bypass graft disease" für das "späte" Versagen von Bypass-Gefäßen verantwortlich (**BGD Typ III**). Die einzelnen Subtypen der "komplexen Typ III Läsionen" (**A – C**) sind bezüglich ihrer pathomorphologischen Merkmale vergleichbar mit Stadien der Atherogenese (Typ I – VIII nach AHA) :

Typ III A Bypass-Läsionen sind wie die "frühen" atherosklerotischen Arterienveränderungen (Typ I - III nach AHA) histologisch durch Infiltration bzw. folgend durch Akkumulation von Monozyten / Makrophagen sowie Blutlipiden in der Intima gekennzeichnet. Bei beiden Gefäßkrankheiten kommt es im weiteren Verlauf der Pathogenese zur Einschmelzung des extrazellulären Lipids zu einem Lipidkern (Atherom: **Typ III B** ⇔ Typ IV nach AHA) und später zur Verstärkung (BGD) bzw. Auflagerung (pA) einer luminalen kollagenreichen "fibrösen" Kappe (Fibroatherom: **Typ III B** ⇔ Typ V nach AHA). Sowohl bei "späten" Läsionen der "Bypass graft disease" (**Typ III B**) als auch der primären Atherogenese (Typ IV und V nach AHA) kann es zur Erosion bzw. Ruptur der Plaqueoberfläche und / oder Einblutung in den Plaque kommen (**Typ III C** ⇔ Typ VI nach AHA).

Trotz Parallelen zwischen den Subtypen der "komplexen Läsionen" der "Bypass graft disease" und den verschiedenen Stadien der primären Atherosklerose sind histomorphologisch Unterschiede zwischen diesen Läsionen hervorzuheben. Während die Atherome der pathologisch veränderten Bypass-Gefäße diffus und konzentrisch mit gering ausgeprägter "fibröser Kappe" erscheinen, sind die Atherome der primären Atherosklerose zumeist fokal, exzentrisch und auf Grund einer deutlich ausgebildeten "fibrösen Kappe" klar abgrenzbar.

Auffallend ist der hohe Anteil an Entzündungszellen, Schaumzellen und vielkernigen Riesenzellen in den Atheromen der Bypass-Gefäße im Vergleich zu primär atherosklerotischen Läsionen. Diese Beobachtung gibt Anlass zur Diskussion einer "Immunsystem-induzierten" Genese der "Bypass graft disease" (RATLIFF und MYLES, 1989; DENG et al., 2000).

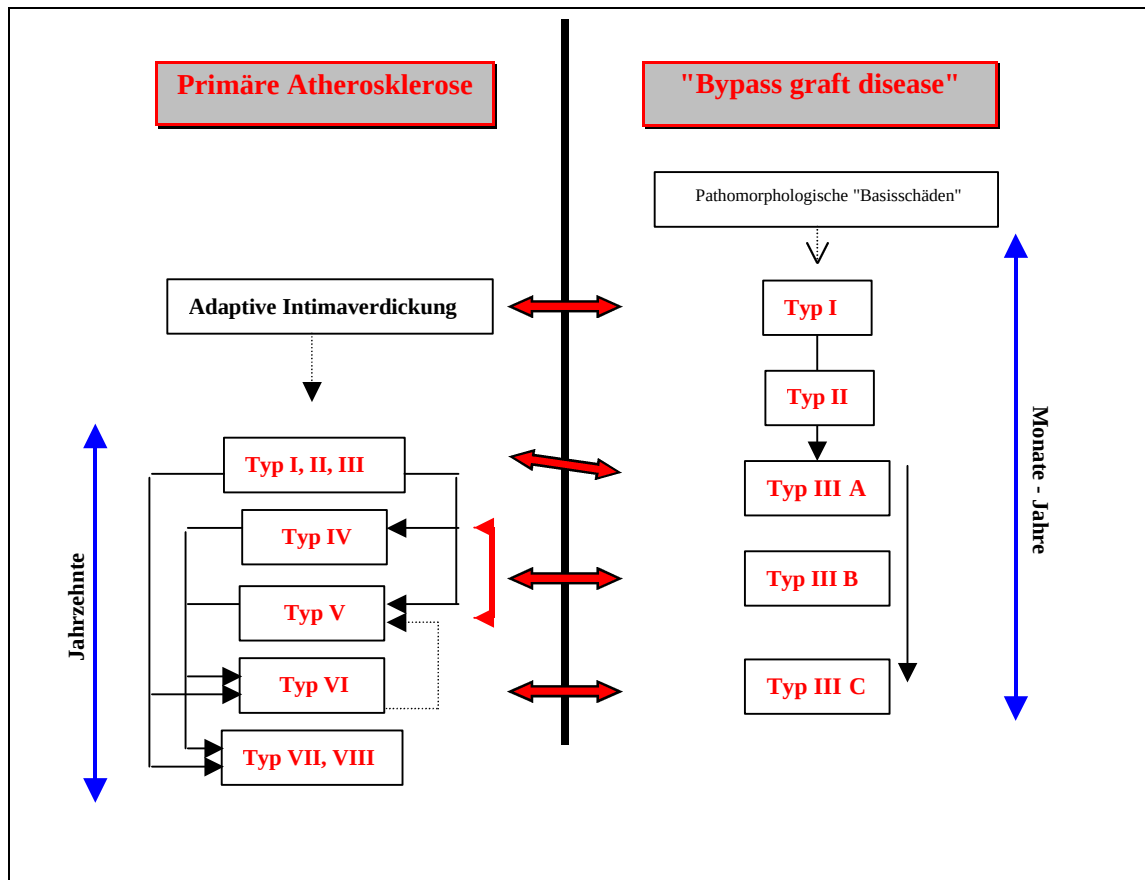


Abb. 5.1 Gegenüberstellung der pathomorphologischen Läsionstypen im Verlauf der Pathogenese der primären Atherosklerose (nach AHA) und der "Bypass graft disease".

Pathomorphologische "Basisschäden" stehen für die Gefäßanomalien, die die venösen Bypass-Segmente bereits vor ihrer Implantation ausgeprägt haben.

5.1.2 Die Bedeutung des "Gefäßwand-Remodelings" im progredienten Verlauf der "Bypass graft disease"

Das Verständnis hinsichtlich der pathomorphologischen Gefäßwandumgestaltung ist wesentlich geprägt durch die Arbeitshypothese von GIBBONS und DZAU (1994). Diese beschreibt das Gefäß als Organ, dessen Zellen über autokrine und parakrine Interaktionen miteinander kommunizieren. Infolge von Veränderungen in der Umgebung (z.B. Blutdruckänderung) reagiert das "Gefäßorgan" mit adaptiver Anpassung.

Bedingt durch die intrazelluläre Kommunikation der Gefäßzellen durch Mediatoren (Wachstumsfaktoren und -inhibitoren, Matrixkomponenten, Matrixproteasen und -inhibitoren)

kommt es zum "Remodeling" der Gefäßwandarchitektur auf Grund induzierter Zellreaktionen wie Proliferation, Migration, Produktion extrazellulärer Matrix sowie Apoptose.

5.1.2.1 Parameter des "Gefäßwand-Remodelings"

Um Informationen über die pathomorphologischen Veränderungen der Gefäßwandanatomie im Verlauf der "Bypass graft disease" zu erhalten, wurden in dieser Arbeit mittels morphometrischer Untersuchungen die Parameter Querschnittsfläche und Zellzahl der Intima und Media quantifiziert (4.1.3).

Die Messdaten der Querschnittsflächen zeigten einen deutlichen Anstieg der Intimafläche ausgehend von den nativen Venen im Vergleich zu den erkrankten Bypass-Segmenten sowie eine deutliche Zunahme der Neointimafläche mit zunehmender Läsionsprogression innerhalb der Fallgruppe der Bypässe (Typ I zu Typ III). Diese Zunahme der Intimadicke ist im Zusammenhang der "Arterialisierung" des venösen Bypass-Gefäßes zu sehen. Bedingt durch den Anstieg der luminalen Druckbedingungen sowie durch peri- und postoperative Verletzungen kommt es zur Neointimaausbildung als Ausdruck der adaptiven Antwort und der "response to injury" Reaktion. Im Gegensatz dazu war eine Abnahme der Mediafläche ausgehend von nativen Venen zu den "frühen" Bypass-Läsionen (Typ I) zu verzeichnen, die vermutlich auf die Dilatation der nativen Venen vor der Implantation in das arterielle System zurückzuführen ist. Im Verlauf der "Bypass graft disease" (Typ I zu Typ III) hingegen war ein kompensatorischer Effekt zu beobachten, dokumentiert durch einen Anstieg der Mediafläche.

Die Berechnung des Intima:Media-Verhältnisses, der Maßzahl für die Quantifizierung der Neointimabildung, bestätigte entsprechend der aufgeführten Basisdaten eine deutliche Zunahme der Neointimafläche im Zuge der "Bypass graft disease". Als Ursachen des Wachstums der Neointima wird die Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die (Neo)Intima, deren Proliferation sowie die Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen aufgeführt (RAINES et al., 1993).

Mit der Zunahme der Intima- und Mediafläche war eine Zunahme der Zelldichte beim Vergleich der Fallgruppe der Bypass-Läsionen mit der untersuchten Kontrollgruppe zu verzeichnen. Interessanterweise war jedoch innerhalb der Gruppe der Bypässe mit der Progression der Läsionen (Typ I zu Typ III) eine deutliche Abnahme der Zelldichte zu beobachten.

Diese Daten stehen im Einklang mit einer publizierten Studie von GENTILE und Mitarbeitern (1999), die sich mit der peripheren "Bypass graft disease" der unteren Extremitäten beschäftigt. Als Ursache der primären Zunahme der Zelldichte bei den frühen Läsionen wird hier die initiale zelluläre Proliferation angeführt, getriggert durch multifaktorielle Induktoren der "Bypass graft disease" (BADIMON et al., 1993). Die folgende Abnahme der Zelldichte im Verlauf der progressiven Gefäßwandumgestaltung wird der zunehmenden Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten (NEWBY und GEORGE, 1996; NEWBY, 1997) sowie im begrenzten Umfang apoptotischen Ereignissen (KOCKX et al., 1996) zugeschrieben.

5.1.3. Die Bedeutung der zellulären Proliferation im Verlauf der "Bypass graft disease"

Die Pathogenese der "Bypass graft disease" ist durch die Ausbildung einer Neointima gekennzeichnet. Als ein zentraler Auslöser der intimalen Hyperplasie wird, wie bereits aufgeführt, die Proliferation der vaskulären Muskelzellen beschrieben (CLOWES et al., 1983; ROSS, 1993; GIBBONS, 1995).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals die Bestimmung der zellulären Proliferation in humanen aortakoronaren Bypass-Läsionen. Vergleichend wurden native, nicht-implantierte Venensegmente und explantierte, pathomorphologisch veränderte Bypass-Präparate analysiert. Zum Nachweis der Proliferationsaktivität wurde immunhistochemisch das Zellzyklus-abhängige Kernprotein Ki-67 detektiert (HILKER et al., 2001 a / 4.1.4.1).

5.1.3.1 Proliferationsanalysen: Grundlagen aus der Literatur

Studien in den vergangenen Jahren zur Analyse der Proliferationsaktivität in humanen Gefäßläsionen beschränkten sich weitestgehend auf primäratherosklerotische und restenotische Präparate sowie auf einige wenige Untersuchungen zur peripheren "Bypass graft disease" (Anhang: Tab. 5.1, 5.2).

Der Vergleich der publizierten Daten zeigt starke Abweichungen hinsichtlich der ermittelten Proliferationsindizes, die durchschnittlich im Bereich von 0,12 – 3,6 % für primäratherosklerotische und restenotische Läsionen (Ausnahme: PICKERING et al., 1993:

15,2 %) bzw. 1,03 – 4,2 % für periphere Bypass-Läsionen liegen. Schwankungen, die bedeutend sind, denn lediglich eine einmalige Verdopplungsrate der Muskelzellen pro Woche, ausgehend von einer Grundfläche von 1 mm³, bewirkt in einer Zeitspanne von unter drei Monaten eine Flächenzunahme auf 1 cm³ (O'BRIEN et al., 1993).

Als Ursache für die Inhomogenität der Proliferationsdaten werden in der Literatur folgende Punkte diskutiert:

- ❖ Mangelnde Definition des pathoanatomischen Ursprungs und der histomorphologischen Klassifikation der Untersuchungspräparate, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der Daten nur eingeschränkt möglich ist.

- ❖ Verwendung unterschiedlicher Proliferationsmarker (PCNA, Ki-67) und immunhistochemischer Nachweismethoden zur Detektion der zellulären Proliferation.

Grundlage für die Bedenken an der Vergleichbarkeit von Proliferationsdaten, die unter Verwendung der verschiedenen "Zellzyklus-abhängigen Antikörper" PCNA und Ki-67 generiert wurden, ist die divergierende Spezifität dieser Marker für den "aktiven Zellzykluszustand". Während die Funktion des Kernproteins Ki-67 ausschließlich im Zusammenhang mit der "aktiven Phase" des Zellzyklus (G₁-, M- und G₂-Phase) beschrieben wurde, konnte für den Polymerase Co-Faktor PCNA gezeigt werden, dass dieses Protein darüber hinaus Aufgaben bei der DNA Reparatur hat (1.3.1.1), weshalb die Gefahr des falsch-positiven Nachweises proliferierender Zellen unter Einsatz des PCNA Antikörpers besteht (GORDON et al., 1990; O'BRIEN et al., 1993). Dennoch wurde zur Bestimmung der Proliferationsaktivität in Gefäßpräparaten vorwiegend der Nachweis des Kernproteins PCNA herangezogen. Dieses ist damit zu erklären, dass dieser Proliferationsmarker (MIYACHI et al., 1978) Jahre vor dem Kernprotein Ki-67 (GERDES et al., 1983) beschrieben wurde.

Ein weiterer Punkt, der ursächlich für die Varianzen der publizierten Proliferationsdaten verantwortlich gemacht wurde, besteht in der Schwierigkeit des immunhistochemischen Nachweises von Kernproteinen. Nukleäre Proteine sind Antigene, deren chemische Struktur extrem empfindlich ist gegenüber Fixierungsmitteln und deren Nachweis im fixierten Zustand nicht direkt möglich ist. Somit stellen die Wahl des Fixierungsmittels (z.B. Formalin, Paraformaldehyd, Methanol) und der Fixierungsdauer (CECIL et al., 1985; MASON und O'LEARY, 1991) sowie die Art der Antigen-Demaskierung (WERNER et al., 1996; PILERI et al., 1997) Parameter im Nachweisprotokoll dar, die maßgeblich das Ergebnis beeinflussen und deren Fehleinstellung falsch-positive als auch falsch-negative Resultate hervorrufen

können (GELB et al., 1992; CATTORETTI et al., 1992; HAERSLEV und JACOBSEN, 1994; ISNER, 1994).

Umfangreiche Studien in unserem Labor zeigten, wie zuvor bereits von BRANDL und Mitarbeitern (1997) beschrieben, dass die beiden Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 unter Verwendung eines geeigneten Nachweisprotokolls, d.h. unter Berücksichtigung der sensiblen Parameter Fixierungsmittel und -dauer sowie Antigendemaskierung, vergleichbare Nachweisergebnisse liefern.

❖ Abweichungen in der Auswertungstechnik der Präparate.

Zur Analyse von Proliferationsindizes finden bislang verschiedene Methoden ausgehend von der manuellen Auszählung einiger repräsentativer Areale zur Bestimmung des Proliferationsindex (MAREK et al., 1998) bis hin zur Auszählung des kompletten Gesamtpräparates (O'BRIEN et al., 1993; WESTERBAND et al. 1997) Anwendung. Wobei die Auszählung einzelner mikroskopischer Gesichtsfelder fragwürdig ist, da die regionale Zusammenlagerung proliferierender Zellen ein bekanntes Phänomen darstellt (WESTERBAND et al., 1997, 1998). Somit ist es sinnvoll, die Zahl aller proliferierenden Zellen des Gefäßquerschnitts zu ermitteln und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl zu stellen. Dabei erhöht der Einsatz von computergesteuerten Messtechniken zur Zellzahlbestimmung, wie es in dieser Arbeit erfolgte, die Präzision (WESTERBAND et al., 1998).

Abschließend ist die Vorgehensweise der statistischen Analyse der Auszählungen zu diskutieren. Zumeist wird für die Bewertung der Häufigkeitsverteilung einer untersuchten Stichprobe nur der Mittelwert, eine Maßzahl die empfindlich ist gegenüber "Ausreißern" einer Messreihe, herangezogen. Empfehlenswert für eine deskriptive Statistik ist jedoch zusätzlich die Darstellung des Medians, einer Maßzahl, die robust ist gegenüber "Ausreißern" einer Messreihe, so wie es in der vorliegenden Arbeit erfolgte.

5.1.3.2 Proliferationsanalysen in humanen aortokoronaren Bypass-Läsionen

Die Proliferationsuntersuchungen der vorliegenden Studie erbrachten einen durchschnittlichen Index von $0,11^{3)}$ für venöse aortokoronare Bypass-Läsionen (4.1.4.1).

³⁾ Für den Vergleich der Proliferationsindizes der Literaturdaten und der Ergebnisse dieser Arbeit wurden die Mittelwerte der Indizes herangezogen.

Die vergleichende Analyse der Fallgruppe der aortokoronaren Bypässe (NI = 0,0280, Me = 0,0435, Ad = 0,0300) zeigte im Gegensatz zu den nativen Venen der Kontrollgruppe (I = 0,000, Me = 0,0325, Ad = 0,000) eine deutlich höhere Proliferationsaktivität.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Vergleich zu den von HOFSTRA et al. (1996) und WESTERBAND (1997, 1998) publizierten Daten zu peripheren Bypass-Läsionen, so wurde für die peripheren Präparate eine höhere Proliferationsaktivität ermittelt (Proliferationsindizes: 1,3 – 4,2). Ein möglicher Grund für die divergierenden Resultate könnte die durchschnittlich deutlich kürzere *in vivo* Laufzeit der untersuchten peripheren Bypass-Segmente (HOFSTRA et al. (1996): 1 - 24 Monate; WESTERBAND et al.: 1,5 – 10 Monate (1997); ~ 18 Monate (1998)) gegenüber den aortokoronaren Präparaten dieser Studie sein (71,3 – 115,6 Monate). Ein Erklärungsansatz der durch die Hypothese, dass die "initiale Proliferation" der Gefäßwandzellen in Folge einer induzierten Verletzung stärker ausgeprägt ist als die Proliferationsaktivität zu späteren Phasen der Läsionsausbildung, bestätigt wird (WESTERBAND et al., 1998).

Die Gegenüberstellung der ermittelten Proliferationsindizes dieser Arbeit mit den Ergebnissen in primäratherosklerotischen Läsionen zeigt vergleichbare Proliferationsindizes bei Studien, in denen "fortgeschrittene" primäratherosklerotische Präparate analysiert wurden (GORDON et al., 1990; REKTHER und GORDON, 1995; BRANDL et al., 1997).

Hingegen publizierten KATSUDA et al. (1993) und MAREK et al. (1998) deutlich höhere Proliferationsindizes für primäratherosklerotische und restenotische Gewebe als sie in dieser Arbeit für aortokoronare Bypass-Läsionen ermittelt wurden. Diese Abweichungen resultieren vermutlich aus den beschriebenen Unterschieden bezüglich der eingesetzten Nachweismethodik, der Auswerttechnik sowie der Inhomogenität des Untersuchungsmaterials.

5.1.3.2.1 Proliferationsaktivität im Zuge der Progression der "Bypass graft disease"

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsaktivität im Zuge der Bypass-Progression (Typ I zu Typ III), unter Ausschluss der Typ II Läsionen⁴⁾, deutlich anwächst. Während für die Wandregion der Neointima eine Zunahme der Proliferationsrate um das 6fache zu beobachten war, stieg diese in der Media um das 11fache an (Typ I zu Typ III).

⁴⁾ Die Ergebnisse der Typ II Läsionen werden in der Diskussion nicht berücksichtigt, da davon ausgegangen wird, dass auf Grund der kleinen Fallzahl dieser Untersuchungsgruppe die Maßzahlen (Median, Mittelwert) nicht repräsentativ sind.

GORDON und Mitarbeiter (1990) beschrieben dieses Phänomen der Zunahme der Proliferationsaktivität im Zuge der fortschreitenden Läsionsentwicklung ebenfalls für primäratherosklerotische Vaskulopathien in Koronarien, bei denen in fortgeschritteneren Plaqueläsionen eine stärkere Proliferation als in Präparaten mit einer "frühen" diffusen Intimaverdickung auftrat. Die Arbeitsgruppe von OREKHOV (1998) berechnete einen Anstieg der intimalen Proliferationsaktivität in primäratherosklerotischen Läsionen humaner Aorten um das 11fache, ausgehend von diffusen Intimahyperplasien über Typ I und II bis hin zu Typ V Läsionen (nach AHA).

Der Anstieg der Proliferationsaktivität in der neointimalen und medialen Wandregion der Bypass-Läsionen im Zuge der Progression der Läsionsentwicklung (Typ I zu Typ III) ist im Zusammenhang mit den parallel verlaufenden pathogenen Veränderungen der Bypass-Architektur zu betrachten (z.B. Vaskularisierung, Lipideinlagerung, fibrosierende Vorgänge), die mit einer Zunahme proliferationsinduzierender Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, extrazelluläres Lipid, extrazelluläre Matrixproteine) einhergehen und somit eine erhöhte zelluläre Proliferation auslösen (OREKHOV et al., 1998; WESTERBAND et al., 1999).

5.1.3.2.2 Topographie der proliferierenden Zellen in der Gefäßwandanatomie

Topographische Auswertungen ergaben, dass in der Kontrollgruppe der nativen Venen ausschließlich in der medialen Schicht "aktivierte" Zellen auftraten, während in der Fallgruppe der aortokoronaren Bypässe in allen Wandregionen (Neointima, Media, Adventitia) proliferierende Zellen zu beobachten waren. Innerhalb der Fallgruppe der Bypass-Läsionen zeigten die Typ I Läsionen in der Neointima die stärkste Proliferationsaktivität, während bei den Typ II und III Läsionen die Media die höchste Proliferation aufwies.

Untersuchungen in der Vergangenheit zur Proliferationsaktivität in Läsionen der peripheren "Bypass graft disease" berichteten unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der stärksten Proliferationsausprägung in der Gefäßwandanatomie. Während HOFSTRA und Mitarbeiter (1996) die Neointima als die Wandregion mit der stärksten Proliferationsaktivität detektierten, beobachteten WESTERBAND und Mitarbeiter (1998) in der Media die höchste Anzahl "aktivierter" Zellen.

Die Ausprägung unterschiedlicher Proliferationsaktivitäten in verschiedenen Wandschichten ist vermutlich an die Konzentration von Proliferationsinduktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, extrazelluläres Lipid, extrazelluläre Matrixproteine) gekoppelt. Dementsprechend sind die Proliferationsbedingungen in subendothelialen Arealen des Gefäßlumens sowie in der unmittelbaren Umgebung von Versorgungsgefäßen als auch in Regionen mit extrazellulärer Lipidakkumulation (Plaqueschultern) optimal (HOFSTRA, et al. 1996).

Eine andere Begründung für die variierende Proliferationsaktivität innerhalb der Gefäßwandanatomie bietet das Modell von O'BRIEN et al. (1993), das die Neointimaausprägung (nach PTCA) als einen Vorgang beschreibt, der in "drei Wellen" abläuft. Die "erste Welle" entspricht der Antwort der medialen Zellen auf eine induzierende Verletzung, gekennzeichnet durch die Proliferation glatter Muskelzellen. Diese Zellen wandern daraufhin in die Intima ein ("zweite Welle") und bewirken dort, u.a. durch weitere Proliferationsaktivität, die Entstehung der Neointima ("dritte Welle"). Bezugnehmend auf diese Hypothese entspricht das divergierende Proliferationsverhalten der Zellen in den verschiedenen Wandregionen (Neointima, Media) unterschiedlichen Entwicklungsphasen im Verlauf der Gefäßwandumgestaltung.

Neben der aufgeführten Bedeutung der Intima und Media im Zuge der Ausprägung von Vaskulopathien wurde in den vergangenen Jahren zunehmend deutlich, dass auch die Adventitia maßgeblich bei der Entwicklung von Gefäß-Läsionen beteiligt ist. Wenn auch die genauen Mechanismen bislang weitestgehend unbekannt sind, so zeigten SHI et al. (1996, 1997) sowie O'BRIEN et al. (1997) in Tiermodelluntersuchungen (Schwein) speziell für die "Bypass graft disease", dass proliferierende "perivaskuläre Myofibroblasten" der Adventitia entscheidend zum "Remodeling" der Bypass-Wand beitragen.

Korrespondierend zu diesen Daten konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit als auch in vorangegangenen Studien (HOFSTRA et al., 1996; WESTERBAND et al., 1997, 1998) eine deutliche Proliferationsaktivität in der Adventitia ermittelt werden.

5.1.3.2.3 Zelltypcharakterisierung der proliferierenden Zellen der "Bypass graft disease"

Immunhistochemische Doppelfärbungen zur Zelltypcharakterisierung stellten Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten sowie nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen im aktiven Zellzykluszustand dar. Endothelzellen sowie nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen bildeten die Hauptfraktion der proliferierenden Zellen in den nativen Venen und Bypass-Läsionen.

Proliferierende Endothelzellen waren sowohl in luminaler Orientierung der Gefäße als auch der Vasa Vasorum in der Gefäßwand (Neointima, Media, Adventitia) zu detektieren und bildeten in nativen Venen sowie in den Typ I und II Läsionen den Hauptanteil der "aktivierten" Gefäßzellen. Die gesteigerte Proliferationsaktivität von Endothelzellen erklärt sich aus ihrer topographischen Orientierung als Auskleidungsepithel der Gefäßlumen. Dadurch bedingt sind diese Zellen sowohl Proliferationsinduktoren (u.a. Wachstumsfaktoren, Cytokine) als auch mechanischen Reizen ("response to injury" Theorie), die die Proliferation stimulieren, direkt ausgesetzt (ROSS, 1993; HOFSTRA et al., 1996; WESTERBAND et al., 1997, 1998).

Der Anteil der proliferierenden Muskelzellen nahm in den untersuchten humanen aortokoronaren Präparaten dieser Arbeit nicht, wie von anderen Wissenschaftler für das Tiermodell und humane primäratherosklerotische Läsionen und periphere Bypass-Läsionen beschrieben wurde (u. a. O'BRIEN et al., 1993; WESTERBAND et al., 1997, 1998), den Hauptanteil der "aktivierten" Zellen in der Gefäßwand ein. Sie entsprachen der zweitgrößten Population proliferierender Zellen in nativen Venen und Typ I Läsionen, während in Typ II und III Läsionen der Anteil positiver Zellen für glattmuskuläres α -Aktin noch geringer war.

Entsprechende Beobachtungen wurden bereits in vorangegangenen Studien mit humanen primäratherosklerotischen Gefäßproben gemacht (KATSUDA et al., 1993; REKTHER und GORDON, 1995; BRANDL et al., 1997; MAREK et al., 1998). Zu erklären ist dieser Befund damit, dass vaskuläre Muskelzellen im Zuge der Gefäßwandumgestaltung einer Phänotypmodulation vom "kontraktilen" zum "synthetischen" Zustand unterliegen. Diese Dedifferenzierung der Muskelzellen erfolgt vor Beginn oder parallel zu der Migration und Proliferation der Zellen in erkrankten Gefäßwänden (SCHWARTZ et al., 1990), wodurch das erhöhte Auftreten nicht-charakterisierbarer mesenchymaler Zellen im Zuge des progressiven "Gefäßwand-Remodelings" der Bypass-Läsionen zu begründen ist, das mit einer Abnahme jener Zellen einhergeht, die spezifisch glattmuskuläres α -Aktin exprimieren (SCHWARTZ et al., 1986; RAINES und ROSS, 1993).

Das Auftreten aktivierter Muskelzellen und nicht-charakterisierbarer mesenchymaler Zellen in der Bypass-Anatomie korrelierte mit dem Angebot an Proliferationsinduktoren (Umgebung von Versorgungsgefäßen und extrazellulären Lipidansammlungen, Atheromen).

Darüber hinaus wurden bei der Zelltypcharakterisierung Zellen mit Leukozyten-spezifischen Antikörpern (Makrophagen, T-Lymphozyten) nachgewiesen. Diese bildeten lediglich in den "komplexen Bypass-Läsionen" eine nennenswerte Zellpopulation. Interessanterweise konnte

innerhalb dieses Läsionstyps wiederum ein verstärktes Auftreten der Entzündungszellen im fibroatheromatösen Subtyp (Typ III A) verzeichnet werden, orientiert in subendothelialen Regionen, in Thromben als auch in Arealen atheromatöser Plaqueschultern und Außenregionen von Lipidkernen. In nativen Venen hingegen wurden keine Entzündungszellen detektiert, und auch in den Typ I und II Bypass-Läsionen war das Auftreten von Entzündungszellen begrenzt.

Das Auftreten von Entzündungszellen in Gefäßpräparaten wurde bereits für primäratherosklerotische Präparate (OREKHOV et al., 1998) und periphere Bypass-Läsionen (WESTERBAND et al., 1998) beschrieben. Ihre Aufgabe im Zuge der Pathogenese von Vaskulopathien ist durch die von ihnen produzierten Mediatoren beschrieben, die die Funktion anderer Zellen modulieren. Entzündungszellen sind u.a. die Quelle für Vasodilatoren und Stimulatoren der Muskelzellbildung (z.B. induzierbare Nitritoxidsynthetase / BERNARD et al., 1992) sowie verschiedene Faktoren, die angiogenetische Mechanismen während des "Gefäß-Remodelings" induzieren. Beispielhaft dafür ist der Fibroblastenwachstumsfaktor (acid Fibroblast Growth Factor (aFGF)), der von Makrophagen der Plaqueregion produziert wird und die Einsprossung von Versorgungsgefäßen im Zuge der humanen Atherogenese induziert (KUZUYA et al., 1995).

Zusammenfassend kann nach Auswertung der Daten dieser Studie postuliert werden, dass die zelluläre Proliferation in aortakoronaren Bypass-Läsionen kein gleichmäßiges Verteilungsmuster über die Gefäßwandanatomie zeigte, sondern dass die aktivierten Zellen regional konzentriert auftraten. Eine enge Korrelation dieser proliferativen Zonen konnte zum einen mit dem Auftreten von Versorgungsgefäßen, die als Quelle zahlreicher Wachstumsstimulatoren anzusehen sind, und zum anderen mit der räumlichen Nähe eines Lipidkerns beobachtet werden. Ferner konnte eine Assoziation verschiedener Zelltypen zu histomorphologischen Gefäßmerkmalen erfolgen. Während in der räumlichen Umgebung von Versorgungsgefäßen vermehrt proliferierende glatte Muskelzellen, nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen sowie Entzündungszellen auftraten, wurden in "lipidreichen" Zonen der Plaqueregion vorrangig proliferierende Entzündungszellen und nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen detektiert.

5.2 *In vitro* Untersuchungen humaner glatter Muskelzellen

Limitierend für den Erfolg nach interventionellen Behandlungsmaßnahmen primäratherosklerotischer Läsionen und Bypass-Operationen bei KHK ist die Entwicklung von Restenosen. In diesem Zusammenhang ist die Analyse der Induktoren der pathophysiologischen Proliferation vaskulärer Muskelzellen von zentralem Interesse. Da in der Vergangenheit zahlreiche pharmakologische Strategien zur Inhibition der Stenosen und Restenosen ohne wesentlichen Erfolg blieben (POPMA et al., 1991), wurde in der letzten Dekade die Etablierung gentherapeutischer Behandlungsmaßnahmen maßgeblich gefördert (u.a. NABEL, 1995; MULLER, 1997; LEE et al., 1999; RUPP und MAISCH, 1999). Grundlage dieser Interventionsmethoden ist eine gute Charakterisierung gentherapeutischer Targets. Hierfür bieten sich u.a. Expressionsstudien entsprechender Kandidatengene im *in vitro* Zellkulturmodell an.

Mögliche Kandidatengene einer gentherapeutischen Behandlung sind einzelne Faktoren der Signaltransduktionskette wie z.B. Wachstumsfaktoren (u.a. PDGF, basic Fibroblast growth factor (bFGF), Transforming growth factor beta (TGF β)), zelluläre Effektorproteine (z.B. Phospholipase C) oder "second messenger" Moleküle (u.a. Diacylglycerin (DAG), Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃)) sowie nukleäre IEGs (1.3.2).

Ziel dieser Arbeit war es, dass Expressionsverhalten der IEGs c-fos und c-myc unter mitogener Modulation durch den Wachstumsfaktor PDGF, der ein entscheidender Aktivator der Pathogenese von Vaskulopathien ist (ROSS, 1993; BRYAN et al., 1994), in primärkultivierten humanen vaskulären Muskelzellen der Aorta zu analysieren (4.2).

5.2.1 Das Expressionsprofil der Proto-oncogene c-fos und c-myc in humanen Gefäßpräparaten

Grundlage für die Interpretation von *in vitro* Modelluntersuchungen ist die Kenntnis des Expressionsverhaltens der primärkultivierten Zellen bezüglich der gewählten Kandidatengene im Ausgangsgewebe. Dieses ist damit zu begründen, dass primärkultivierte Zellen, insbesondere vaskuläre Muskelzellen, auf Grund der Bedingungen im *in vitro* System und der damit verbundenen Dedifferenzierung der Zellen ein stark abweichendes Expressionsverhalten im Vergleich zum *in vivo* Zustand zeigen können (CHAMLEY-CAMPELL, 1979).

Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine Basalexpression der Kandidatengene in dem Ausgangsgewebe (humane Aorta) der Zellpräparation.

Aus vorangegangenen Expressionsstudien unserer Arbeitsgruppe auf RNA Niveau mittels *in situ* Hybridisierung war bereits bekannt, dass eine Basalexpression für das c-myc Gen in humanen "nicht-erkrankten" arteriellen und venösen Gewebeproben vorliegt, die deutlich unter der Transkriptionsaktivität des c-myc Gens in erkrankten Bypass-Proben lag, die vornehmlich Muskelzellen zugeordnet werden konnte (HILKER et al., 2001 b). MARIN und Mitarbeiter (1993) beschrieben eine entsprechende Hochregulation der c-myc Expression ausgehend von humanen "nicht-erkrankten" zu primäratherosklerotischen Gefäßpräparaten.

Für das c-fos Gen konnte eine vergleichbare Expressionsmodulation wie für c-myc, ausgehend von "nicht-erkrankten" zu pathologisch veränderten Gefäßpräparaten, in den vaskulären Muskelzellen nachgewiesen werden (GALEA et al., 1999).

Die Bedeutung der Basalexpression von c-myc und c-fos in "nicht-erkrankten" Gefäßproben ist noch ungeklärt. Als Ursache hierfür werden Subpopulationen "aktivierter" Muskelzellen angenommen, die in die Homöostase der Gefäßwand involviert sind (CLOWES et al., 1998).

Die Beobachtung der positiven Transkriptionsmodulation der Proto-oncogene c-fos und c-myc im Zuge der Pathogenese von Vaskulopathien ist vermutlich mit der Funktion ihrer Genprodukte als Regulatoren proliferativer und apoptotischer Zellereignisse, die beim pathogenen "Gefäß-Remodeling" von zentraler Bedeutung sind, zu begründen (c-myc: DESBARATS et al., 1996; c-fos: PICHACZYK und BLANCHARD, 1994). Untersuchungen im Tiermodell belegten die Korrelation zwischen der c-fos und c-myc Genexpression mit Proliferations- bzw. Apoptoseereignissen (RAMIREZ et al., 1996; GALEA et al., 1999).

5.2.2 Das Expressionsprofil der Proto-oncogene c-fos und c-myc in kultivierten humanen glatten Muskelzellen der Aorta

Untersuchungen zur Analyse des Expressionsprofils der Kandidatengene c-fos und c-myc wurden in der Vergangenheit vornehmlich mit tierischen (KINDY und SONENSHEIN, 1986; MIANO et al., 1990; BAUTERS et al., 1992) oder permanenten Zelllinien (CURRAN et al. 1985; DEAN et al., 1986; FREYTAG, 1988) durchgeführt. Hingegen liegen bis heute nur wenige Publikationen zu der Fragestellung des Expressionsverhaltens dieser speziellen Gene in primärkultivierten humanen Muskelzellen vor. Gründe hierfür sind sowohl die begrenzte Zugänglichkeit humaner

Gefäßpräparate als auch die Schwierigkeiten, die mit der Etablierung humaner Primärzelllinien verbunden sind. Einzelne Studien, die sich mit der Expressionsregulation von c-fos und c-myc in humanen Muskelzellen befassten, wählten dabei ein multifaktorielles Stimulanz (Serum / PARKES et al., 1991; SHI et al., 1993).

Eine vergleichende Analyse der Modulationseigenschaften der beiden homodimeren PDGF Isotypen (AA / BB) auf die Expression von c-fos und c-myc in primärkultivierten humanen glatten Muskelzellen wie in dieser Arbeit wurde bislang noch nicht beschrieben.

Die mitogene Wirkung der gewählten Faktoren (PDGF-AA / -BB) wurde in dieser Studie durch die Zellpopulationsvermehrung der Zelllinien in Reaktion auf diese Stimuli nachgewiesen. Diese Versuche zeigten, dass das Homodimer BB eine stärkere Stimulationsaktivität im Vergleich zum PDGF-AA Isotyp bewirkt, ein Effekt, der bereits aus anderen Studien bekannt ist. Die Ursache dieser unterschiedlichen Induktionsintensität der PDGF-Isotypen auf die zelluläre Proliferation wird auf ein divergierendes Aktivierungspotential der beiden Homodimere (AA / BB) auf die MAP Kinase, die als Signaltransduktor der extrazellulären PDGF-Stimulation in der intrazellulären Signalweiterleitung fungiert, zurückgeführt (JIANG et al., 1996). Die Begründung hierfür könnte in einem unterschiedlichen Maß der Stimulationseigenschaften der PDGF-Isotypen auf die Autophosphorylierung der PDGF-Rezeptoren liegen (SACHINIDIS et al., 1993).

Die Expressionsuntersuchungen dieser Arbeit zeigten eine positive Modulationskapazität der homodimeren Isotypen des Wachstumsfaktors PDGF auf die Kandidatengene:

- ❖ Für das **Proto-oncogen c-fos** wurde ein Expressionsprofil beobachtet, wie es typischerweise für IEGs beschrieben wird: keine Expression nach Arretierung in der G₀-Phase, mitogenabhängige transiente Transkriptionsaktivität in der G₁ Phase (COCHRAN et al., 1983; LAU und NATHANS, 1987).

Publizierten Daten zur Folge zeigt die c-fos Expression unter Serumstimulation in kultivierten Tierzellen eine schnelle und kurze Transkriptionsantwort mit einem Expressionsmaximum nach 30 Minuten und einer Nivellierung auf die Nulllinie nach ungefähr ein bis zwei Stunden (CURRAN et al., 1985; GADEAU et al., 1991; SACHINIDIS et al., 1993). Diese Ergebnisse der schnellen Induktion und Gegenregulation der c-fos Expression stehen im Einklang mit den Resultaten dieser Arbeit nach **PDGF-AA** Stimulation. Jedoch trat die Stimulationsantwort in den humanen glatten Muskelzellen verzögert ein (Expressionsmaximum: nach 60 Minuten, Expressionsnivellierung: nach zwei bis sechs Stunden).

Die Untersuchungen unter **PDGF-BB** Stimulierung zeigten keinen deutlich definierten monophasischen transienten Kurvenverlauf der c-fos Expression. Ferner war die Expressionsintensität im Vergleich zu den Messreihen unter PDGF-AA Aktivierung geringer.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von SACHINIDIS und Mitarbeitern (1993), die für mediale Rattenmuskelzellen (Aorta) im *in vitro* Modell ein vergleichbares Expressionsprofil unter Stimulation mit den drei verschiedenen PDGF-Isotypen (AA / AB / BB) beschrieben. Ein Erklärungsansatz der abweichenden Resultate dieser Arbeit könnte sein, dass in den kultivierten humanen Muskelzellen nur eine begrenzte Anzahl PDGF-Rezeptoren des β -Subtyps exprimiert wurde und dadurch bedingt ein geringeres Induktionspotential der c-fos Expression resultierte. Dementsprechend stellt die unterschiedliche Expressionsstärke der PDGF-Rezeptorsubtypen eine weitere Modulationsmöglichkeit der PDGF vermittelten Signaltransduktionskette dar (JAWIEN et al., 1992; NEWBY und GEORGE, 1993; WILCOX, 1993).

Unterschiede in der Intensität der c-fos Expression innerhalb der untersuchten Fallgruppe erlaubten keine Korrelation mit dem Lebensalter der Gewebespende (46 – 79 Jahre). Ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen Parametern müsste jedoch an einer größeren Stichprobe primärkultivierter humaner Muskelzellen überprüft werden, da aus *in vitro* Studien mit tierischen Zellen bekannt ist, dass ein altersabhängiger Anstieg der c-fos Expression auftritt (RIVARD und ANDRES, 2000).

- ❖ Die Ergebnisse der mitogenabhängigen Expressionsmodulation des **Proto-oncogens c-myc** zeigten weder unter **PDGF-AA** noch unter **PDGF-BB** Stimulation ein definiertes transientes Expressionsprofil.

Beide PDGF Homodimerisotypen induzierten eine schwache jedoch lang anhaltende Expressionsstimulation (über 24 Stunden) des c-myc Gens.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen, die mit anderen Zelllinien (Fibroblasten, Tierzellen) unter Serumstimulation gewonnen wurden (u.a. KELLY et al., 1983; DEAN et al., 1986; KINDY und SONNENSCHN, 1986; CAMPAN et al., 1992). Interessant in diesem Zusammenhang ist das Postulat von KINDY und Mitarbeitern (1986), nach dem der Anstieg der c-myc Konzentration nach Serumstimulation nicht auf eine Expressionsmodulation sondern vielmehr auf eine Stabilisierung der normalerweise sehr labilen c-myc mRNA zurückzuführen ist. Dieser Mechanismus im Rahmen der komplexen

Regulation der c-myc Genexpression wird auch von anderen Autoren diskutiert (HANN et al., 1985; DEAN et al., 1986).

Die erzielten Expressionsdaten erlauben den Rückschluss, dass das Proto-oncogen c-myc unter PDGF-AA bzw. -BB Stimulation im *in vitro* System nicht nur für die Induktion der Zellen von dem "ruhenden" in den "aktiven" Zustand (G_0 zu G_1) zu Beginn des Zellzyklus benötigt wird, sondern ferner für die Aufrechterhaltung des aktiven Zellzykluszustandes verantwortlich ist. Entsprechende Hypothesen bezüglich der Funktion des Transkriptionsfaktors c-myc wurden in verschiedenen Publikationen aufgestellt (u.a. CAMPAN et al., 1992; GOLJA et al., 1995; DESBARATS et al., 1996). Speziell konnte gezeigt werden, dass c-myc an der Dedifferenzierung des Phänotyps vaskulärer glatter Muskelzellen (kontraktiler Typ zum synthetischen Typ) beteiligt ist (PARKES et al., 1991; BENNETT et al., 1994).

Gegensätzliche Daten bezüglich des c-myc Expressionsprofils publizierten SHI und Mitarbeiter (1993) für humane glatte Muskelzellen (Ausgangsgewebe: Vena saphena magna) unter Serumstimulation. Hier wurde eine eindeutige "Ja-Nein-Antwort" der c-myc Transkriptionsaktivität beobachtet: keine c-myc Expression der arretierten Zellen in der G_0 -Phase, starke c-myc Expression unter Serumstimulation über 24 Stunden (Maximum bei vier Stunden). Die Ursache des divergierenden Resultats kann mit der Verwendung eines anderen Stimulationsfaktors begründet werden, der auf Grund seiner multifaktoriellen Zusammensetzung ein anderes c-myc Expressionsmuster im Vergleich zu den PDGF-Isotypen induziert. Ferner können Unterschiede in der Gewebepräparation, Zellkultivierung sowie Nachweistchnik der Expressionsverhältnisse die Ursache der abweichenden Ergebnisse sein.

5.2.3 C-fos und c-myc: Geeignete Targets für gentherapeutische Interventionen?

Die Entwicklung gentherapeutischer Behandlungsstrategien im Bereich der proliferativen kardiovaskulären Erkrankungen hat in den vergangenen zehn Jahren enorme Fortschritte gemacht.

Der Einsatz von modifizierten sequenzspezifischen Antisense Oligonukleotiden (Phosphorthioat-Modifikation (P-S) / COLMAN, 1990), die sich gegen Targets der Signaltransduktionskette richten, stellen eine vielversprechende Maßnahme dar. Insbesondere nukleäre Zielgene (IEGs),

die für die abschließende Umsetzung eines extrazellulären Signals verantwortlich sind, standen bislang im Fokus von Antisense Studien (u.a. NABEL, 1995; SCHWARTZ und MOAWAD, 1997; MULLER, 1997; REIS und SKLADANY, 1999; LEE et al., 1999; RUPP und MAISCH, 1999).

In diesem Zusammenhang wurden auch die Gene c-fos und c-myc auf Grund ihrer Eigenschaften im Zuge der Proliferationsaktivierung als Kandidaten für Antisense Behandlungen von Vaskulopathien analysiert.

Für das Proto-oncogen c-myc konnte bereits in verschiedenen *in vitro* Modellsystemen (u.a. EBBECKE et al., 1992; SHI et al., 1993; BENNETT et al., 1994) sowie Tiermodellstudien gezeigt werden, dass ein inhibitorischer Effekt auf die zelluläre Proliferation durch die Gabe von c-myc Antisense Oligonukleotiden bewirkt werden kann (BENNETT et al., 1994, 1997; SHI et al., 1994). Diese Wirkung konnte auch bei c-fos Antisense Behandlungen beobachtet werden (u.a. NISHIKURA und MURRAY, 1987; SUGGS et al., 1999).

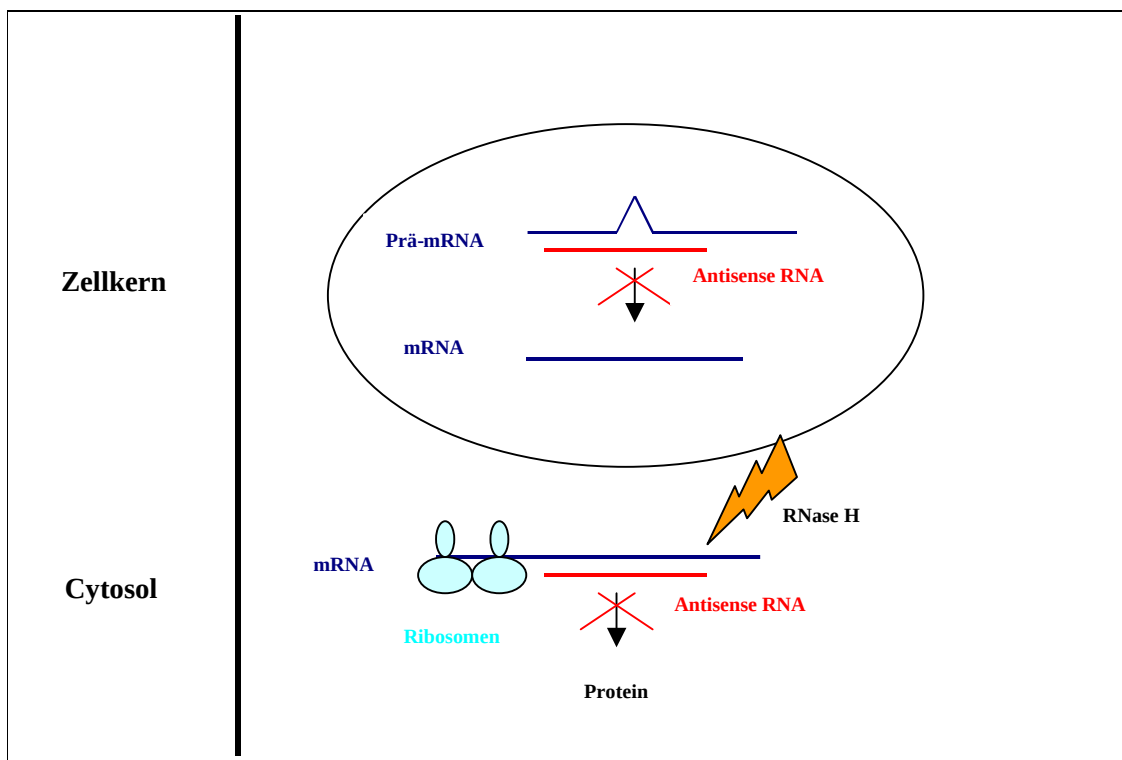


Abb. 5.2 Mögliche Mechanismen der Antisense Wirkung (nach COLMAN, 1990).

Inhibition der Zielgenexpression durch: (a) Hemmung der Prozessierung der Prä-mRNA im Zellkern, (b) Hemmung der Bindung der Ribosomen an die mRNA, (c) Abbau der mRNA durch RNase H im "doppelsträngigen" Bereich.

Hervorzuheben ist, dass die Ergebnisse der Antisense Studien kontrovers diskutiert werden, da die Mechanismen der Antisense Wirkung bis heute nicht vollständig verstanden sind (Abb. 5.2./COLMAN, 1990; NELLEN und LICHTENSTEIN, 1993). Bekannt ist jedoch, dass Antisense Oligonukleotide unspezifische Reaktionen induzieren können (BENNETT und SCHWARTZ, 1995; STEIN, 1995; LEE et al., 1999).

Speziell für c-myc Antisense Oligonukleotide konnten unspezifische Wirkungen gezeigt werden. BURGES und Mitarbeiter (1995) führen z.B. die beobachtete Inhibition der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (*in vitro* System, Tiermodellsystem) nach c-myc Antisense Gabe auf einen unspezifischen Effekt zurück, der durch ein Guanosin-Quartett in der Antisense Sequenz induziert werden soll.

Weiterhin werden inhibitorische Effekte Phosphorthioat-modifizierter Oligonukleotide auf Grund sequenzunspezifischer Wechselwirkungen mit Heparin-bindenden Proteinen (z.B. PDGF) diskutiert (LEE et al., 1999).

Entscheidend für den Erfolg gentherapeutischer Interventionen ist die Inhibition mehrerer Zielgene bzw. -gruppen, die an der multifaktoriellen Steuerung der pathogenen Aktivierung der zellulären Proliferation beteiligt sind.

Durch den Einsatz von Antisense Oligonukleotiden gegen einzelne nukleäre Transkriptionsfaktoren, wie c-myc und c-fos, kommt es jedoch nur zur Expressionsinhibition einer Gruppe von Zielgenen, die durch diesen Faktor moduliert werden. Effektiver ist daher der Einsatz von Kombinationspräparaten, die verschiedene spezifische Antisense Oligonukleotide beinhalten (z.B. PCNA und cdc-2 / MULLER et al., 1997).

Eine andere Strategie zur gemeinsamen Inaktivierung mehrerer Gengruppen bietet die gezielte Inhibition von Komponenten, die am Anfang der Signaltransduktionskette orientiert sind. Geeignete Kandidatengene bilden dabei Membranrezeptoren (c-fms, c-erb) sowie intrazelluläre Signaltransduktoren (z.B. c-src, c-abl, c-raf / MULLER, 1997).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die pathomorphologische Veränderung der Gefäßanatomie im Verlauf der aortokoronaren "Bypass graft disease" an Hand histologischer Präparate explantierter humaner venöser Bypass-Läsionen analysiert.

Der progrediente Umbau der Bypass-Architektur konnte in verschiedene Stadien untergliedert werden, gekennzeichnet durch histologische Merkmale, welche die Grundlage für die Definition eines histomorphologischen Klassifizierungsschemas für Bypass-Läsionen (Typ I – Typ III) bildeten. Durch den Entwurf dieser Nomenklatur, die zuvor nicht für Bypass-Läsionen vorlag, ist erstmalig die Möglichkeit geschaffen histologische Befunde, z.B. aus immunhistologischen Studien, in Korrelation mit den verschiedenen Stadien der "Bypass graft disease" zu bewerten.

Morphometrische Analysen dieser Arbeit zeigten, dass die Fläche der Neointima und Media im Verlauf der progressiven pathologischen Umgestaltung der Bypass-Architektur (Typ I zu Typ III) deutlich zunimmt. Native Venen (Kontrollgruppe) zeigten bei der Flächenquantifizierung im Vergleich zu den Bypässen eine geringere Intima- jedoch eine größere Mediafläche. Bestimmungen der Zelldichte dokumentierten eine deutlich größere Zellzahl in allen Gefäßwandschichten (Neointima, Media, Adventitia) der Bypass-Läsionen bei der Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe, wobei im Verlauf der "Bypass graft disease" (Typ I zu Typ III) eine Abnahme der Zelldichte zu beobachten war.

Erstmalig durchgeführte Untersuchungen zur Detektion der Proliferationsaktivität in Bypass-Läsionen im Vergleich zu nativen Gefäßen präsentierten eine deutlich höhere zelluläre Proliferation in humanen aortokoronaren Bypass-Präparaten, die am stärksten in "komplexen Läsionen" (Typ III) ausgeprägt war. Proliferative Ereignisse konnten topographisch mit dem Auftreten von Versorgungsgefäßen (Neointima, Media, Adventitia) und "lipidreichen" Arealen in der Gefäßanatomie (Neointima) korreliert werden. Als "aktivierte" Zelltypen wurden Endothelzellen, Muskelzellen, nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen, Makrophagen sowie T-Lymphozyten charakterisiert. In den nativen Kontrollvenen und "frühen" Bypass-Läsionen (Typ I und II) nahmen Endothelzellen den Hauptanteil des proliferierenden Gefäßzelltyps ein, hingegen in den Typ III Läsionen nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen.

Expressionsstudien im *in vitro* Zellkulturmodellsystem charakterisierten die homodimeren Isotypen (AA / BB) des Wachstumsfaktors PDGF als Stimulatoren der Transkriptionsfaktoren c-fos und c-myc in primärkultivierten humanen Muskelzellen der Aorta. Das Verständnis der differentiellen Expressionsregulation dieser Kandidatengene ist im Zusammenhang mit der

Entwicklung gentherapeutischer Strategien zur Intervention kardiovaskulärer Verschlusskrankheiten von entscheidender Bedeutung.

7. Literatur

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR.

Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5350-4.

Aschoff L.

Die Arteriosklerose.

Medizin Klinik. 1930; (suppl 1): 1-20.

Aschoff L.

Introduction. In: Cowdry EV, ed Arteriosclerosis: A survey of the problem.

New York, NY: Macmillan Publishing Co; 1933: 1-18.

Angelini GD, Newby AC.

The future of saphenous vein as a coronary artery bypass conduit.

Eur Heart J. 1989 Mar;10(3):273-80.

Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L.

Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease.

Circulation. 1993 Mar;87(3 Suppl):II3-16.

Barboriak JJ, Pintar K, Korns ME.

Atherosclerosis in aortocoronary vein grafts.

Lancet. 1974 Sep 14;2(7881):621-4.

Bauters C, de Groote P, Adamantidis M, Delcayre C, Hamon M, Lablanche JM, Bertrand ME, Dupuis B, Swynghedauw B.

Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty?

Eur Heart J. 1992 Apr;13(4):556-9.

Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, Jagoe R, Newby AC, Evan GI.

Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodeoxynucleotides.

J Clin Invest. 1994 Feb;93(2):820-8.

Bennett MR, Schwartz SM.

Antisense therapy for angioplasty restenosis. Some critical considerations.

Circulation. 1995 Oct 1;92(7):1981-93.

Bennett MR, Lindner V, DeBlois D, Reidy MA, Schwartz SM.

Effect of phosphorothioated oligonucleotides on neointima formation in the rat carotid artery.

Dissecting the mechanism of action.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Nov;17(11):2326-32.

Bernard C, Szekely B, Philip I, Wollman E, Payen D, Tedgui A.

Activated macrophages depress the contractility of rabbit carotids via an L-arginine/nitric oxide-dependent effector mechanism. Connection with amplified cytokine release.

J Clin Invest. 1992 Mar;89(3):851-60.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Bonthron DT, Morton CC, Orkin SH, Collins T.

Platelet-derived growth factor A chain: gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Mar;85(5):1492-6.

Brandl R, Richter T, Haug K, Wilhelm MG, Maurer PC, Nathrath W.

Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67.
Circulation. 1997 Nov 18;96(10):3360-8.

Brown DC, Gatter KC.

Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology.
Histopathology. 1990 Dec;17(6):489-503.

Bryan AJ, Angelini GD.

The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention.
Curr Opin Cardiol 1994 Nov;9(6):641-9.

Bulkley BH, Hutchins GM.

Accelerated "atherosclerosis". A morphologic study of 97 saphenous vein coronary artery bypass grafts.
Circulation. 1977 Jan;55(1):163-9.

Bulkley BH.

The reperfusion injury of cardiac operation: separating myths from realities.
Ann Thorac Surg. 1980 Aug;30(2):103-5.

Burges TL, Fisher EF, Ross SL, Bready JV, Qian YX, Bayewitch LA, Cohen AM, Herrera CJ, Hu SSF, Kramer TB.

The antiproliferative activity of c-myc and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by nonantisense mechanism.
Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:4051-4055.

Campan M, Desgranges C, Gadeau AP, Millet D, Belloc F.

Cell cycle dependent gene expression in quiescent stimulated and asynchronously cycling arterial smooth muscle cells in culture.
J Cell Physiol. 1992 Mar;150(3):493-500.

Campbell JH, Campbell GR.

Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle.
Clin Sci (Colch). 1993 Nov;85(5):501-13.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J.

Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.
J Pathol. 1992 Dec;168(4):357-63.

Cecil FE, Cole DM, Philbin R, Jarmie N, Brown RE.

Reaction $2\text{H}(3\text{He}, \gamma) 5\text{Li}$ at center-of-mass energies between 25 and 60 keV.
Phys Rev C Nucl Phys. 1985 Sep;32(3):690-693.

Celis JE, Celis A.

Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 May;82(10):3262-6.

Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.

The smooth muscle cell in culture.
Physiol Rev. 1979 Jan;59(1):1-61. Review.

Chirgwin J, Przybyla A, Mc Donald R, Ruttler W.

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry. 1979;18:5294-99.

Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM.

Mechanisms of stenosis after arterial injury.
Lab Invest. 1983 Aug;49(2):208-15.

Clowes EJ, Williams IH, Baracos VE, Pluske JR, Cegielski AC, Zak LJ, Aherne FX.

Feeding lactating primiparous sows to establish three divergent metabolic states: II. Effect on nitrogen partitioning and skeletal muscle composition.
J Anim Sci. 1998 Apr;76(4):1154-64.

Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD.

Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor.
Cell. 1983 Jul;33(3):939-47.

Cochran BH, Zullo J, Verma IM, Stiles CD.

Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor.
Science. 1984 Nov 30;226(4678):1080-2.

Colby WW, Chen EY, Smith DH, Levinson AD.

Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29.
Nature 1983;301:722-725.

Colman A.

Antisense strategies in cell and developmental biology.
J Cell Sci. 1990 Nov;97 (Pt 3):399-409.

Curran T, Bravo R, Muller R.

Transient induction of c-fos and c-myc in an immediate consequence of growth factor stimulation.
Cancer Surv. 1985;4(4):655-81.

Dartsch PC, Voisard R, Bauriedel G, Hofling B, Betz E.

Growth characteristics and cytoskeletal organization of cultured smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions.
Arteriosclerosis. 1990 Jan-Feb;10(1):62-75.

Davies MG, Hagen PO.

Pathophysiology of vein graft failure: a review.
Eur J Vasc Endovasc Surg. 1995 Jan;9(1):7-18.

Dean M, Levine RA, Ran W, Kindy MS, Sonenshein GE, Campisi J.

Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact.
J Biol Chem. 1986 Jul 15;261(20):9161-6.

Desbarats L, Schneider A, Muller D, Burgin A, Eilers M.

Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells.
Experientia. 1996 Dec 15;52(12):1123-9.

Deng MC, Plenz G, Erren M, Wilhelm MJ, Moennig G, Rothenburger M, Baba HA.

Transplant vasculopathy: a model for coronary artery disease?
Herz. 2000 Mar;25(2):95-9.

Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ.

A review of the histologic changes in vein-to-artery grafts, with particular reference to intimal hyperplasia.
Arch Surg. 1988 Jun;123(6):691-6.

Drozdo V, Pledger WJ.

Cellular response to platelet-derived growth factor (PDGF)-AB after down-regulation of PDGF alpha-receptors. Evidence that functional binding does not require alpha-receptors.
J Biol Chem. 1991 Sep 15;266(26):17165-72.

Dunn JJ, Studier FW.

Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements.
J Mol Biol. 1983 Jun 5;166(4):477-535.

Ebbecke M, Unterberg C, Buchwald A, Stohr S, Wiegand V.

Antiproliferative effects of a c-myc antisense oligonucleotide on human arterial smooth muscle cells.
Basic Res Cardiol. 1992 Nov-Dec;87(6):585-91.

Eickbush TH, Moudrianakis EN.

The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids.
Cell. 1978 Feb;13(2):295-306.

Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M.

Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene.
J Biol Chem. 1988 Oct; 263(30):15335-15341.

Fallier-Backer P, Rupp J, Betz E.

Smooth muscle cells from rabbit aorta.
In: Cell culture techniques in heart and vessel research.
Piper, H. M., Hrsg.; Springer-Verlag, Berlin. 1990.

Freytag SO.

Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1.
Mol Cell Biol. 1988 Apr;8(4):1614-24.

Fujita H, Shimokado K, Yutani C, Takaichi S, Masuda J, Ogata J.

Human neonatal and adult vascular smooth muscle cells in culture.
Exp Mol Pathol. 1993 Feb;58(1):25-39.

Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.

Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts.
Circulation. 1990 Sep;82(3 Suppl):II47-59.

Gadeau AP, Campan M, Desgranges C.

Induction of cell cycle-dependent genes during cell cycle progression of arterial smooth muscle cells in culture.
J Cell Physiol. 1991 Mar;146(3):356-61.

Galea J, Armstrong J, Francis SE, Cooper G, Crossman DC, Holt CM.

Alterations in c-fos expression, cell proliferation and apoptosis in pressure distended human saphenous vein.
Cardiovasc Res. 1999 Nov;44(2):436-48.

Gelb AB, Kamel OW, LeBrun DP, Warnke RA.

Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using two anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies. Factors affecting reactivity.
Am J Pathol. 1992 Dec;141(6):1453-8.

- Gentile AT, Mills JL, Westerband A, Gooden MA, Berman SS, Boswell CA, Williams SK.**
Characterization of cellular density and determination of neointimal extracellular matrix constituents in human lower extremity vein graft stenoses.
Cardiovasc Surg. 1999 Jun;7(4):464-9.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H.**
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.
J Immunol. 1984 Oct;133(4):1710-5.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.**
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.
Int J Cancer. 1983 Jan 15;31(1):13-20.
- Gibbons GH, Dzau VJ.**
The emerging concept of vascular remodeling.
N Engl J Med. 1994 May 19;330(20):1431-8. Review.
- Gibbons GH.**
The pathogenesis of graft vascular disease: implications of vascular remodeling.
J Heart Lung Transplant. 1995 Nov-Dec;14(6 Pt 2):S149-58.
- Gimbrone MA Jr, Cotran RS.**
Human vascular smooth muscle in culture. Growth and ultrastructure.
Lab Invest. 1975 Jul;33(1):16-27.
- Golja AM, Rodino W, Panetta TF.**
Insight into atherosclerosis: a review of c-myc and the vascular smooth muscle cell.
Cell Mol Biol Res. 1995;41(6):487-99.
- Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM.**
Cell proliferation in human coronary arteries.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4600-4.
- Gore I, Tejada C.**
The quantitative appraisal of atherosclerosis.
Am J Pathol. 1957; 33: 875-885.
- Grondin CM, Campeau L, Thornton JC, Engle JC, Cross FS, Schreiber H.**
Coronary artery bypass grafting with saphenous vein.
Circulation. 1989 Jun;79(6 Pt 2):I24-9.
- Haerslev T, Jacobsen GK.**
Microwave processing for immunohistochemical demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue.
APMIS. 1994 May;102(5):395-400.
- Hall PA, Levison DA.**
Review: assessment of cell proliferation in histological material.
J Clin Pathol. 1990 Mar;43(3):184-92.
- Hann SR, Thompson CB, Eisenman RN.**
c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells.
Nature. 1985 Mar 28-Apr 3;314(6009):366-9.
- Heldin CH, Backstrom G, Ostman A, Hammacher A, Ronnstrand L, Rubin K, Nister M, Westermark B.**
Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types.
EMBO J. 1988 May;7(5):1387-93.

Hilker M, Tellmann G, Buerke M, Gloger K, Moersig W, Oelert H, Hake U, Lehr HA.

Proliferation in aortocoronary bypass grafts.

Path Res Prac. Eingereicht, 2001 a.

Hilker M, Tellmann G, Buerke M, Moersig W, Oelert H, Lehr HA, Hake U.

Expression of the proto-oncogene c-myc in human stenotic aortocoronary bypass grafts.

Cardiovasc Path. Eingereicht, 2001 b.

Hofstra L, Tordoir JH, Kitslaar PJ, Hoeks AP, Daemen MJ.

Enhanced cellular proliferation in intact stenotic lesions derived from human arteriovenous fistulas and peripheral bypass grafts. Does it correlate with flow parameters?

Circulation. 1996 Sep 15;94(6):1283-90.

Holman RL, McGill HC Jr, Strong JP, Geer, JC.

Techniques for studying atherosclerotic lesions.

Lab Invest. 1958; 7: 42-47.

Holtgen R, Krijne R, Heinrich KW, Sons H, Krian A.

Internal mammary artery bypass grafting in left main stenosis.

Cardiology. 1993;82(5):343-6.

Isner JM.

Vascular remodeling. Honey, I think I shrunk the artery.

Circulation. 1994 Jun;89(6):2937-41.

Jawien A, Bowen-Pope DE, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW.

Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.

J Clin Invest. 1992 Feb;89(2):507-11.

Jiang B, Yamamura S, Nelson PR, Mureebe L, Kent KC.

Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways.

Surgery. 1996 Aug;120(2):427-31; discussion 432.

Kalan JM, Roberts WC.

Morphologic findings in saphenous veins used as coronary arterial bypass conduits for longer than 1 year: necropsy analysis of 53 patients, 123 saphenous veins, and 1865 five-millimeter segments of veins.

Am Heart J. 1990 May;119(5):1164-84.

Kassavetis GA, Butler ET, Roulland D, Chamberlin MJ.

Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. II. Mapping of SP6 DNA and selective in vitro transcription.

J Biol Chem. 1982 May 25;257(10):5779-88.

Kato GJ, Dang CV.

Function of the c-Myc oncoprotein.

FASEB J. 1992 Sep;6(12):3065-72.

Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM.

Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults.

Am J Pathol. 1993 Jun;142(6):1787-93.

Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P.

Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor.

Cell. 1983 Dec;35(3 Pt 2):603-10.

Kelman Z.

PCNA: structure, functions and interactions.
Oncogene. 1997 Feb 13;14(6):629-40.

Kindy MS, Sonenshein GE.

Regulation of oncogene expression in cultured aortic smooth muscle cells. Post-transcriptional control of c-myc mRNA.
J Biol Chem. 1986 Sep 25;261(27):12865-8.

Knoche H.

Leitfaden der histologischen Technik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 1979.

Kockx MM, De Meyer GRY, Bortier H, de Meyere N, Muhring J, Bakker A, Jacob W, VanVaeck L, Herman A.

Luminal foam cell accumulation is associated with smooth muscle cell death in the intimal thickening of human saphenous vein grafts.
Circulation. 1996;94:1255-1262.

Kuzuya M, Satake S, Esaki T, Yamada K, Hayashi T, Naito M, Asai K, Iguchi A.

Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque.
J Cell Physiol. 1995 Sep;164(3):658-67.

Lau LF, Nathans D.

Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Mar;84(5):1182-6.

Lee M, Simon AD, Stein CA, Rabbani LE.

Antisense strategies to inhibit restenosis.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1999 Oct;9(5):487-92.

Lehr HA, Hansen KD, Coltrera MD, Russ JC, Gown AM.

Photoshop-based image analysis for the semiautomated assessment of Ki-67-defined proliferative activity in the routine diagnosis of breast cancer.
Appl Immunohistchem 1996; 4(2): 117-127.

Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM.

Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer.
J Histochem Cytochem. 1997 Nov;45(11):1559-65.

Lewis MR, Dehmer GJ.

Coronary bypass using the internal mammary artery.
Am J Cardiol. 1985 Sep 1;56(7):480-2.

Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ.

Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation.
Am J Clin Pathol. 1992 May;97(5 Suppl 1):S4-13.

Marek JM, Koehler C, Aguirre ML, Westerband A, Gentile AT, Mills JL, Hunter GC.

The histologic characteristics of primary and restenotic carotid plaque.
J Surg Res. 1998 Jan;74(1):27-33.

Marin ML, Gordon RE, Veith FJ, Tulchin N, Panetta TF.

Distribution of c-myc oncoprotein in healthy and atherosclerotic human carotid arteries.
J Vasc Surg. 1993 Aug;18(2):170-6; discussion 176-7.

Mason JT, O'Leary TJ.

Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation.
J Histochem Cytochem. 1991 Feb;39(2):225-9.

Meichle A, Philipp A, Eilers M.

The functions of Myc proteins.
Biochim Biophys Acta. 1992 Dec 16;1114(2-3):129-46.

Miano JM, Tota RR, Vlasic N, Danishefsky KJ, Stemerman MB.

Early proto-oncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal.
Am J Pathol. 1990 Oct;137(4):761-5.

Mills NL, Everson CT.

Vein graft failure.
Curr Opin Cardiol. 1995 Nov;10(6):562-8.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM.

Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.
J Immunol. 1978 Dec;121(6):2228-34.

Morris GF, Mathews MB.

Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle.
J Biol Chem. 1989 Aug 15;264(23):13856-64.

Motwani JG, Topol EJ.

Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention.
Circulation. 1998 Mar 10;97(9):916-31.

Muller DW.

The role of proto-oncogenes in coronary restenosis.
Prog Cardiovasc Dis. 1997 Sep-Oct;40(2):117-28.

Nabel EG.

Gene therapy for cardiovascular disease.
Circulation. 1995 Jan 15;91(2):541-8.

Neitzel GF, Barboriak JJ, Pintar K, Qureshi I.

Atherosclerosis in aortocoronary bypass grafts. Morphologic study and risk factor analysis 6 to 12 years after surgery.
Arteriosclerosis. 1986 Nov-Dec;6(6):594-600.

Nellen W, Lichtenstein C.

What makes an mRNA anti-sense-itive?
Trends Biochem Sci. 1993 Nov;18(11):419-23.

Newby AC, George SJ.

Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies.
Cardiovasc Res. 1993 Jul;27(7):1173-83.

Newby AC, George SJ.

Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis.
Curr Opin Cardiol. 1996 Nov;11(6):574-82.

Newby AC.

Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions.
Coron Artery Dis. 1997 Mar-Apr;8(3-4):213-24.

Nishikura K, Murray JM.

Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells.
Mol Cell Biol. 1987 Feb;7(2):639-49.

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. 1993 Aug;73(2):223-31.

O'Brien ER, Schwartz SM.

Update on the biology and clinical study of restenosis.
TCM. 1994;4(4):169-178).

O'Brien JE Jr, Shi Y, Fard A, Bauer T, Zalewski A, Mannion JD.

Wound healing around and within saphenous vein bypass grafts.
J Thorac Cardiovasc Surg. 1997 Jul;114(1):38-45.

Orekhov AN, Andreeva ER, Mikhailova IA, Gordon D.

Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions.
Atherosclerosis. 1998 Jul;139(1):41-8.

Panetta TF, Marin ML, Veith FJ, Goldsmith J, Gordon RE, Jones AM, Schwartz ML, Gupta SK, Wengerter KR.

Unsuspected preexisting saphenous vein disease: an unrecognized cause of vein bypass failure.
J Vasc Surg. 1992 Jan;15(1):102-10; discussion 110-2.

Parkes JL, Cardell RR, Hubbard FC Jr, Hubbard D, Meltzer A, Penn A.

Cultured human atherosclerotic plaque smooth muscle cells retain transforming potential and display enhanced expression of the myc protooncogene.
Am J Pathol. 1991 Mar;138(3):765-75.

Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM.

Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization.
J Clin Invest. 1993; 91: 1469-1480.

Piechaczyk M, Blanchard JM.

c-fos proto-oncogene regulation and function.
Crit Rev Oncol Hematol. 1994 Oct;17(2):93-131.

Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B.

Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods.
J Pathol. 1997 Sep;183(1):116-23.

Popma JJ, Califf RM, Topol EJ.

Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty.
Circulation. 1991 Sep;84(3):1426-36.

Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J.

A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine.
Cell. 1987 Sep 11;50(6):831-40.

Raines EW, Ross R.

Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis.
Br Heart J. 1993 Jan;69(1 Suppl):S30-7.

Ramirez JA, Sanchez LA, Marin ML, Lyon RT, Parsons RE, Suggs WD, Veith FJ.

c-MYC oncoprotein production in experimental vein graft intimal hyperplasia.
J Surg Res. 1996 Mar;61(2):323-9.

Rao CD, Igrashi H, Chiu IM, Robbins KC, Aronson SA.

Structure and sequence of human 2 (sis/PDGF) transcriptional unit.
PNAS 1986;83: 2392-2396.

Ratliff NB, Myles JL.

Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts. Possible immune-mediated disease.
Arch Pathol Lab Med. 1989 Jul;113(7):772-6.

Reis ED, Skladany M.

Update on gene therapy for intimal hyperplasia.
Bratisl Lek Listy. 1999 Aug;100(8):417-21.

Rekhter MD, Gordon D.

Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques.
Am J Pathol. 1995 Sep;147(3):668-77.

Rivard A, Andres V.

Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases.
Histol Histopathol. 2000 Apr;15(2):557-71.

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L.

A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Apr;71(4):1207-10.

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis-an update.
N Engl J Med. 1986 Feb 20;314(8):488-500.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF.

The biology of platelet-derived growth factor.
Cell. 1986 July 18;46:155-169.

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

Rupp H, Maisch B.

Control of apoptosis of cardiovascular fibroblasts: a novel drug target.
Herz. 1999 May;24(3):225-31.

Sachinidis A, Schulte K, Ko Y, Meyer zu Brickwedde MK, Hoppe V, Hoppe J, Vetter H.

The induction of early response genes in rat smooth muscle cells by PDGF-AA is not sufficient to stimulate DNA-synthesis.
FEBS Lett. 1993 Mar 22;319(3):221-4.

Safian RD, Gelbfish JS, Erny RE, Schnitt SJ, Schmidt DA, Baim DS.

Coronary atherectomy. Clinical, angiographic, and histological findings and observations regarding potential mechanisms.
Circulation. 1990 Jul;82(1):69-79.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.

Molecular cloning – A laboratory manual, 2 nd. Edition.

Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Schwartz LB, Moawad J.

Gene therapy for vascular disease.

Ann Vasc Surg. 1997;11:189 –199.

Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH.

Replication of smooth muscle cells in vascular disease.

Circ Res. 1986 Apr;58(4):427-44.

Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW.

Developmental mechanisms underlying pathology of arteries.

Physiol Rev. 1990 Oct;70(4):1177-209.

Shi Y, Hutchinson HG, Hall DJ, Zalewski A.

Downregulation of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human smooth muscle cells.

Circulation. 1993 Sep;88(3):1190-5.

Shi Y, Fard A, Galeo A, Hutchinson HG, Vermani P, Dodge GR, Hall DJ, Shaheen F, Zalewski A.

Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury.

Circulation. 1994 Aug;90(2):944-51.

Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A.

Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries.

Circulation. 1996 Oct 1;94(7):1655-64.

Shi Y, O'Brien JE Jr, Mannion JD, Morrison RC, Chung W, Fard A, Zalewski A.

Remodeling of autologous saphenous vein grafts. The role of perivascular myofibroblasts.

Circulation. 1997 Jun 17;95(12):2684-93.

Soyombo AA, Angelini GD, Bryan AJ, Jasani B, Newby AC.

Intimal proliferation in an organ culture of human saphenous vein.

Am J Pathol. 1990 Dec;137(6):1401-10.

Stry HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld

ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al.

A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Circulation. 1992 Jan;85(1):391-405.

Stry HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.

A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Circulation. 1994 May;89(5):2462-78.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.

A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Circulation. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.

Stary HC.

Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1177-8.

Stein CA.

Does antisense exist?

Nat Med. 1995 Nov;1(11):1119-21.

Stiles CD, Capone GT, Scher CD, Antoniades HN, Van Wyk JJ, Pledger WJ.

Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Mar;76(3):1279-83.

Suggs WD, Olson SC, Madnani D, Patel S, Veith FJ, Mandani D.

Antisense oligonucleotides to c-fos and c-jun inhibit intimal thickening in a rat vein graft model.

Surgery. 1999 Aug;126(2):443-9.

Thiene G, Miazzi P, Valsecchi M, Valente M, Bortolotti U, Casarotto D, Gallucci V.

Histological survey of the saphenous vein before its use as autologous aortocoronary bypass graft.

Thorax. 1980 Jul;35(7):519-22.

Uni KK, Kottke BA, Titus JL, Frye RL, Wallace RB, Brown AL.

Pathologic changes in aortocoronary saphenous vein grafts.

Am J Cardiology. 1974 Oct;(34): 526-532.

van de Wal HJ, Hamilton DI, Godman MJ, Harinck E, Lacquet LK, van Oort A.

Pulmonary venous obstruction following correction for total anomalous pulmonary venous drainage: a challenge.

Eur J Cardiothorac Surg. 1992;6(10):545-9.

van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ.

Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells.

Cancer Res. 1989 Jun 1;49(11):2999-3006.

van Straaten F, Müller R, Currran T, van Beveren C, Verma IM.

Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 June;80:3183-3187.

Varty K, London NJ, Brennan JA, Ratliff DA, Bell PR.

Infragenicular in situ vein bypass graft occlusion: a multivariate risk factor analysis.

Eur J Vasc Surg. 1993 Sep;7(5):567-71.

Vlodaver Z, Edwards JE.

Pathologic changes in aortic-coronary arterial saphenous vein grafts.

Circulation. 1971 Oct;44(4):719-28.

Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P.

Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry.

Histochem Cell Biol. 1996 Apr;105(4):253-60.

Westerband A, Mills JL, Marek JM, Heimark RL, Hunter GC, Williams SK.

Immunocytochemical determination of cell type and proliferation rate in human vein graft stenoses.
J Vasc Surg. 1997 Jan;25(1):64-73.

Westerband A, Mills JL, Hunter GC, Gentile AT, Ihnat D, Heimark RL.

Topography of cell replication in human vein graft stenoses.
Circulation. 1998 Nov 10;98(19 Suppl):II325-9; discussion II329-30.

Wilcox JN.

Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention.
Am J Cardiol. 1993 Oct 18;72(13):88E-95E.

World Health Organization.

Classification of atherosclerotic lesions: report of a study.
WHO Techn Rep Ser. 1958; 143: 1-20.

8. Anhang

Code	Alter	Geschlecht	Risikofaktoren	Bypass-Art (Bypass- Orientierung)	Implantations- Dauer (Monate)
1/97	72	M	1*, 2*, 3 (-), 4*, 5 (+), 6 (-), 7 (-)	SV	48
2/97	79	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV	125
3/97	62	M	1*, 2*, 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (-), 7 (+)	SV	118
5/97	66	M	1 (+), 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (+), 6 (-), 7 (-)	IMA	54
6/97	58	M	1*, 2 (+), 3 (+), 4*, 5 (+), 6 (-), 7 (+)	SV	52
7/97	39	M	1 (+), 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (-), 6 (-), 7 (+)	SV (PLA)	29
8/97	39	M	1 (+), 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (-), 6 (-), 7 (+)	SV (RCA)	29
9/97	39	M	1 (+), 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (-), 6 (-), 7 (+)	SV (LAD)	29
11/97	72	M	1*, 2 (+), 3 (+), 4 (+/-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV (LCA)	8
12/97	61	M	1*, 2*, 3 (+), 4 (+), 5 (+), 6 (-), 7 (+)	SV	10
1/98	77	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV	91
2/98	77	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV	91
3/98	77	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (+/-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV	91
4/98	54	W	1 (+), 2 (-) 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (-), 7 (-)	IMA	130
5/98	54	W	1 (+), 2 (-) 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (-), 7 (-)	SV	130
6/98	82	M	1*, 2 (*), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV (PLA)	168
7/98	82	M	1*, 2 (*), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV (LCA)	168
8/98	82	M	1*, 2 (*), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV	168
9/98	58	M	1*, 2*, 3 (-), 4 (-), 5 (-), 6 (-), 7 (-)	SV	86
11/98	58	M	1*, 2*, 3 (-), 4 (-), 5 (-), 6 (-), 7 (-)	SV (LCA)	86
12/98	74	W	1*, 2 (-), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (+), 7 (+)	SV (LCA)	3
13/98	62	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (+), 5 (+), 6 (+), 7 (-)	SV (PLA)	96
15/98	73	M	1*, 2 (+), 3 (+), 4 (-), 5 (-), 6 (+), 7 (+)	SV (PLA)	126
16/98	72	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4*, 5 (+), 6*, 7 (-)	SV (LCA)	126
18/98	72	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4*, 5 (+), 6*, 7 (-)	SV (RCA)	126
19/98	68	M	1 (+), 2 (+), 3 (-), 4*, 5*, 6*, 7 (+)	SV (PLA)	126
20/98	67	M	1*, 2*, 3 (-), 4*, 5 (-), 6 (-), 7 (-)	SV (LCA)	125
21/98	67	M	1*, 2*, 3 (-), 4*, 5 (-), 6 (-), 7 (-)	SV (PLA)	125
22/98	64	M	1 (+), 2 (+), 3*, 4 (-), 5 (+), 6 (-), 7*	SV	61
23/98	60	M	1*, 2 (+), 3 (-), 4 (-), 5 (+), 6 (-), 7 (-)	SV	133

Tab. 3.1 Untersuchte humane aortokoronare Bypass-Läsionen.

Bypass-Art: VSM, IMA; Bypass-Orientierung: LCA (Left coronary artery), RCA (Right Coronary Artery), PLA (Posterolateral coronary artery); Geschlecht: W (weiblich), M (männlich); Risikofaktoren: (1) fam. Disposition, (2) Hypercholesterinämie, (3) Hyperfibrinämie, (4) Zigarettenabusus; (5) Hypertonie, (6) Diabetes, (7) Adipositas.

* keine Angaben, (+/-) Zigarettenabusus beendet.

Läsionstyp	Code	Histomorphologische Charakteristika	Thrombus
I	5/97*	B	-
	7/97	B	-
	8/97	A	2 a
	3/98	A	-
	4/98*	B	-
	5/98	B	2 b
	9/98	B	-
	12/98	A	1
	13/98	A	-
	20/98	A	2 b
II	1/97	a	-
	2/97	b	2 a
	9/97	a	-
	12/97	a	-
	1/98	b	2 a
	7/98	a	2 a
III	3/97	4	1
	6/97	1, 3, 5	1
	11/97	1, 6	2 b
	2/98	1, 3, 5	-
	6/98	1, 3, 6	-
	8/98	1, 5	-
	11/98	1, 3 (2 x), 5	1
	15/98	1, 5, 6	2 b
	16/98	4	1
	18/98	3 (2 x), 4, 5	-
	19/98	1, 2, 3, 4, 5	-
	21/98	1, 6	-
	22/98	4, 6	2 b
	23/98	1, 3	2 b

Tab. 4.2 Histomorphologische Klassifizierung der untersuchten Bypass-Läsionen (n = 30) .

Typ I Läsionen (n = 10): A: adaptive Neointimahyperplasie, B: progressive Neointimahyperplasie; Typ II Läsionen (n = 6): a: prominente fibröse Kappe, b: progressive fibröse Kappe; Typ III Läsionen (n = 14): 1: extrazelluläre Lipidansammlung, 2: Fibroatherom, 3: abgekapseltes Fibroatherom mit Cholesterinnadeln, 4: Kalzifikation, 5: nekrotische Geweberegionen (Akkumulation von Zelldetritus), 6: Einblutungen in die Coreregion.

Histomorphologische Thrombusbeschreibung: 1: frischer luminaler Thrombus; 2: organisierter Thrombus, der (a) eine relevante Gefäßverengung oder (b) einen Gefäßverschluss bewirkt.

Bei den mit * markierten Code-Nummern handelte es sich um arterielle Bypass-Läsionen (n = 2).

Code	Alter	Geschlecht	Läsionstyp / Intima	Läsionstyp / Media
1/97	74	M	0	0
2/97	72	M	1	0
3/97	73	M	1	2
4/97	67	W	0	2
5/97	73	M	0	2

Tab. 4.3 Histomorphologische Klassifizierung der untersuchten nativen nicht-implantierten Bypass-Gefäße.

Geschlecht: W (weiblich), M (männlich).

Definition der Klassifizierungstypen:

0: keine histomorphologischen Veränderungen; Intimale Fibrose, histomorphologisch manifestiert durch eine azelluläre bindegewebsartige Proliferation: (1) fokale Proliferation mit minimaler Lumenreduktion, (2) konzentrische Proliferation mit schwacher Lumenreduktion, (3) konzentrische Proliferation mit einer Lumenreduktion unter 50 %, (4) konzentrische Proliferation mit einer Lumenreduktion über 50%; Mediale Sklerose, die zu einer Reduktion des muskulären Anteils führt, die (1) minimal, (2) schwach, (3) moderat oder (4) stark ausgeprägt ist (Klassifizierungsschema nach Thiene et al., 1980).

L	Impl.	Fl (N)I	Fl ME	Fl AD	I:M R	LM
nV (n = 5)	*	1,0940 ($\pm$ 0,3934)	3,680 ($\pm$ 0,6128)	1,2640 ($\pm$ 0,2850)	0,3629 ($\pm$ 0,1169)	MW ($\pm$ SF)
	*	0,8800	3,0700	1,1100	0,4131	M
I (n = 10)	71,3 ($\pm$ 15,0)	2,4320 ($\pm$ 0,8221)	1,6710 ($\pm$ 0,2785)	3,2360 ($\pm$ 0,5465)	1,3550 ($\pm$ 0,755)	MW ($\pm$ SF)
	70,0	1,6100	1,5100	3,1200	1,3763	M
II (n = 6)	78,5 ($\pm$ 24,8)	3,4750 ($\pm$ 0,7513)	2,6467 ($\pm$ 0,7291)	3,8467 ($\pm$ 0,9025)	1,5179 ($\pm$ 0,2887)	MW ($\pm$ SF)
	69,5	2,5950	2,0450	3,2750	1,2437	M
III (n = 14)	115,6 ($\pm$ 13,1)	7,3464 ($\pm$ 1,6767)	2,5071 ($\pm$ 0,4369)	6,0807 ($\pm$ 1,2708)	3,2356 ($\pm$ 0,5338)	MW ($\pm$ SF)
	125,5	3,9550	2,2600	4,8000	2,9337	M

Tab. 4.4 Statistische Lagemaße der Häufigkeitsverteilung der Implantationsdauer, der Fläche innerhalb der einzelnen Gefäßwandregionen sowie der Intima:Media Ratio der untersuchten nativen Venen (n = 5) und Bypass-Läsionen (n = 30) unter Berücksichtigung der verschiedenen Läsionstypen.

Dokumentiert sind die arithmetischen Mittelwerte (MW) ($\pm$ Standardfehler (SF)) sowie die Mediane (M).

L: Läsionstyp, nV: native Venen, Impl.: Implantationsdauer (Monate), LM: Lagemaße, (N)I: (Neo)Intima, ME: Media, AD: Adventitia, Fl: Gesamtfläche der ausgemessenen Region (mm²).

* kennzeichnet native Venen (Kontrollgruppe), die nicht implantiert waren.

L	ZZ (N)I	ZZ ME	ZZ AD	ZD (N)I	ZD ME	ZD AD	LM
nV (n = 5)	920,0 ($\pm$ 161,0)	4126,0 ($\pm$ 875,0)	988,0 ($\pm$ 242,5)	1207,6 ($\pm$ 337,7)	1227,7 ($\pm$ 337,7)	761,3 ($\pm$ 104,5)	MW ($\pm$ SF)
	850,0	2910,0	870	1041,7	1334,9	729,7	M
I (n = 10)	4940,0 ($\pm$ 1446,2)	5992,0 ($\pm$ 983,6)	7960,0 ($\pm$ 1338,0)	2810,8 ($\pm$ 529,9)	4306,3 ($\pm$ 836,0)	3072,8 ($\pm$ 580,2)	MW ($\pm$ SF)
	2415,0	6940,0	6625,0	2498,7	4068,4	2634,1	M
II (n = 6)	11746,7 ($\pm$ 3151,9)	9901,7 ($\pm$ 3380,8)	11396,7 ($\pm$ 3072,1)	4068,3 ($\pm$ 1555,9)	3491,3 ($\pm$ 585,2)	2936,1 ($\pm$ 360,8)	MW ($\pm$ SF)
	10360,0	8125,0	9595,0	2715,4	3296,0	2589,5	M
III (n = 14)	16294,3 ($\pm$ 3965,6)	8076,4 ($\pm$ 1537,5)	15370,7 ($\pm$ 3779,5)	2273,4 ($\pm$ 324,4)	3189,9 ($\pm$ 548,8)	2425,9 ($\pm$ 334,0)	MW ($\pm$ SF)
	8360,0	9215,0	7605,0	2080,4	3038,9	2383,6	M

Tab. 4.5 Statistische Lagemaße der Häufigkeitsverteilung der Gesamtzellzahl und Zelldichte innerhalb der einzelnen Gefäßwandschichten der untersuchten nativen Venen (n = 5) und Bypass-Läsionen (n = 30) unter Berücksichtigung der verschiedenen Läsionstypen.

Dokumentiert sind die arithmetischen Mittelwerte (MW) ($\pm$ Standardfehler (SF)) sowie die Mediane (M).

L: Läsionstyp, nV: native Venen, LM: Lagemaße, (N)I: (Neo)Intima, ME: Media, AD: Adventitia, ZZ: Gesamtzellzahl der ausgemessenen Region, ZD: berechnete Zelldichte der ausgemessenen Region.

L	PI (N)I	PI ME	PI AD	LM
nV (n = 5)	0,0000	0,0287 ($\pm$ 0,0131)	0,0115 ($\pm$ 0,0115)	MW ($\pm$ SF)
	0,0000	0,0325	0,0000	M
I, II, III (n = 30)	0,1395 ($\pm$ 0,2669)	0,1797 ($\pm$ 0,5290)	0,0086 ($\pm$ 0,1364)	MW ($\pm$ SF)
	0,0280	0,0435	0,0300	M
I (n = 10)	0,0728 ($\pm$ 0,0311)	0,0383 ($\pm$ 0,0165)	0,0408 ($\pm$ 0,0191)	MW ($\pm$ SF)
	0,0195	0,0144	0,0071	M
II (n = 6)	0,0053 ($\pm$ 0,0039)	0,0278 ($\pm$ 0,0123)	0,0124 ($\pm$ 0,0101)	MW ($\pm$ SF)
	0,0000	0,0186	0,0000	M
III (n = 14)	0,2653 ($\pm$ 0,0945)	0,3620 ($\pm$ 0,1998)	0,1502 ($\pm$ 0,0466)	MW ($\pm$ SF)
	0,1107	0,1638	0,0567	M

Tab. 4.9 Statistische Lagemaße der Häufigkeitsverteilung der ermittelten Proliferationsindizes innerhalb der einzelnen Gefäßwandschichten der untersuchten nativen Venen (n = 5) und Bypass-Läsionen (n = 30) sowie unter Berücksichtigung der verschiedenen Läsionstypen.

Dokumentiert sind die arithmetischen Mittelwerte (MW) ($\pm$ Standardfehler (SF)) sowie die Mediane (M).

L: Läsionstyp, nV: native Venen, LM: Lagemaße, (N)I: (Neo)Intima, ME: Media, AD: Adventitia, PI: Proliferationsindex.

Literaturquelle	Untersuchungs- gewebe	Fall- gruppe	Detektiertes Antigen	Ergebnisse (%)
→ GORDON et al. (1990)	<u>Koronarläsionen:</u> 1.) diffuse Intimaverdickung 2.) fortgeschrittene Plaqueläsion (Herztransplantationen)	(n = 13)	PCNA	1.) Intima: $0,31 \pm 0,40$ Media: $0,19 \pm 0,31$ 2.) Intima: $0,85 \pm 1,29$ Media: $0,40 \pm 0,90$
→ PICKERING et al. (1992)	<u>Koronare und periphere TEA's:</u> 1.) Primäre Atherosklerose 2.) Restenose (Re-OP: 1,5 – 12,2)	(n = 18) (n = 19)	PCNA	1.) $3,6 \pm 3,5$ 2.) $15,2 \pm 13,6$
→ KATSUDA et al. (1993)	Aorta ("frühe Läsionen", Patientenalter: 15 - 34)	(n = 16)	PCNA	< 2 % (Mph, Ly)
→ O'BRIEN et al. (1993)	<u>Koronare und periphere TEA's:</u> 1.) Primäre Atherosklerose 2.) Restenose (Re-OP: 1 – 390 Tage)	(n = 118) (n = 110)	PCNA	1.) + 2.) ≤ 1 (S)
→ REKHTER UND GORDON (1995)	Carotis TEA's (Läsionstyp: fortgeschritten, kompliziert)	(n = 11)	PCNA	Intima: $1,61 \pm 0,35$ (M) Media: $0,05 \pm 0,03$ (S)
→ MAREK et al. (1998)	<u>Carotis TEA's:</u> 1.) Primäre Atherosklerose 2.) Restenose (Läsionstyp: L. mit neointimaler Verdickung; atherosklerotische L., gemischte L.) (Re-OP: 2 Monate – 30 Jahre / MW: 6,8 Jahre)	(n = 14) (n = 29)	PCNA	1 – 3 % (Mph)
→ BRANDL et al. (1997)	Carotis TEA's (Läsionstyp V – VI)	(n = 26)	Ki-67	Diffuse Intimaverdickung: $0,26 \pm 0,46$ Plaqueschulter: $0,12 \pm 0,41$ Core-Region: $0,81 \pm 1,37$ (N)

Tab. 5.1 Zusammenfassung der wesentlichen Publikationen zur Proliferationsanalyse in primäratherosklerotischen und restenotischen Läsionen, die im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert werden (5.1.3).

Dokumentiert sind die Mittelwerte der Proliferationsindizes ($\pm$ Standardfehler).

TEA: Thrombendarteriektomie, L.: Läsion, Re-OP: Zeitraum von der Primär-OP bis zur erneuten Intervention, ID: Implantationsdauer (Monate), MW: Mittelwert.

Zelltyp mit der höchsten Proliferationsaktivität: glatte Muskelzellen (S), Endothelzellen (E), Makrophagen (Mph), nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen (N), Lymphozyten (Ly).

Literaturquelle	Untersuchungs-Gewebe	Fall-gruppe	Detektiertes Antigen	Ergebnisse (%)
→ HOFSTRA et al. (1996)	Periphere Bypass-Läsionen (ID: 1 – 24)	(n = 18)	Ki-67	Subendothelial-intimal: $3,5 \pm 3,9$ (S) Medial-intimal: $2,0 \pm 1,8$ (E) Media: $2,6 \pm 2,7$ (E) Adventitia: $4,2 \pm 3,5$ (S)
→ WESTERBAND et al. (1997)	Periphere Bypass-Läsionen (ID: 1,5 – 10)	(n = 14)	PCNA	$1,34 \pm 1,48$ (S)
→ WESTERBAND et al. (1998)	Periphere Bypass-Läsionen (ID: 3 – 18)	(n = 14)	PCNA	Intima: $1,03 \pm 0,88$ (S) Media: $3,14 \pm 0,74$ (S) Adventitia: $3,01 \pm 0,74$ (E)
→ Ergebnisse dieser Arbeit	<u>Aortokoronare Bypass-Läsionen:</u> Typ I Läsionen (ID: $71,3 \pm 15,0$)	(n = 10)	Ki-67	Neointima: $0,073 \pm 0,031$ (E) Media: $0,038 \pm 0,017$ (E) Adventitia: $0,041 \pm 0,019$ (E)
	Typ II Läsionen (ID: $78,5 \pm 24,8$)	(n = 6)		Neointima: $0,005 \pm 0,004$ (N) Media: $0,028 \pm 0,012$ (E) Adventitia: $0,012 \pm 0,010$ (E)
	Typ III Läsionen (ID: $115,6 \pm 13,1$)	(n = 14)		Neointima: $0,265 \pm 0,095$ (N) Media: $0,362 \pm 0,200$ (N) Adventitia: $0,150 \pm 0,047$ (E)

Tab. 5.2 Zusammenfassung der Publikationen zur Proliferationsanalyse in peripheren Bypass-Läsionen, die im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit in aortokoronaren Bypass-Läsionen diskutiert werden (5.1.3).

Dokumentiert sind die Mittelwerte der Proliferationsindizes ($\pm$ Standardfehler) der publizierten Daten und der Ergebnisse dieser Arbeit.

ID: Implantationsdauer (Monate).

Zelltyp mit der höchsten Proliferationsaktivität: glatte Muskelzellen (S), Endothelzellen (E), Makrophagen (Mph), nicht-charakterisierbare mesenchymale Zellen (N).