Pirfenidon verhindert die neointimale Hyperplasie nach Ballondenudation der Arteria carotis der Ratte

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Andreas Backes
aus Hadamar

Gießen, 2006

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Gießen
Innere Medizin I, Abteilung Kardiologie

Direktor/Leiter: Prof. Dr. Harald Tillmanns
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Frau Prof. Dr. V. Grau

Tag der Disputation: 19.06.2007

Meinen Eltern

Inge und Gerd Backes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		1
1	**Einleitung**	2
2	**Material**	6
2.1	Chemikalien	6
2.2	Instrumente	11
2.3	Biologische Materialien	13
3	**Methoden**	14
3.1	Dilatation der A. carotis der Ratte	14
3.1.1	Entnahme der A. carotis	18
3.2	Herstellung histologischer Schnitte am Kryostat	18
3.3	Hämatoxylin-Eosin Gefrierschnittfärbung	18
3.4	Morphometrische Berechnung des Neointima-Media-Verhältnisses	19
3.5	Färbung der glatten Gefäßmuskelfasern mit anti-alpha-Aktin-Antikörpern	20
3.6	PCNA (Proliferatives zytoplasmatisches nukleäres Antigen)-Färbung zur Quantifizierung proliferativer Aktivität	21
3.7	Darstellung extrazellulärer Matrix mit Picrosirius Rot	22
3.8	Northern-Blot zur Bestimmung der Kollagen Typ I mRNA Expression	23
3.9	Datenanalyse und Statistik	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Versuchsplanung	26
4.2	Pirfenidon hemmt die Neointimabildung	27
4.3	Immunhistochemisches Verfahren	31
4.3.1	Pirfenidon beeinflusst nicht die lokale Akkumulation von Gefäßmuskelzellen	31
4.3.2	Pirfenidon beeinflusst nicht die neointimale Proliferation	34
4.3.3	Pirfenidon verhindert die lokale Akkumulation extrazellulärer Matrix	38

4.4 Darstellung der Kollagen I- spezifischen Genexpression auf mRNA Ebene durch das Northern-Blot Verfahren 41
4.5 Neointimabildung nach Absetzen des Pirfenidons 42

5 Diskussion 45
5.1 Die Bedeutung extrazellulärer Matrixbildung im Restenoseprozess 46
5.2 Pirfenidon, ein Inhibitor der Neointimabildung! 47
5.2.1 Der Wirkungsmechanismus des Pirfenidons 48
5.3 Ergebnisdeutung 49

6 Zusammenfassung 51

7 Literaturangaben 54

8 Lebenslauf 62

9 Publikationen 64

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Inhibitoren	Angiotensin-Conversions-Enzym-Hemmer
bFGF	basisch fibroblast growth factor
DAB-Mixtur	Diaminobenzidin-Mixtur
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ECM	extrazelluläre Matrixproteine
EGF	endothelial growth factor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
IFN-γ	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL1	Interleukin 1
MONICA Studie	Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease Studie
MOPS	Morpholino-Propan-Sulfonsäure
PBS-Puffer	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferatives zytoplasmatisches nukleäres Antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SSC	Sodium chloride/Sodium citrate
TGF-ß	Transforming-Growth-Factor-ß
TNF	Tumor-Necrosis-Factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organization
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
AEC	3-Amino, 9 Ethyl-Carbazol
KG	Körpergewicht

1. Einleitung

Mitotische Zellteilung ist ein Prärequisit des Lebens. So stellt die Maschinerie, welche die Zellteilung koordiniert, ein Jahrmillion altes Uhrwerk im Zentrum einer jeden Zelle dar. Seit der Entdeckung ihres ersten Proteins, des klassischen Zyklins, durch Celis und Mitarbeiter (Celis und Bravo 1984) hat sich der Zellzyklus als ein komplexes System von Zyklinen und zyklin-abhängigen Kinasen herausgestellt, welches wir erst langsam zu verstehen beginnen. Die Wertschätzung der wissenschaftlichen Forschung über physiologische und pathologische Zellteilung kommt in der Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2001 an drei führende Zellzyklusforscher zum Ausdruck: Leland H. Hartwell (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA), R. Timothy Hunt und Sir Paul M. Nurse (beide am Imperial Cancer Research Fund, London, Großbritannien) wurden für ihre erfolgreichen wissenschaftlichen Arbeiten über Zellteilung und Zellzyklus ausgezeichnet.

Pathologische Zellteilung ist das Merkmal nicht nur des malignen Wachstums. Auch in der vaskulären Medizin spielt sie mittlerweile eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zur anfänglichen Vermutung William Harveys (1578 bis 1657), dass Blutgefäße inaktive Versorgungsleitungen seien, stellen die Gefäße ein dynamisches Organ dar, welches eine kritische Rolle für die Regulation des Blutflusses spielt. Sie agieren zudem als vorderste Linie der Verteidigung gegen Infektion und Gewebetrauma und partizipieren aktiv an Prozessen der Inflammation und der Thrombusbildung. So hat sich die vaskuläre Medizin zu einer sehr wichtigen Disziplin entwickelt.

Die Ergebnisse der "MONItoring Trends and Determinants in CArdiovascular Disease" (MONICA) Studie der Weltgesundheitsbehörde (WHO) haben bestätigt, daß Koronarerkrankungen weiterhin zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt gehören (Tunstall-Pedoe et al. 1999). Die Atherosklerose ist hierbei das primäre pathologische Ereignis, welche zu einer Lumeneinengung der Koronargefäße führt. Für viele klinisch symptomatische, atherosklerotische Läsionen stellen mechanische Interventionen wie die Ballonangioplastie (PTCA) und die Stent-Platzierung den therapeutischen Standard dar. 30-40% der Patienten, die sich einer perkutanen koronaren Intervention unterziehen, erleiden jedoch eine Restenosierung, welche in 20% der Fälle eine erneute Intervention nach sich zieht, einschließlich einer aorto-koronaren Bypass-Operation, die selbst durch den Verschluß

des Venenkonduits aufgrund chronischer Lumeneinengung limitiert ist. Die Atherosklerose, die Restenose nach Ballonangioplastie bzw. Stentplatzierung und die Venenbypass-Stenose stellen, neben der Transplantatvaskulopathie und der pulmonalen Hypertonie, das Hauptspektrum der vaskuloproliferativen Erkrankungen dar.

Für die Entstehung der Atherosklerose wurde bereits von Virchow eine Verletzung des Endothels postuliert (Virchow 1856), welcher bis heute, nach Integration mehrerer Modelle zur "response to injury"-Hypothese, eine führende Rolle bei der Plaqueentstehung zugesagt wird (Ross 1995; Ross 1999; Ross und Glomset 1973). Die "response to injury"-Hypothese kann auf alle weiteren vaskuloproliferativen Erkrankungen übertragen werden. Denn allen ist eine Gefäßverletzung mit folgender Ausbildung einer sog. "Neointima" gemeinsam. Eine Gefäßverletzung kann durch mechanische Intervention, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Inhaltsstoffe des Tabakrauches, Hyperlipidämie u.a. erfolgen, wodurch eine vaskuloproliferative Kaskade getriggert wird, die in drei Phasen unterteilt werden kann: (1) eine frühe Phase der Thrombozytenaktivierung, Thrombusformation und Monozytenrekrutierung, (2) eine intermediäre Phase der Gefäßmuskelzellmigration und -proliferation und (3) eine späte Phase der Deposition extrazellulärer Matrix (Clowes et al. 1989; Clowes et al. 1983a; Clowes et al. 1983b; Dzau et al. 2002; Cicila und Nestor et al. 2006).

Multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine vermitteln und fördern die proliferative Antwort eines Gefäßes auf ein Trauma. Diese stammen aus den adhärierenden Thrombozyten und Monozyten, den beschädigten Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen. "Platelet-derived growth factor" (PDGF), zum Beispiel, initiiert die Migration von Gefäßmuskelzellen der Media in die sich bildende Neointima (Ferns et al. 1991; Jawien et al. 1992), während "basic fibroblast growth factor" (bFGF) die anschließende Gefäßmuskelzellproliferation induziert (Reidy et al. 1992). Intimale Proliferation und die Matrixakkumulation erfolgen unter der Kontrolle des PDGF, "transforming growth factor-β" (TGF-β), Angiotensin II und "insulin-like growth factor-1" (IGF-1) (Dzau et al. 1991; Grant et al. 1994; Majeski et al. 1991; Nabel et al. 1993a; Nabel et al. 1993b; Rakugi et al. 1994).

Auch für die primäre Plaque der Atherosklerose ist die Gefäßmuskelzellproliferation von Bedeutung. Sie stellt hierbei sogar ein frühes Ereignis dar, denn glatte Gefäßmuskelzellen wurden bereits in "fatty streaks" junger Erwachsener identifiziert (Katsuda et al. 1992; Ross 1995; Dzau et al. 2002).

Vaskuloproliferative Erkrankungen resultieren somit aus Zellmigration, Zellproliferation und Matrixdeposition, aber auch aus programmiertem Zelltod (Apoptose). Obwohl zudem aktive vaskuläre Umbauprozesse (Remodeling) eine wichtige Determinante des chronischen Lumenverlustes eines Gefäßes darstellen, spielt die Ausbildung einer Neotintima durch Proliferation und Matrixdeposition eine tragende Rolle für die Verengung eines Gefäßes nach Angioplastie (insbesondere nach Stent-Implantation), im Venenbypass, bei der Transplantatvaskulopathie, bei der pulmonalen Hypertonie und auch bei der Atherosklerose (Gibbons und Dzau 1994).

Die pharmakologische Verhinderung oder Hemmung vaskuloproliferativer Erkrankungen war bislang jedoch ohne Erfolg geblieben (Herrman et al. 1993a; Herrman et al. 1993b). Dies mag an der Redundanz der bei diesen Erkrankungen beteiligten Wachstumsfaktoren und Signaltransduktionswegen liegen. Die Maschinerie, die den Zellzykluseintritt und die Zellzyklusprogression reguliert, stellt hingegen die gemeinsame Endstrecke aller mitogenen Stimuli dar. Seit ihrer Entdeckung sind präventive und therapeutische Ansätze wieder in greifbare Nähe gerückt (Braun-Dullaeus et al. 1998; Dzau et al. 1997).

Eine vielversprechende Substanz ist das Rapamycin (Sirolimus), welches neben einer immunsuppressorischen Wirkung auch einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach mechanischer Gefäßwandirritation aufweist (Gregory et al. 1993). Einige Studien haben die molekularen Effekte des Rapamycins auf die glatte Gefäßmuskulatur, die Zellzyklusregulation und im Zuge dessen auf die Prävention neointimaler Entwicklungen herausgearbeitet (Braun-Dullaeus et al. 2001; Gallo et al. 1999).

Der Zellzyklus stellt derzeit eines der attraktivsten therapeutischen Ziele zur Verhinderung der Restenose nach Angioplastie oder Stentplatzierung, der Venenbypasstenose, der Transplantatvaskulopathie, der pulmonalen Hypertonie, aber auch der primären Atherosklerose dar. Auch Kenntnisse über die Regulation der Matrix-Synthese erweitern das pathophysiologische Verständnis vaskuloproliferativer Erkrankungen. Die Hemmung der Proteinsynthese und –akkumulation stellt einen weiteren interessanten Therapieansatz dar, denn gerade in restenotisch veränderten Gefäßläsionen besteht die Neointima nur zu 11% aus zellulären Bestandteilen, während sich der Rest (89%) aus extrazellulären Matrixproteinen zusammensetzt. (Schwartz et al. 1992). Die extrazelluläre Matrix hat also den weitaus größeren Anteil am neointimalen Gewebe.

Ziel dieser Arbeit war es den Restenose-Prozess nach Ballonangioplastie am Ratten-Carotis-Modell pharmakologisch zu inhibieren bzw. zu minimieren. Dabei sollten die Einflüsse von

Pirfenidon (Deskar®) auf den Zellzyklus einerseits und insbesondere auf die Matrixdeposition andererseits durchleuchtet werden. Pirfenidon ist ein synthetisch hergestelltes Non-Peptid, welches die durch Zytokine (TGF-ß, PDGF, bFGF, u.a.) getriggerte Genexpression der Matrixproteine selektiv reguliert. Dieser Wirkungsmechanismus konnte schon in einigen inflammatorischen, nicht vaskulären Modellen, dargestellt werden. (Gurujeyalakshimi et al. 1999; Kaneko et al. 1998). Die Auswirkungen der Substanz auf die Gefäßwand nach mechanischer Reizung sollte durch diese Arbeit untersucht werden.

2. Material

Die verwendeten Chemikalien und Instrumente sind tabellarisch zusammengestellt:

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma Qualitäts-Zertifizierung
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Agarose	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
AEC Chromogen	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Alpha-Aktin Primärantikörper	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Atropin	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland DIN EN ISO/IEC 17025
Biotinylierter Maus-Anti-PCNA-Antikörper	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Biotinylierter Sekundärantikörper	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
DAB – Färbesubstanz	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000

Darko-Pen	Bayer, Leverkusen, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Diatex-Lösung	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Direkt – Rot 80	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Eco R1	Fermentas GmbH, St. Leon Roth, Frankreich DIN EN ISO 9002
Enzymkonjugator	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Eosin-Stammlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Ethanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Flüssigstickstoff	Bayer, Leverkusen, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000

Formamid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland ISO 9000: 2001 und ISO 13485: 2003
Gene Images CDP Start Detection Module	Amersham, Freiburg, Deutschland DIN EN ISO/IEC 17025 – EN ISO 9000
Gene Images Random Prime Module	Amersham, Freiburg, Deutschland DIN EN ISO/IEC 17025 – EN ISO 9000
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Glyzerin (50 %)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Hämalaun nach Mayers	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Hämatoxylin-Stammlösung	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Histomount	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Hybond N+ Membran	Amersham, Freiburg, Deutschland DIN EN ISO/IEC 17025 – EN ISO 9000
Hydrogen Peroxid	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Isofluran	Baxter S.A., Unterschleissheim, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Kalialaun	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Ketanest	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Kollagen Typ1 alpha1, ATCC 61322, human cDNA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000

Methanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Morpholino-Propan-Sulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Natriumacetat (0,1 M)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Natriumchlorid (0,9 %)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland DIN EN ISO 9001 13485
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Natriumjodid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland DIN EN ISO 9001 13485
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich DIN EN ISO 9002
Phosphomolybdänsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Pirfenidon	Marnac, Dallas Texas, USA
Puffer (10X) O+	Fermentas GmbH, St. Leon Roth, Frankreich DIN EN ISO 9002
Ratten cDNA, 135 kb Sigma G0789	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
RNAse Zap	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000

Rompun	Bayer, Leverkusen, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Roti Quick Kit	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Salzsäure (0,01M)	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Salzsäure (0,1M)	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Serum Blockierungslösung	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
Streptavidin Peroxidase	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:2000
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
SSC (Sodium chloride/Sodium citrate)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Tissue – Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande DIN EN ISO 9002
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Xylol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
Xylocain	Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland OSHAS18001 and ISO14001
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000, 14001, 13485
Zymed Antibody Diluent Reagent Solution	Zymed, San Francisco, USA ISO 13485:2003. ISO 9001:20

2.2 Instrumente

Instrument	Firma Qualitäts-Zertifizierung
2 French Ballon-Katheter	Baxter S.A., Unterschleissheim, Deutschland DIN EN ISO 9001:2000
armierte gebogene anatomische Pinzette	Martin, Tuttlingen, Deutschland DIN EN ISO 13485, DIN EN ISO 9001
feine chirurgische Pinzette nach Arruga	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
gebogene anatomische Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
gebogene Arterienklemme	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
gerade anatomische Pinzette	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
gerade Arterienklemme	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
Mehdorn Anlegepinzette	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
Mehdorn Clip	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
Mikrofederschere nach Vannas	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000

Präparierschere nach Metzenbaum	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
Prolene 4.0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
spitze Pinzette	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
spitze Präparierschere	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000
Wundspreitzer nach Weitlander	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland DIN ISO/DIS 9000:2000

2.3 Biologische Materialien

Männliche Wistar-Ratten der Firma Charles-River Deutschland GmbH, Sulzfeld. Das durchschnittliche Gewicht betrug 300 g. Zur Akklimatisation wurden die Tiere erst eine Woche nach Auslieferung verwendet.

3. Methoden

3.1 Dilatation der A. carotis der Ratte

Die Ballondilatation erfolgte an der A. carotis der Ratte. Nach einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (ca. 30 Sekunden) kam es zur intramuskulären Injektion von 0,5 ml eines Rompun-Ketanest-Gemisches (Verhältnis ¼), sowie zur Applikation einer 0,25 %igen Atropin-Lösung. Durch eine linksmediale Inzision des Halses mit einer Präparierschere nach Metzenbaum konnten die Halsfaszie und die darunter gelegenen Strukturen freipräpariert werden, bis schließlich die linke pulsierende A. carotis in der Tiefe in Erscheinung trat. Mit Hilfe feiner gebogener und chirurgischer Pinzetten konnte der „Carotisstamm“ mit seiner Bifurkation in A. carotis externa und A. carotis interna dargestellt werden. Mit Hilfe eines Wundspreitzers nach Weitlander wurde das Operationsfeld dauerhaft offen gehalten. Anschließend erfolgte das Anlegen von Schlingen. Die der A. carotis communis und A. carotis interna wurden nur zur Sicherheit angelegt, um durch leichten Zug Blutungen zu vermeiden. Der Externaanteil wurde mit zwei ungeknoteten Ligaturen versehen, wobei eine im Bereich der Bifurkation, die andere in Höhe des Zungenbeins angelegt wurde (Abbildung 1a/1b). Um darüber hinaus eine Blutung zu umgehen wurden zwei Mehdorn Anlegepinzetten an der A. carotis communis und am Interna-Schenkel angelegt. Zwischen proximaler und distaler Ligatur der A. carotis externa wurde mit einer Mikrofederschere nach Vannas die Gefäßwand aufgeritzt. Mit einer spitzen Pinzette konnte man nun die Öffnung etwas vergrößern, um einen 2 French Ballonkatheter in das Gefäß vorzuschieben. Kurz vor Erreichen des Aortenbogens konnte der Ballon gebläht werden (2,5 ml Luft) und der Denudationsvorgang einsetzen. Der Katheter wurde dreimal durch den gesamten Carotisstamm geführt (Abbildung 2a/2b). Ziel dieser Maßnahme war die Verletzung der endothelialen Gefäßwand zur Induktion einer neointimalen Proliferation. Nach Entfernung des Katheters wurden die beiden Ligaturen des Externaastes verknotet, um einer Blutung aus der angeritzten Gefäßwand entgegenzuwirken. Die beiden anderen Schlingen konnten entfernt werden (Abbildung 3a/3b). Abschließend wurde das Wundgebiet mit einer transkutanen fortlaufenden Naht verschlossen.

Die freipräparierte A. carotis mit den entsprechenden Ligaturen:

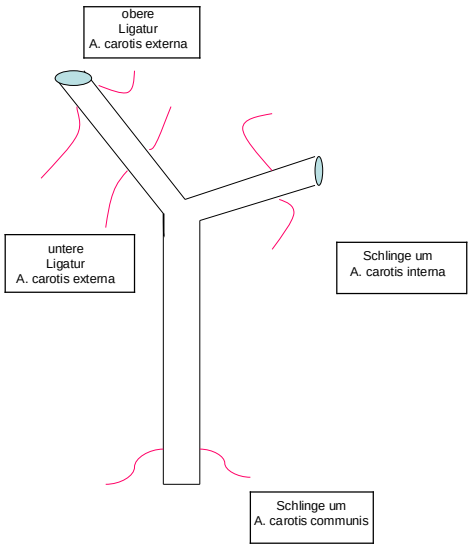
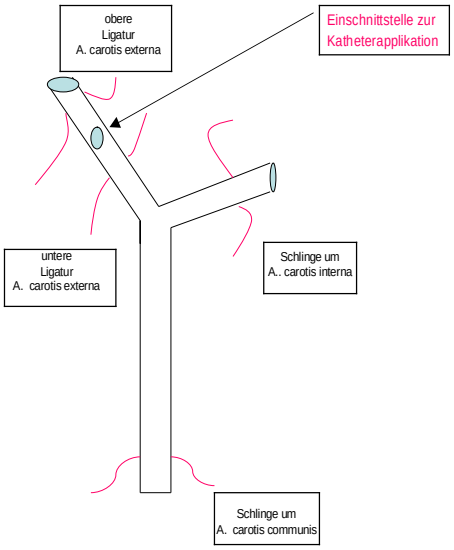


Abbildung 1a **Abbildung 1b**

Nachdem der Gefäßbaum der A. carotis freipräpariert war, konnten die Gefäßäste mit Ligaturen versehen werden. In Abbildung 1a ist die Schemazeichnung des zu denudierenden Gefäßes zu sehen, während Abbildung 1b die entsprechende Situation während der Präparation im Tiermodell darstellt. An dieser Stelle findet noch keine Ligaturverknotung statt. Die Fäden werden locker um das jeweilige Gefäß gelegt.

Gefäßdilatation:



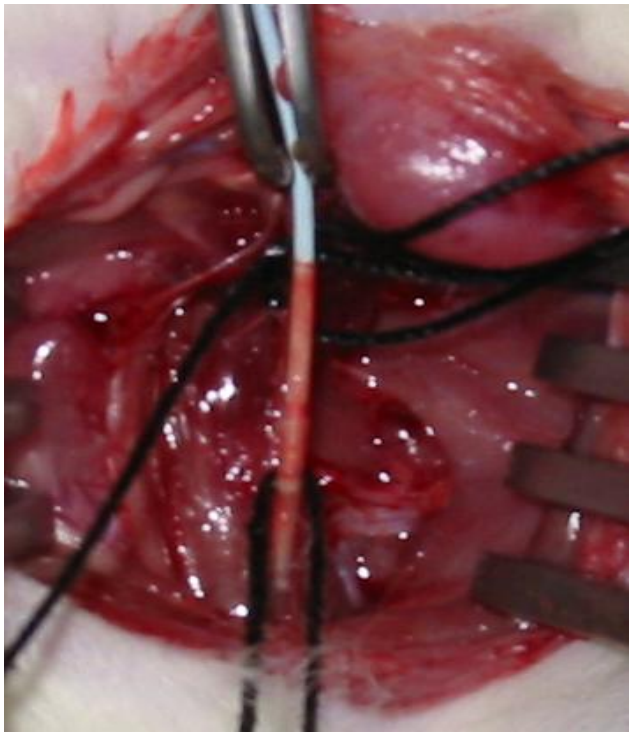
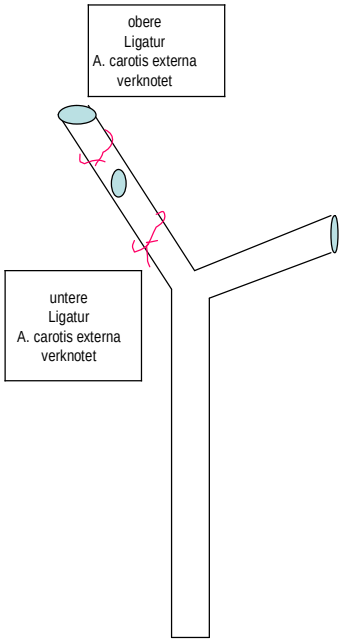


Abbildung 2a **Abbildung 2b**

Zur Katheterapplikation wurde zwischen der oberen und unteren Ligatur der externen Carotisarterie, mit Hilfe einer Mikroschere, die Gefäßwand angeritzt. Die Schemazeichnung 2a zeigt die entsprechende Stelle. Mit einer spitzen Pinzette konnte nun die Öffnung erweitert werden, während gleichzeitig der Katheter in das Gefäßlumen vorgeschoben wurde. Kurz vor Erreichen des Aortenbogens wurde der Ballon gedehnt, und dreimal durch das Gefäß gezogen. Abbildung 2b zeigt die A. carotis communis mit gedehntem Ballonkatheter während einer Präparation.

Verschluss der Ligaturen:



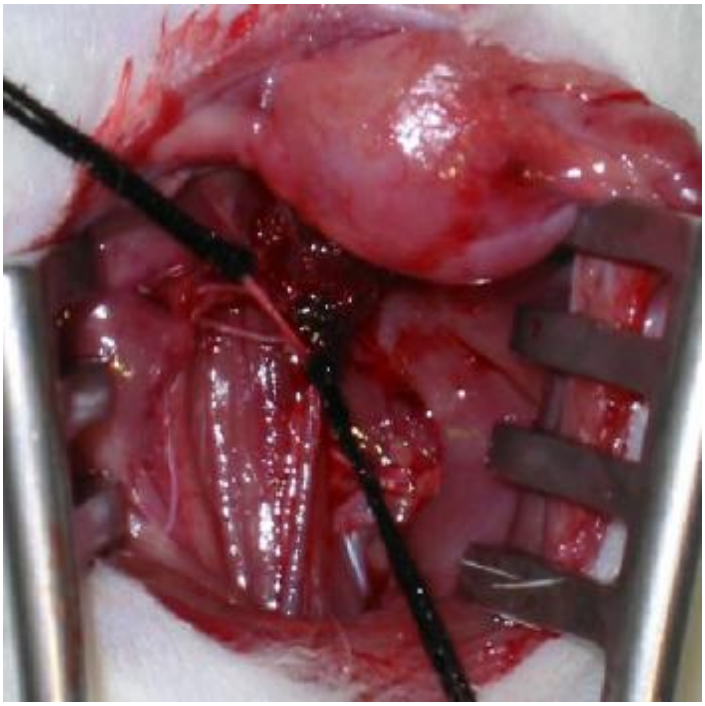


Abbildung 3a **Abbildung 3b**

Nach Abschluß der Dilatation wurde die obere und untere Ligatur der A. carotis externa verknotet. Dabei mußte man beachten, dass die Einschnittstelle zwischen den Ligaturen lag, um eventuelle Blutungen zu vermeiden. Die Abbildungen 3a und 3b stellen diesen Sachverhalt dar. Die anderen Schlingen wurden entfernt, um anschließend die Wunde zu vernähen.

3.1.1 Entnahme der A. carotis

Die Gefäßentnahme erfolgte ein-, zwei- und vier Wochen nach Gefäßdilatation. Die Narkose der Ratte konnte nach den gleichen Kriterien wie bei der Denudation durchgeführt werden. Nach Eröffnung der angelegten Hautnaht wurde die denudierte A. carotis communis mit einer spitzen Präparierschere freipräpariert und am kaudalen sowie am kranialen Ende mit einer Arterienklemme versehen. Mit einer Kanüle wurde am kranialen Teil die Gefäßwand angeritzt, um schließlich vom kaudalen Gefäßende das Lumen mit Hilfe einer Natriumchlorid-Lösung (0,9%) von Blutbestandteilen zu befreien. Anschließend konnte der Gefäßabschnitt herausgeschnitten werden. Das Gefäß wurde nun senkrecht in ein Eppendorf-Röhrchen, gefüllt mit Tissue-Tek, eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Das Gleiche erfolgte mit der kontralateralen nicht dilatierten Arterie, die als Kontrolle fungierte. Die Präparate wurden dann bei -80 Grad Celsius, bis zur Anfertigung histologischer Schnitte, gelagert.

3.2 Herstellung histologischer Schnitte am Kryostat

Mit Hilfe des Kryostat konnten histologische Gefrierschnitte angefertigt werden. Die gefrorenen Präparate wurden dafür aus dem Eppendorf-Röhrchen gelöst und mit Tissue-Tek auf dem Präparatteller befestigt. Es wurden serielle Querschnitte angefertigt, wobei zu beachten war, dass die Betriebstemperatur des Kryostates bei ca. -25 Grad Celsius lag. Die Schnittdicke betrug 5 µm. Das Präpart konnte nun auf einen Objektträger übertragen werden und stand somit für immunhistochemische Verfahren, als auch zur morphometrischen Bestimmung der Gefäßwand zur Verfügung.

3.3 Hämatoxylin-Eosin Gefrierschnittfärbung

Die Färbung erfolgte an Gefrierschnitten der A. carotis der Ratte. Hierzu mussten zuerst die Hämatoxylin-, als auch die Eosin-Stammlösungen in die gebrauchsfertige Substanz umgewandelt werden. Dieses erfolgte indem 1 g Hämatoxylin mit Natriumjodid (0,2 g), Kalialaun (50 g) und Aqua dest. (1000 ml) versetzt wurde. Das Gemisch wurde schließlich mit Chloralhydrat (50 g) und Zitronensäure (1 g) vermischt.

Die Eosin-Gebrauchslösung entstand indem die Stammlösung (2 g Eosin in 100 ml 96% Ethanol) zu gleichen Teilen mit 70 % Ethanol vermischt wurde. Auf 100 ml dieser Mischung kamen anschließend 5 Tropfen Essigsäure (100 %).
Der Färbevorgang begann nun mit der Fixierung der histologischen Schnitte, welche in Form eines zehnminütigen Acetonbades bei vier Grad Celsius erfolge. Anschließend wurden die Schnitte für ca. vier Minuten in Aqua dest. gespült, um anschließend für vier Minuten in die vorgefertigte Hämatoxylin-Gebrauchslösung eingetaucht zu werden. Der nächste Schritt bestand in einem intensiven Spülvorgang mit destilliertem Wasser (ca. 7 Minuten), um anschließend die Präparate 15 Minuten in Leitungswasser eintauchen zu lassen. Nach Ablauf dieser Zeit konnten die histologischen Schnitte in die oben beschriebene Eosin-Gebrauchslösung für weitere 30 Sekunden eingetaucht werden. Nun setzte ein erneuter Spülvorgang mit Aqua dest. ein (4 Minuten), mit darauf folgender Entwässerung durch eine aufsteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden sechs Behältnisse zu je zwei mit 70 % Ethanol, 96 % Ethanol und 100 % Ethanol verwendet. Die Schnitte wurden jeweils 2 Minuten in jedes Gefäß eingelegt. Anschließend konnte mit einem 3minütigen Xylol-Bad der Objektträger gesäubert werden. Nachdem abschließend die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet waren, konnte das Eindecken mit Hilfe einer Diatex Lösung stattfinden.

Das Ergebnis dieser Färbung war mikroskopisch zu bewerten und ergab ein blaues Erscheinungsbild der Zellkerne, sowie eine Rotfärbung des Zytoplasmas, der Kollagenfasern, als auch der Erythrozyten, die noch im Gefäßlumen verblieben waren.
Das Ziel dieser Färbung bestand darin, die Gefäßwandabschnitte, wie Adventitia, Media und Neointima zu differenzieren, um eine genaue morphometrische Beurteilung durchführen zu können.

3.4 Morphometrische Berechnung des Neointima-Media-Verhältnisses

Die morphometrische Beurteilung der Gefäßwände erfolgte durch ein computergesteuertes Verfahren, mit Hilfe eines Programmes der Firma Zeiss. Der mit dem Gefäßquerschnitt beladene Objektträger wurde auf dem Mikroskop mit einem 5-fach vergrößernden Objektiv eingestellt, und von dort aus auf den Computer-Monitor übertragen. Hier konnte nun die Fläche der Intima, Media und Adventitia bestimmt werden. Das Ergebnis

der neointimalen Ausprägung ergab sich durch das Neointima-Media-Verhältnis, welches sich aus dem Verhältnis der neointimalen- zur medialen Fläche errechnete.

3.5 Färbung der glatten Gefäßmuskelfasern mit anti-alpha-Aktin-Antikörpern

Neben der extrazellulären Matrix sollten auch die neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen dargestellt werden, die nach der Ballondilatation von der Media in die intimale Region migrierten. Dies erfolgte durch die Anfärbung von alpha Aktin, einem Markerprotein für glatte Gefäßmuskelzellen. Der Prozess erfolgte durch ein spezifisches Färbeset der Firma „Zymed Laboratories Inc."
Auch diesem Verfahren ging die Fixation der Schnitte voraus, welche mit einem 15-minütigen Bad in 70 % Ethanol seine Einleitung fand. In den folgenden 10 Minuten wurden die Objektträger in eine 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung auf Methanol eingetaucht. Anschließend erfolgte eine dreifache Spülung mit PBS (10 %).

Nachdem die Schnitte getrocknet waren konnte das Gewebe auf dem jeweiligen Objektträger, mit Hilfe des Darko-Pen, eingekreist werden, um mögliche Substanzvermischungen zwischen den beiden Gefäßquerschnitten zu verhindern, da einer der beiden als Kontrollschnitt fungierte und daher keine Berührung mit dem Primärantikörper bekommen durfte. Der nächste Schritt bestand darin, die „Serum Blockierungslösung" (100 µl) auf die Querschnitte zu tröpfeln, um unspezifische Hintergrund-Antigene zu blockieren. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Durch Schrägstellung des Objetträgers konnte die Substanz nach Beendigung der Einwirkungsphase ablaufen. In dieser Zeit konnte der alpha-Aktin Primärantikörper in der „Zymed Antibody Diluent Reagent Solution" (1/100) gelöst, und unmittelbar danach dem jeweiligen Schnitt zugeführt werden. Nach einer 45-minütigen Einwirkungszeit wurden die Schnitte in PBS-Puffer gespült (3 mal 2 Minuten). In den nun folgenden 20 Minuten wurden die Präparate mit dem „Biotinylierten Sekundärantikörper" (100 µl) versetzt, welcher als Brücke zwischen dem Primärsystem und der im Anschluss folgenden „Streptavidinperoxidase" wirkte. An dieser Stelle war zu beachten, dass der Sekundärantikörper durch eine intensive Spülung (3 mal 2 Minuten) von den Präparaten entfernt wurde, bevor die „Streptavidinperoxidase" ihre Wirkung an dem spezifisch

gebundenen Antikörperkomplex ausübte. Die Bedeutung der Peroxidase lag in ihrer enzymatischen Wirkung für die nun folgende Substratfärbelösung (AEC Chromogen => 100 µl), welche die alpha-Aktin-Fasern in eine rot-braune Struktur verfärbte. Auch hier musste der Spülvorgang mit PBS zwischen der Applikation beider Substanzen beachtet werden. Abschließend wurde das Substrat mit destilliertem Wasser gespült und mit Deckgläsern versehen.

3.6 PCNA (Proliferatives zytoplasmatisches nukleäres Antigen)-Färbung zur Quantifizierung proliferativer Aktivität

Der Färbemethode ging die Fixierung der histologischen Gefrierschnitte nach dem oben beschriebenen System (alpha-Aktin-Färbung) voraus.

Nach Abgrenzung der beiden Querschnitte auf einem Objektträger mit Hilfe des Darko-Pen wurde das Gewebe für einen Zeitraum von zehn Minuten mit der „Serum Blockierungslösung“ versetzt, um unspezifische Antigene auszuschalten. Anschließend konnte durch Schrägstellung des Objektträgers die Substanz entfernt, und der Primärantikörper („Biotinylierter Maus-Anti-PCNA“ **à** 100 µl) zugeführt werden. Nach einer Einwirkungsphase von 45 Minuten wurden die Objektträger in PBS-Puffer gereinigt (3 mal 2 Minuten). Die nun folgende Applikation der „Streptavidinperoxidase“ (10 Minuten), führte zu einer Bindung derselben an den Primärantikörper. Die Substanz diente als Verbindungsglied zwischen dem spezifschen Antigen-Antikörper-Komplex und der braun färbenden „DAB-Färbesubstanz“, die nach einem weiteren Spülvorgang mit PBS-Puffer (3 mal 2 Minuten) den histologischen Schnitten zugeführt wurde. Das Zusammensetzungsprinzip der DAB Färbesubstanz beruhte auf einem Gemisch aus destilliertem Wasser (1 ml), Substrat Puffer 20 x (100 µl), DAB 20 x (100 µl) und 0,6 % Hydrogen Peroxid 20 x (100 µl). Der Einwirkungszeitraum betrug 2 Minuten und wurde durch einen intensiven Spülvorgang mit destilliertem Wasser beendet. Es folgte eine Hintergrund-Gegenfärbung mit Hämatoxylin (2 Minuten) mit anschließendem Eintauchen in Leitungswasser (30 Sekunden). In den folgenden 30 Sekunden erfolgte das Eintauchen in PBS-Puffer, was zu einer makroskopisch sichtbaren Blaufärbung der Schnitte führte. Darauf folgte schließlich ein weiterer Spülvorgang mit destilliertem Wasser. Der abschließende Schritt bestand aus einem Dehydrationsvorgang in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) und einer Entfernung der Darko-Pen- Reste mit Xylol. Nun konnten die Schnitte mit „Histomount“ eingedeckt werden.

Mikroskopisch zeigte sich eine braune Kernfärbung als Korrelat des PCNA. Durch Auszählung der Kernfärbungen konnte, im Verhältnis zur Gesamtkernzahl, nun die proliferative Aktivität quantifiziert werden. Bei jedem Tier wurden die Zellkerne von 5 Gefäßquerschnitten ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet.

3.7 Darstellung extrazellulärer Matrix mit Picrosirius Rot

Die histochemische Färbung mit Picrosirius Rot erfolgte an den Gefrierschnitten zur Darstellung des neointimalen Kollagengehaltes, dem Markerprotein der extrazellulären Matrix. Hierzu musste eine gesättigte wässrige Pikrinsäure hergestellt werden:
Drei Teelöffel Pikrinsäure wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und erhitzt. Anschließend kam es zur Abkühlung des Gemisches bei Raumtemperatur. Nach ca. fünf Minuten entstanden gelbe nadelartige kristalline Strukturen. Nach einer Stunde wurde der nicht kristalline Überstand in ein neues Gefäß übertragen und mit 0,1 g „Direkt - Rot 80“ /100 ml versetzt. Die fertige Picrosirius Rot Lösung wurde bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubiert und war anschließend verwendungsbereit.

Der eigentliche Färbeprozess fand seine Einleitung in der zehnminütigen Fixierung der histologischen Gefäßschnitte mit Aceton. Anschließend erfolgten Alkoholbäder, zweimal mit absolutem-, danach mit 90 % und 70 % Ethanol, jeweils für drei Minuten. Nach einem zweiminütigen Leitungswasserbad und einer einminütigen Inkubation in destilliertem Wasser, erfolgte die Zugabe von Phosphomolybdänsäure für fünf Minuten. Der nun folgende Spülvorgang mit Leitungswasser (10 Minuten) diente der intensiven Reinigung der Gefäßquerschnitte und stellte die Voraussetzung für die 90-minütige Versetzung mit der oben beschriebenen Picrosirius-Rot Lösung dar. Die unmittelbar anschließende zweiminütige Inkubation in 0,1 M Salzsäure stellte die Einleitung des Dehydrations- und Spülvorganges dar. Dieser zeichnete sich durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) aus, wobei die Schnitte jeweils eine Minute in die jeweiligen Lösungen eingetaucht wurden.
Nach Beendigung der Entwässerung konnten die histologischen Schnitte mit Deckgläsern versehen werden. Unter dem Mikroskop wurden nun die kollagenen Gefäßbestandteile, insbesondere der extrazelluläre Matrix-Anteil der Neointima begutachtet und bewertet.

3.8 Northern Blot zur Bestimmung der Kollagen Typ I mRNA Expression

Bei allen Arbeitsschritten musste auf RNAsefreiheit geachtet werden, daher wurden alle Lösungen mit DEPC vorbehandelt (1 ml DEPC/Liter, 1 h Raumtemperatur, autoklavieren) und alle Gefäße und Instrumente mit RNAse Zap (Sigma) gereinigt.

Puffer :

10 X MOPS:

MOPS 0,2 M, Natriumacetat 0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 7, steril filtrieren

Gelladepuffer:

Glyzerin 50 %, EDTA 1 mM, Bromphenolblau 0,25 %

20 X SSC:

NaCl 175,3 g und Natriumcitrat 88,2 g pro Liter, pH 7

Methode:

Die Rattencarotiden wurden unter Stickstoff fein zermörsert (jeweils 4 Carotiden poolen). Daraufhin wurde die RNA mit dem Roti Quick Kit isoliert. Als nächstes erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem 1 %igen Agarosegel.

1 g Agarose wurde in 72 ml H_2O gelöst, auf 60 Grad Celsius abgekühlt, anschließend wurden 10 ml 10 X MOPS und 18 ml 12,3 M Formaldehyd hinzugegeben, gemischt und in einen Gießtrog gegossen. Nun konnten die Proben für die Elektrophorese vorbereitet werden: Pro Probe wurden 2,75 µl Formaldehyd, 7,5 µl Formamid, 0,75 µl 10 X MOPS und 5 µg RNA vermischt, anschließend für 15 Minuten bei 65 Grad Celsius und danach kurz auf Eis inkubiert. 1,5 µl Gelladepuffer wurden hinzugegeben und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 3 Stunden in 1 X MOPS bei 90 Volt. Danach wurde ein Teil des Gels in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt, um die Trennung der RNA zu kontrollieren.

Transfer (Blot):

Das Blotten erfolgte durch Kapillartransfer. Das Gel wurde für 15 Minuten in H_2O und für 15 Minuten in 10 X SSC equilibriert, danach erfolgte der Transfer in 10 X SSC über Nacht auf eine Hybond N+ Membran von Amersham. Anschließend wurde die Membran 2 Stunden bei 80 Grad Celsius gebacken.

Sondenvorbereitung:

1. Kollagen Typ1 alpha1, ATCC 61322, human cDNA , ein 1,8 kb Fragment, welches aus einem Plasmid mit einem Enzym herausgeschnitten werden musste: 0,5 µg

Plasmid, 2 µl 10 X Puffer O+ von Fermentas, 1U EcoR1 (auch Fermentas), 18 µl H_2O wurden vermischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend für 20 Minuten bei 65 Grad Celsius gestoppt, in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und das 1.8 kb Fragment mit dem Gel Extraktionskit von Qiagen isoliert.

2. Ratten cDNA, 1,35 kb Sigma G0789

Beide Sonden wurden nun mit dem Gene Images Random Prime Module von Amersham, RPN 3540 gemäß der Anleitung markiert.

Hybridisieren:

Die Membran wurde nun mit 5 X SSC angefeuchtet, dann 30 Minuten bei 65 Grad Celsius mit 5 X SSC, 0,1 % SDS und 5 % Dextransulfat prähybridisiert. Anschließend konnte die markierte, denaturierte Sonde hinzugefügt und über Nacht bei 65 Grad Celsius hybridisiert werden. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membran: 1 X SSC, 0,1 % SDS 15 Minuten bei 65 Grad Celsius, 0,1 % SSC, 0,1 % SDS 15 Minuten bei 65 Grad Celsius. Die mit Fluorescein markierten hybridisierten Sonden konnten mit dem Gene Images CDP Star Detektion Module von Amersham gemäß der Anleitung detektiert und das Resultat auf einem Film dargestellt werden.

Zuerst wurde die Membran mit der Kollagen Sonde hybridisiert. Anschließend musste noch gezeigt werden, dass überall auf dem Gel die gleiche Menge RNA geladen wurde. Dazu musste die Membran gestrippt werden (3 mal 10 Minuten mit kochendem 0,1 X SSC), dann wieder prähybridisiert um anschließend mit der Ratten cDNA Sonde hybridisiert zu werden. Schließlich erfolgte die Detektion wie gehabt.

3.9 Datenanalyse und Statistik

Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde nach den Bedingungen von ANOVA durchgeführt. Die Test-Kontrolle wurde nach der Methode von Bonferoni durchgeführt.
Alle Experimente wurden unabhängig voneinander sechsmal wiederholt.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsplanung

Durch Ballonangioplastie der A. carotis der Ratte kam es zur Gefäßverengung aufgrund neointimaler Wachstumsvorgänge. Diese Entwicklung wurde über einen Zeitverlauf beobachtet, was zur Feststellung führte, dass 14 Tage nach Ballonangioplastie eine starke neointimale Proliferation stattgefunden hatte. Die nun folgenden Versuche bezogen sich zuerst auf 14 Tage-Werte, vor dem Hintergrund, die Progression der Gefäßverengung zu verhindern, bzw. zu minimieren. Dieses erfolgte durch tägliche Applikation des Pirfenidons (1000 mg/kg KG). Das Medikament wurde täglich oral, zusammen mit dem Futter, verabreicht. Es wurden dilatierte, nicht behandelte Kontrollgruppen mit der Pirfenidon-Gruppe verglichen. Hierzu sollten die histologischen Carotis-Querschnitte morphometrisch bewertet werden.

Um weiterhin die Wirkungsmechanismen des Pirfenidons genauer zu durchleuchten, wurden mit Hilfe der Immunhistochemie die neointimalen Bestandteile spezifiziert und verglichen. Dabei sollte das alpha-Aktin, ein Markerprotein der glatten Gefäßmuskelzellen, dargestellt werden. Weiterhin wurde durch die PCNA-Kernfärbung die proliferative Aktivität der neointimalen Zellen erfasst. Extrazelluläre Matrixbestandteile konnten mit der Picrosirius-Rot Färbung sichtbar gemacht werden. Dieses histochemische Verfahren wurde durch einen Northern Blot zur Darstellung der Genexpression der Kollagen I-spezifischen mRNA ergänzt.

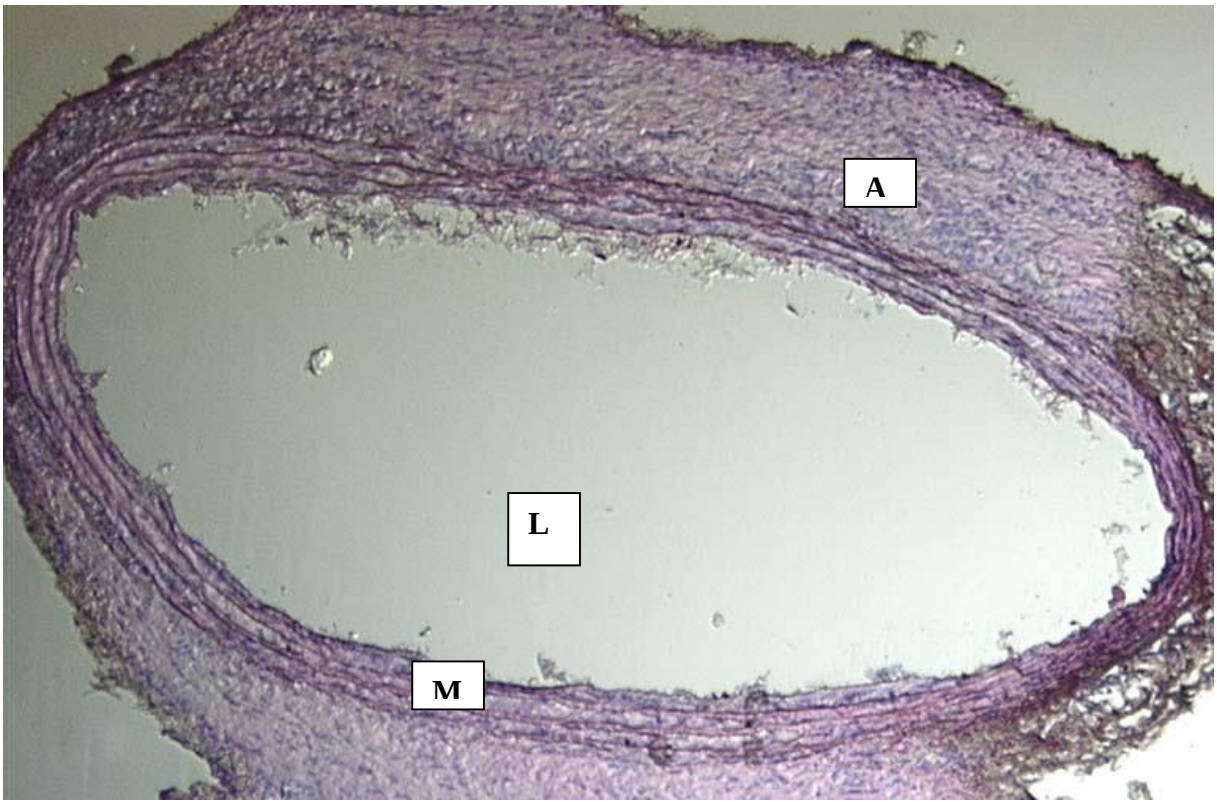
Nach diesen Versuchsreihen sollte nun der weitere Verlauf der Neointimabildung nach Absetzen des Medikamentes untersucht werden. Hierzu wurden die Tiere 14 Tage nach Ballondilatation therapiert, für weitere zwei Wochen wurde dann die Therapie abgesetzt. Es erfolgte der Vergleich mit einer dilatierten nicht therapierten Kontrollgruppe von vier Wochen.

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander sechsmal wiederholt.

4.2 Pirfenidon hemmt die Neointimabildung

In dieser Versuchsreihe wurde die Ballonangioplastie am Ratten-Carotis-Modell durchgeführt.
Es wurden zwei Gruppen zu je sechs Tieren gebildet. Die eine Gruppe erhielt nach Dilatation eine 14tägige orale Pirfenidon-Therapie, die andere Gruppe erfuhr nach Gefäßdenudation keine Therapie und fungierte somit als Kontrollpopulation. Nach Ablauf des zweiwöchigen Zeitraumes wurden die Gefäße entnommen und histologisch aufgearbeitet.

Die folgenden Bilder zeigen Querschnitte der A. carotis nach Haematoxylin-Eosin-Färbung.

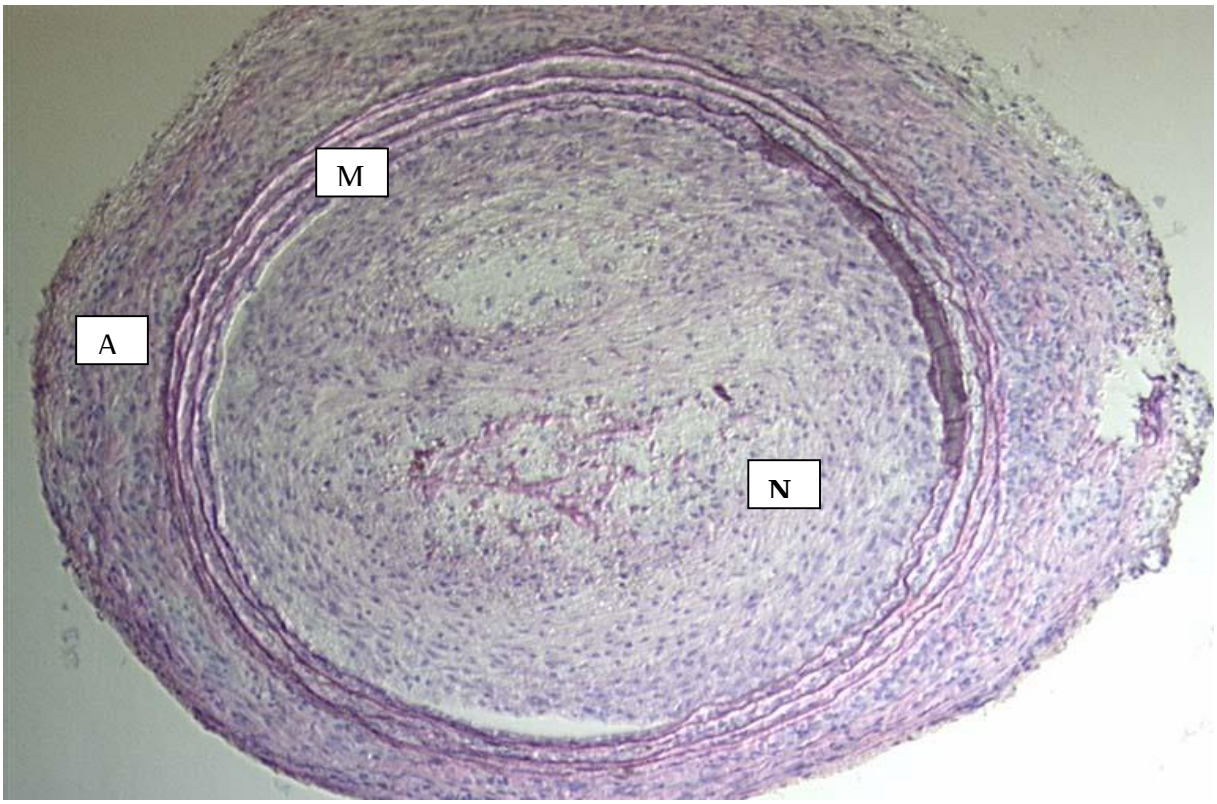


(1 cm entspricht 86,2 µm)

Negativ-Kontrolle à unbehandeltes nicht dilatiertes Gefäß
(M: Media, A: Adventitia, L: Lumen)

Abbildung 4:

Dieses Bild zeigt den Querschnitt einer nicht dilatierten A. carotis. Man erkennt die Strukturen des medialen (M) und adventitialen (A) Anteils. Das Lumen (L) ist frei von neointimalem Gewebe. (M: Media, A: Adventitia, L: Lumen)



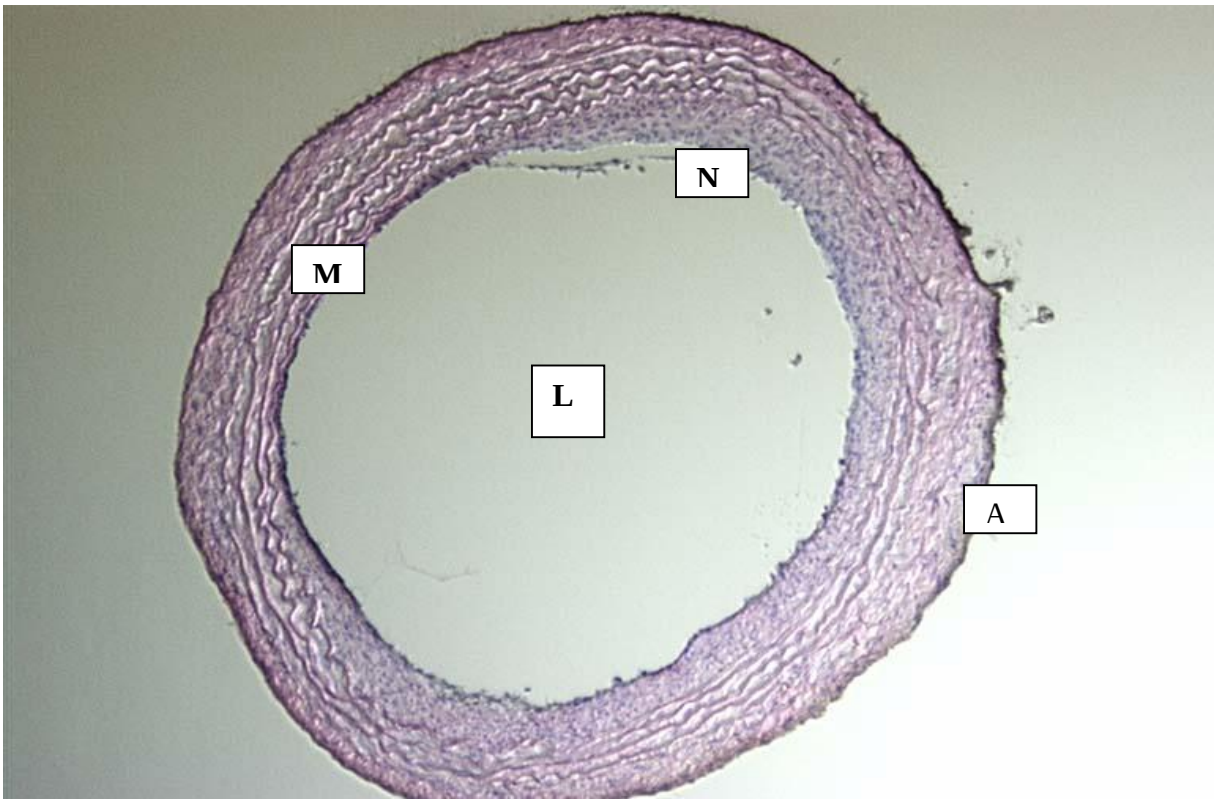
(1 cm entspricht 86,2 µm)

Kontrollgruppe 14 Tage à Dilatation ohne Pirfenidon-Applikation
(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima)

Abbildung 5:

Diese Abbildung zeigt den Querschnitt eines Gefäßes 14 Tage nach Denudation. Es erfolgte keine Pirfenidon-Therapie. Das Gefäßlumen ist durch die neointimale Proliferation (N) deutlich eingeengt. Der mechanische Reiz der Ballonangioplastie induziert innerhalb von zwei Wochen ein starkes neointimales Wachstum.

(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima)



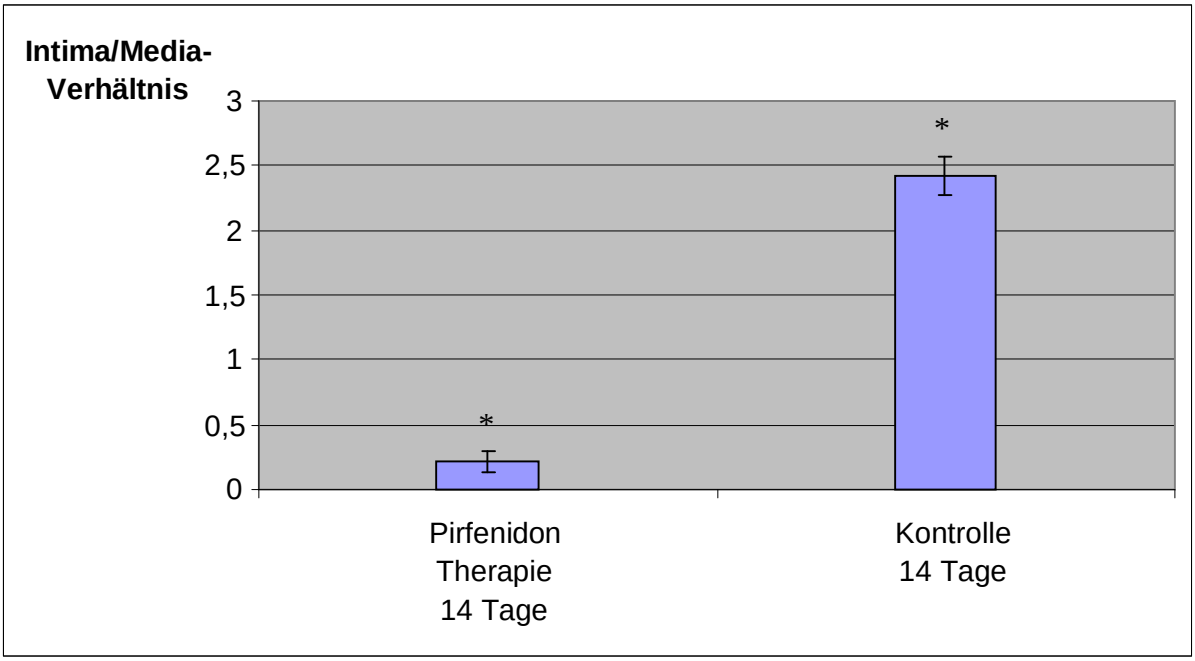
(1 cm entspricht 86,2 µm)

Pirfenidon-Gruppe à Pirfenidon-Applikation für 14 Tage
(M: Media, A: Adventitia, L: Lumen, N: Neointima)

Abbildung 6:

Abbildung 6 zeigt ein dilatiertes Gefäß nach 14-tägiger oraler Pirfenidon Applikation. Dort lässt sich ebenfalls ein randständiges neointimales Wachstum feststellen, die Ausprägung ist jedoch gering im Vergleich zum Kontrollgefäß in Abbildung 5.
(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima L: Lumen)

Dieser Versuch wurde an gleichartigen männlichen Wistar Ratten wiederholt. Die Pirfenidon-Gruppe bestand wie die Kontroll-Gruppe aus sechs Tieren. Nach Haematoxylin-Eosin-Färbung konnte eine computergestützte morphometrische Beurteilung der neointimalen Ausprägung angefertigt werden. Die Ergebnisse hierzu sind in folgender Grafik dargestellt:



* = p<0,001

Abbildung 7:

Zur morphometrischen Darstellung wurde das Intima/Media-Verhältnis gewählt.

Die Gruppe, die für einen Zeitraum von 14 Tagen nach Ballonangioplastie mit Pirfenidon behandelt wurde, zeigt ein Intima/Media-Verhältnis von **0,22 ± 0,08.**

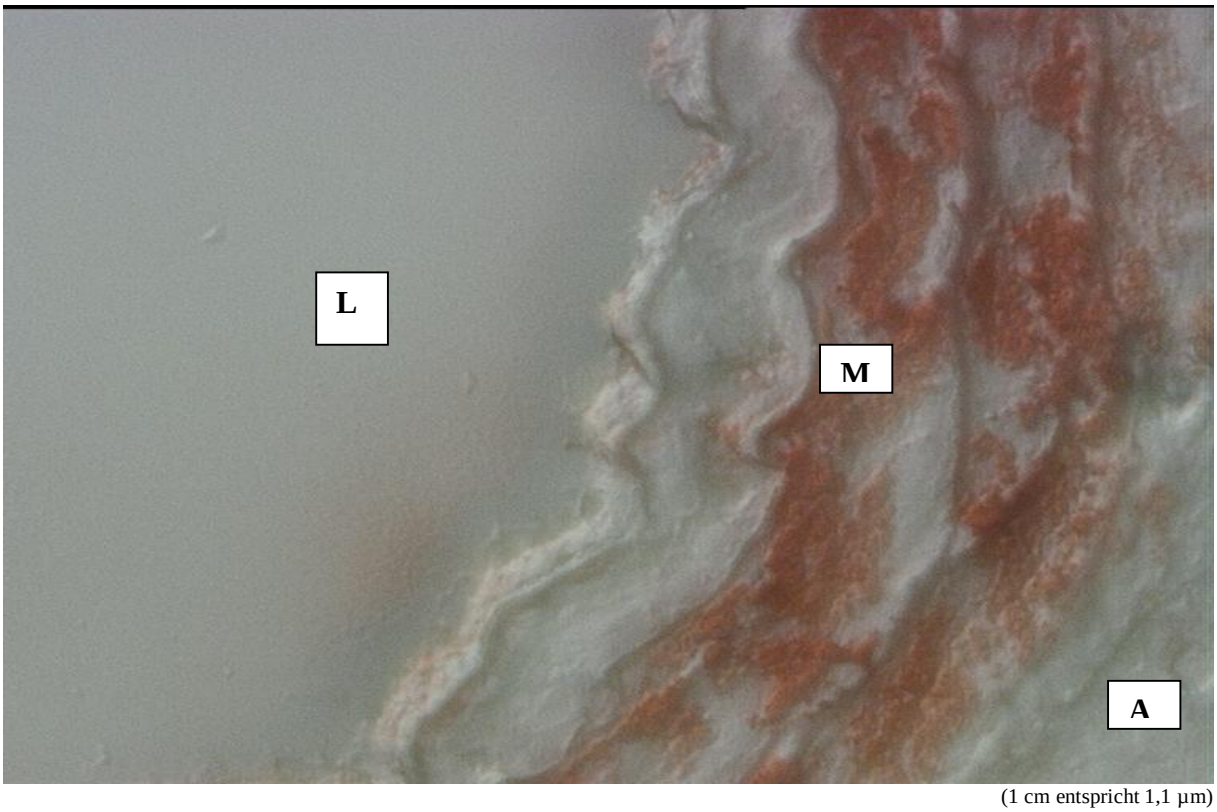
Die neointimale Ausprägung der Kontrollgruppe führte zu einem Verhältnis von **2,42** ± **0,15.**

4.3 Immunhistochemisches Verfahren

Durch immunhistochemische Verfahren sollten im Folgenden die einzelnen Bausteine der Neointima herausgearbeitet werden. Zur Darstellung glatter Gefäßmuskelzellen wurde immunhistochemisch gegen alpha-Aktin gefärbt. Die proliferative Aktivität der neointimalen Zellen wurde durch Anfärbung des proliferativen zytoplasmatischen nukleären Antigens (PCNA) erfasst. Die Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine konnte mittels Picrosirius-Rot Färbung visualisiert werden. Diese Methoden wurden bei der Pirfenidon-Gruppe, genauso wie bei der Kontroll-Gruppe durchgeführt, um Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus des Pirfenidons ziehen zu können.

4.3.1 Pirfenidon beeinflusst nicht die lokale Akkumulation von Gefäßmuskelzellen.

alpha-Aktin Färbung



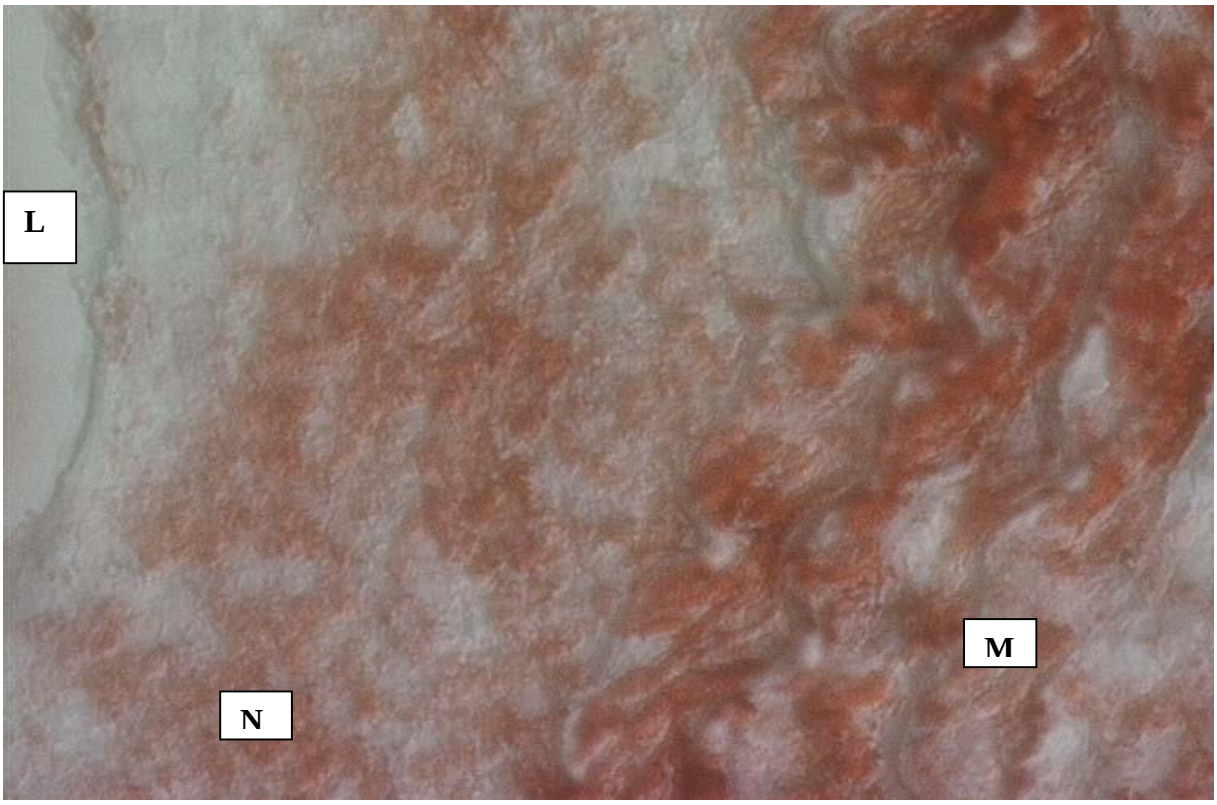
(1 cm entspricht 1,1 µm)

Negativ Kontrolle à unbehandeltes nicht dilatiertes Gefäß
(M: Media, A: Adventitia, L: Lumen)

Abbildung 8a:

Hierbei handelt es sich um eine Negativ-Kontrolle. Dieses Gefäß wurde weder dilatiert, noch mit Pirfenidon behandelt

alpha-Aktin Färbung



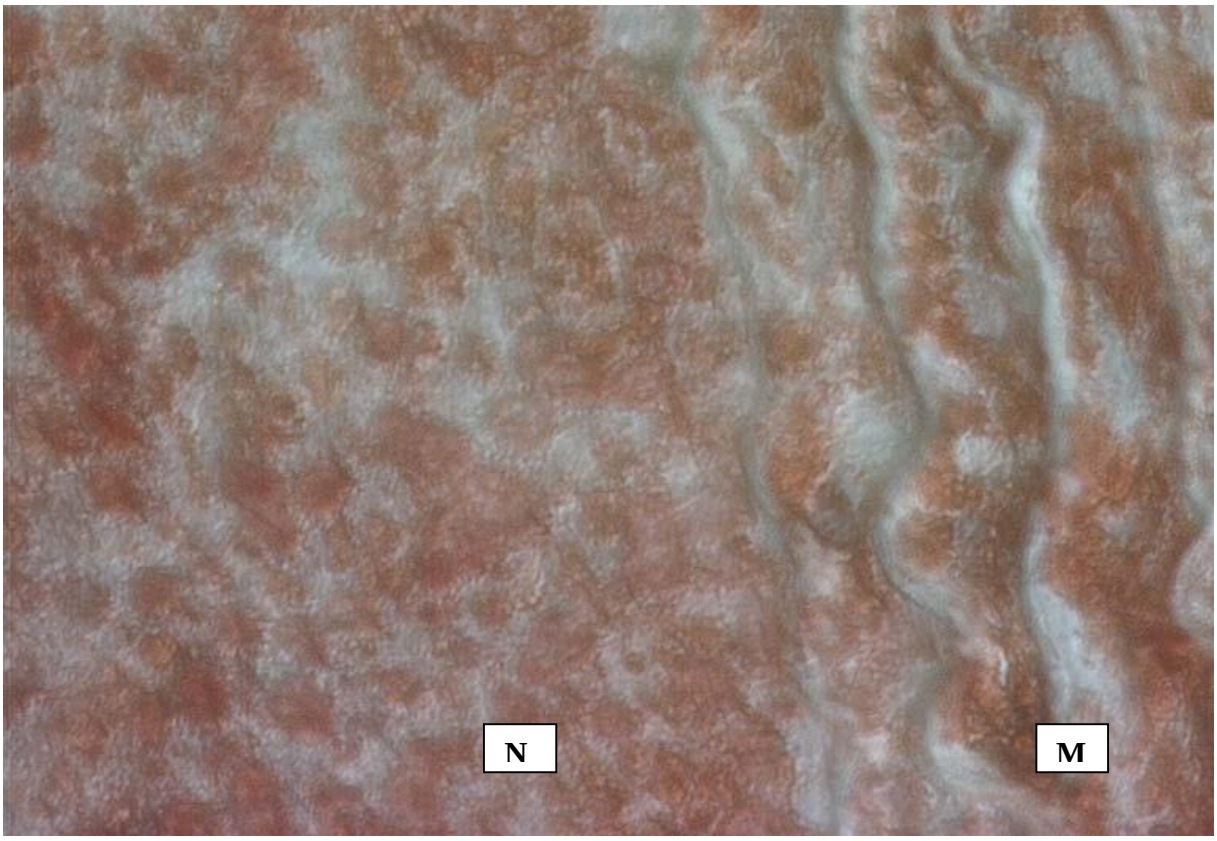
(1 cm entspricht 1,1 µm)

Pirfenidon-Gruppe à Pirfenidon-Applikation für 14 Tage
(M: Media, N: Neointima, L: Lumen)

Abbildung 8b:

Dieser Gefäßquerschnitt stammt aus der Pirfenidon-Gruppe. Das Gefäß wurde dilatiert, anschließen erfolgte eine 14-tägige Therapie mit Pirfenidon.

alpha-Aktin Färbung



(1 cm entspricht 1,1 µm)

Kontroll-Gruppe 14 Tage à Dilatation ohne Pirfenidon-Applikation
(M: Media, N: Neointima)

Abbildung 8c:

Dieses Gefäß stammt aus der Kontrollgruppe. Es erfolgte eine Gefäßdilatation ohne anschließende Pirfenidon-Applikation.

Das Ergebnis dieser Färbung kann nur eine Aussage über den qualitativen Anteil glatter Gefäßmuskelzellen in der Neointima treffen. Die quantitative Bestimmung war aufgrund der unklaren Abgrenzbarkeit der einzelnen Zellen nicht möglich.

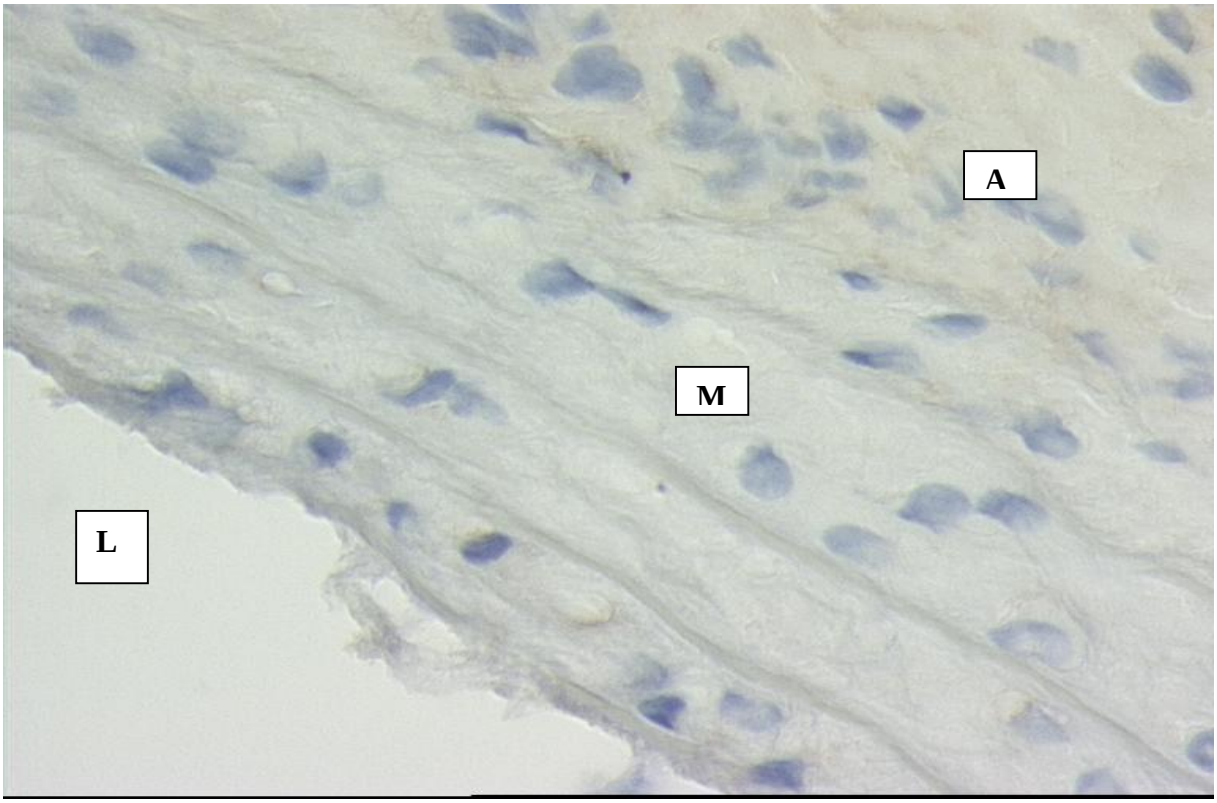
Die Fotografien wurden mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv durchgeführt. Die medialen Strukturen (M) lassen sich von den neointimalen Anteilen (N) abgrenzen. Die braun angefärbten Fasern stellen das alpha-Aktin dar. Die Neointima ist in beiden Gruppen mit diesen Fasern durchsetzt. Diese qualitativen Daten legen nahe, dass Pirfenidon keinen Einfluss auf das Akkumulationsverhalten der glatten Gefäßmuskulatur nach Ballonangioplastie hat.

Die gezeigten Abbildungen sind exemplarisch für sechs unabhängige Experimente.

4.3.2 Pirfenidon beeinflusst nicht die neointimale Proliferation

Die proliferative Aktivität der neointimalen Zellen sollte mit Hilfe der PCNA-Kernfärbung ermittelt werden.

PCNA-Färbung



(1 cm entspricht 1,1 µm)

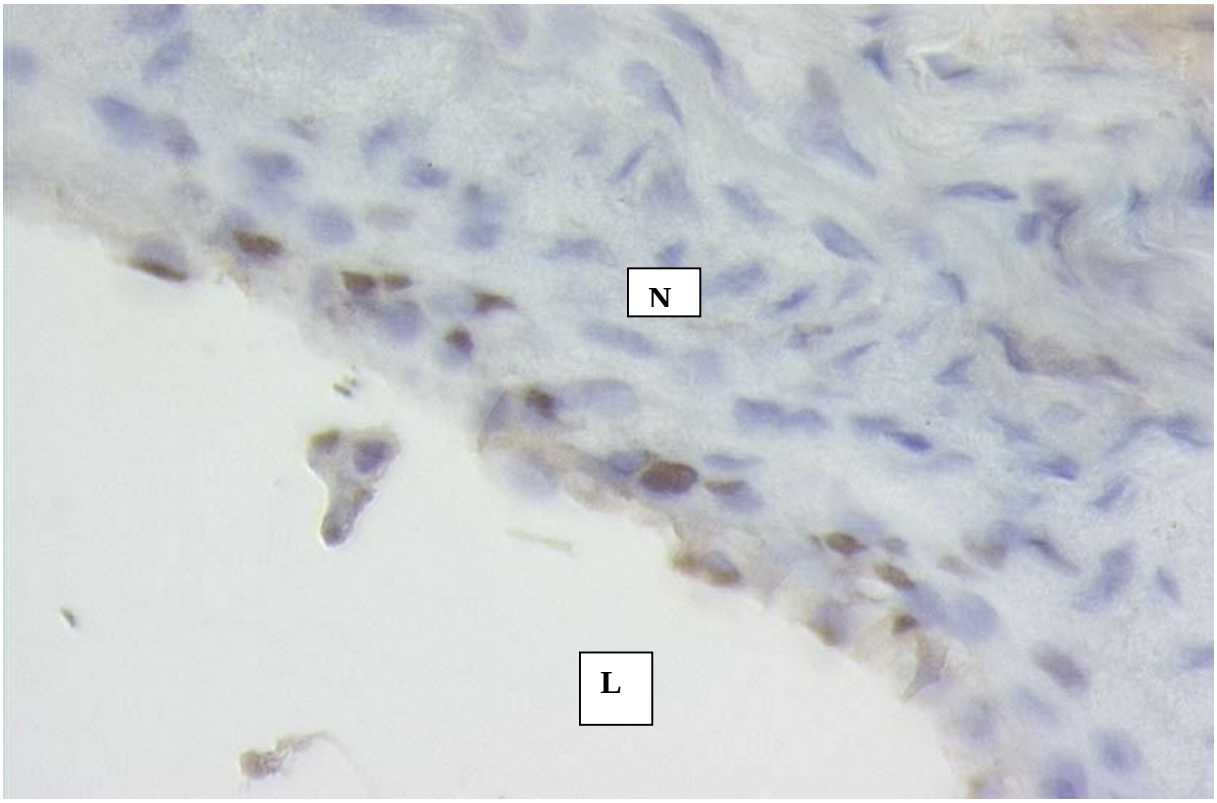
Negativ-Kontrolle à unbehandeltes nicht dilatiertes Gefäß

(M: Media, A: Adventitia, L: Lumen)

Abbildung 9a:

Hierbei handelt es sich um eine Negativ-Kontrolle. Dieses Gefäß wurde weder dilatiert, noch mit Pirfenidon behandelt.

PCNA-Färbung



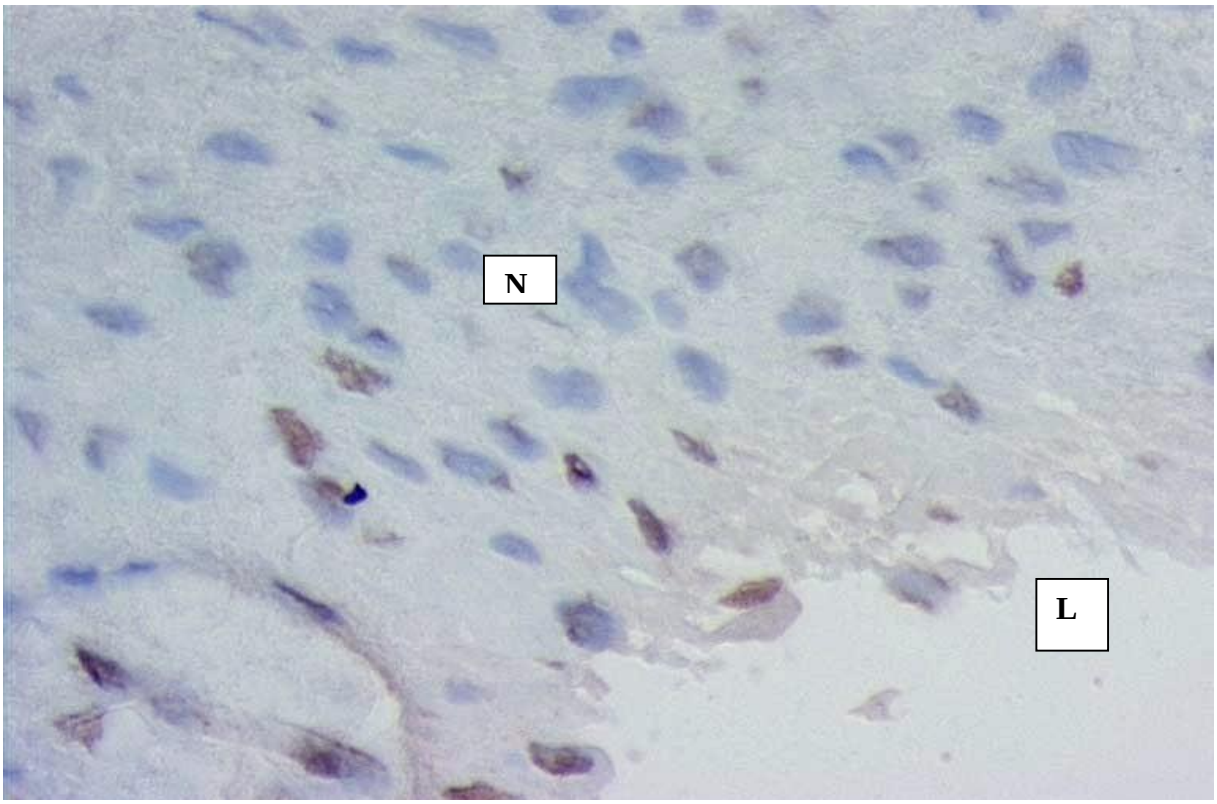
(1 cm entspricht 1,1 µm)

Pirfenidon-Gruppe à Pirfenidon-Applikation für 14 Tage
(N: Neointima, L: Lumen)

Abbildung 9b:

Dieser Gefäßquerschnitt stammt aus der Pirfenidon-Gruppe. Das Gefäß wurde dilatiert, anschließen erfolgte eine 14-tägige Therapie mit Pirfenidon.

PCNA-Färbung



(1 cm entspricht 1,1 µm)

Kontroll-Gruppe 14 Tage à Dilatation ohne Pirfenidon-Applikation
(N: Neointima, L: Lumen)

Abbildung 9c:

Dieses Gefäß stammt aus der Kontrollgruppe. Es erfolgte eine Gefäßdilatation ohne anschließende Pirfenidon-Applikation.

Die Aufnahmen 9a, 9b, und 9c wurden mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv durchgeführt.

Die braun-grau angefärbten Zellkerne deuten auf das hochregulierte PCNA hin, was den Vorgang der Zellteilung nahe legt. Die braun gefärbten Zellkerne wurden ausgezählt, und zu der Zahl der Gesamtkerne ins Verhältnis gesetzt. Diese Quantifizierung wurde ebenfalls an sechs mit Pirfenidon therapierten Tieren, wie auch an sechs Kontrolltieren wiederholt. Die Auszählungsergebnisse sind in folgender Grafik dargestellt:

PCNA-positive Zellkerne in (%)

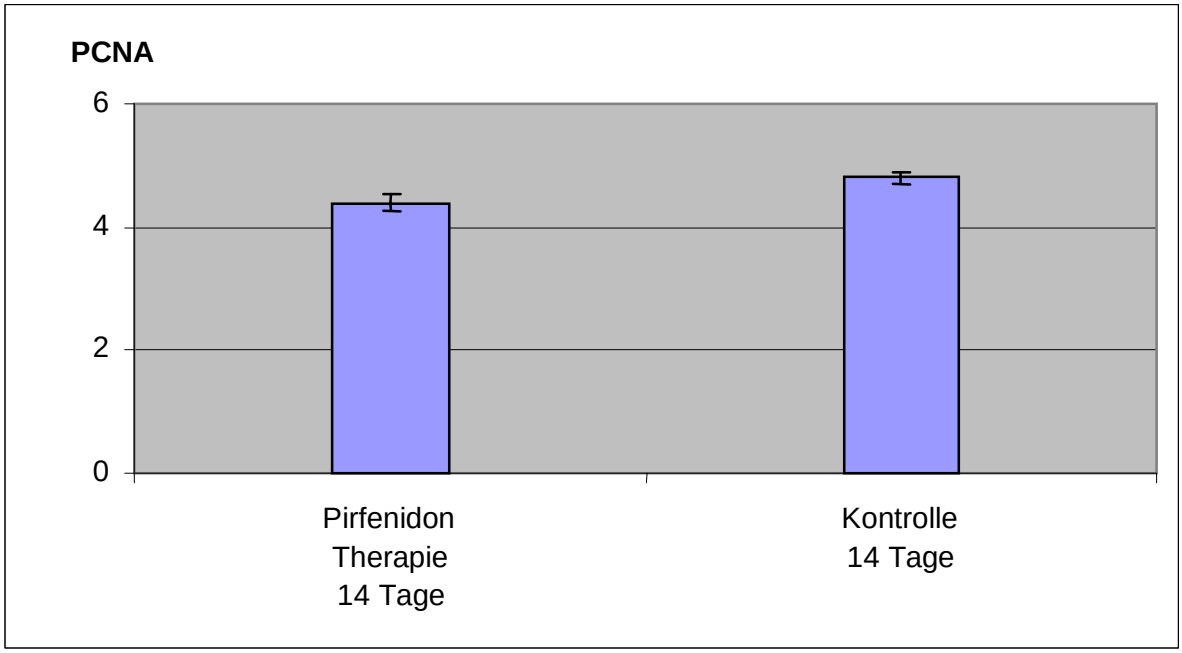


Abbildung 10

Die Statistik zeigt keinen deutlichen Unterschied zwischen der Pirfenidon- und Kontrollgruppe.

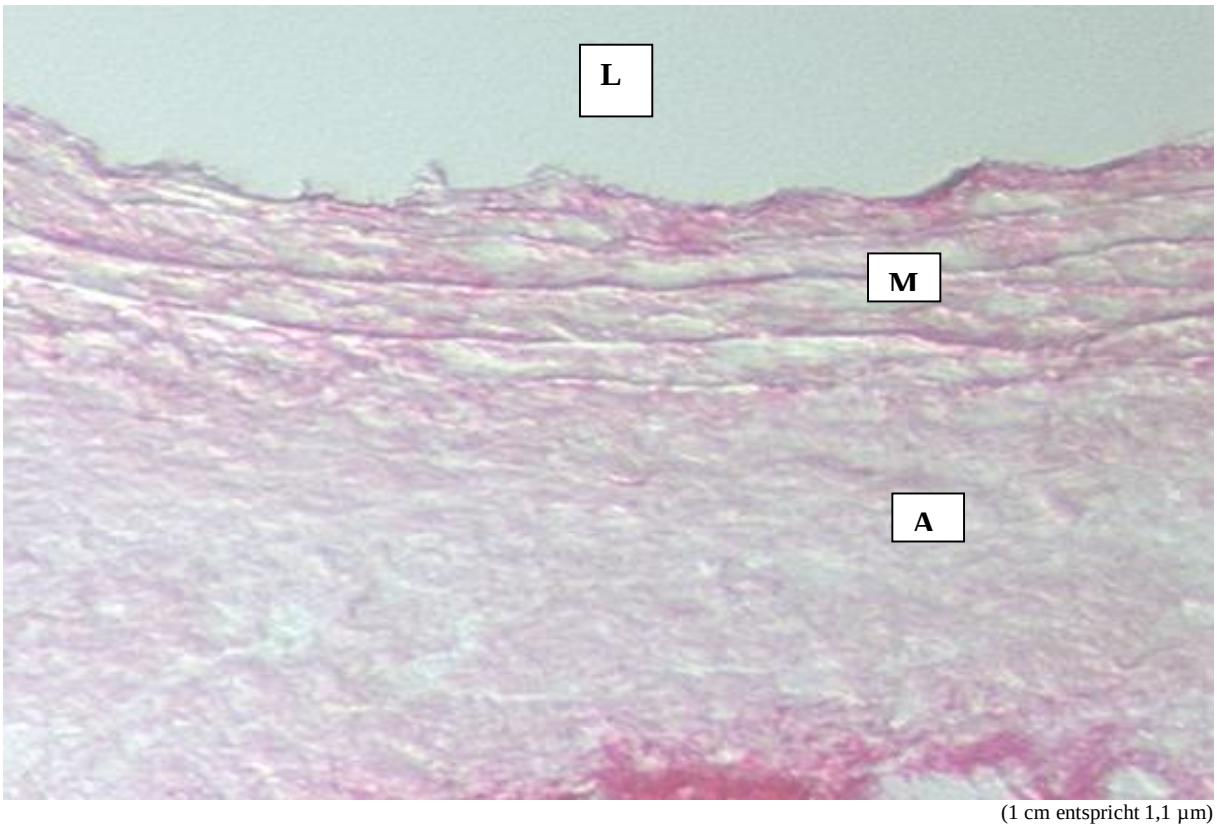
Nach Auszählung der PCNA positiven Zellkerne in der Pirfenidon-Gruppe ergab sich ein Anteil von **4,4 % ± 0,1 %.** Die Kontroll-Gruppe zeigte, dass **4,8 % ± 0,1 %** der neointimalen Zellkerne ein PCNA-positives Signal präsentierten.

Der Unterschied ist gering und erlaubt die Anmerkung, dass Pirfenidon keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten neointimaler Zellen hat.

4.3.3 Pirfenidon verhindert die lokale Akkumulation extrazellulärer Matrix

Die Produktion und Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine, hauptsächlich durch Gefäßmuskelzellen, stellt einen weiteren Grundpfeiler der Neointima-Bildung dar.
Die Matrixbestandteile wurden in dieser Versuchsreihe mit Picrosirius Rot immunhistochemisch angefärbt.

Picrosirius Rot Färbung



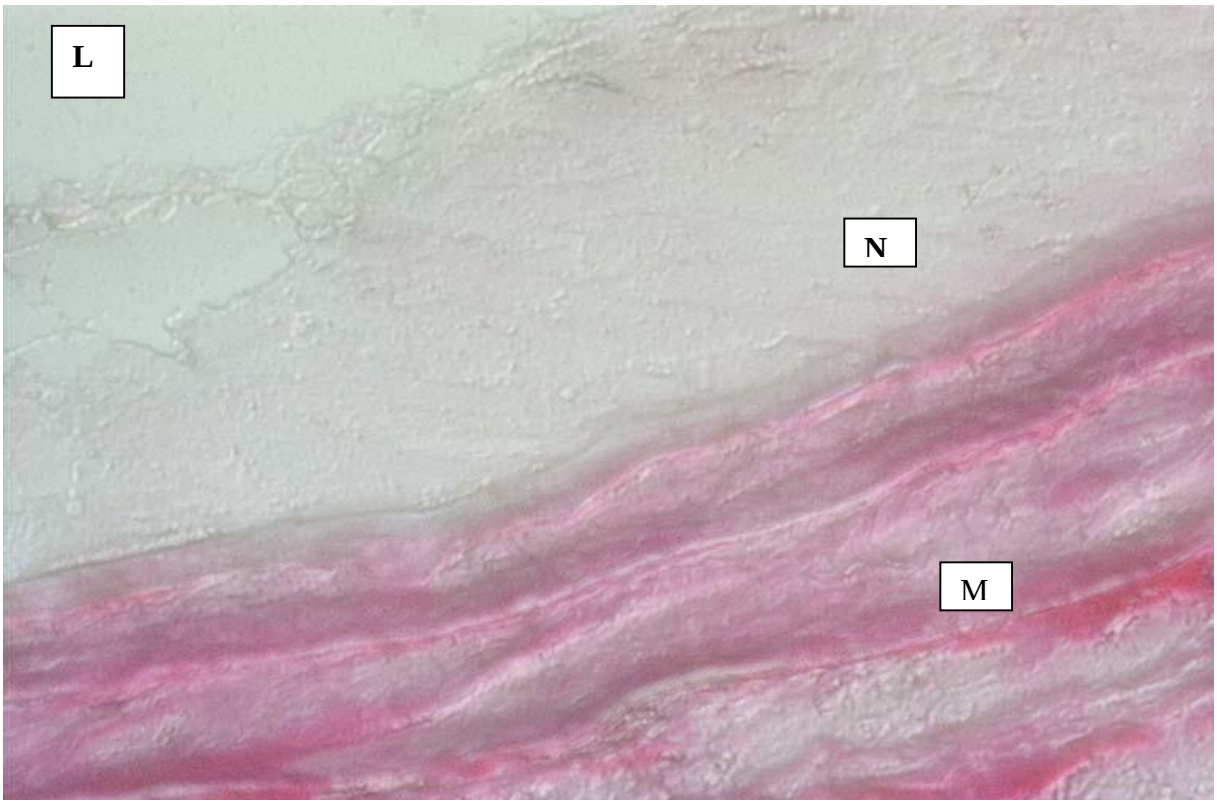
(1 cm entspricht 1,1 µm)

Negativ Kontrolle à unbehandeltes nicht dilatiertes Gefäß
(M: Media, A: Adventitia, L: Lumen)

Abbildung 11a:

Hierbei handelt es sich um eine Negativ-Kontrolle. Dieses Gefäß wurde weder dilatiert, noch mit Pirfenidon behandelt. Die rot gefärbten Fasern stellen den kollagenen Anteil dar.

Picrosirius Rot Färbung



(1 cm entspricht 1,1 µm)

Pirfenidon-Gruppe à Pirfenidon Applikation 14 Tage
(M: Media, N: Neointima, L: Lumen)

Abbildung 11b:

Abbildung 11b zeigt die Aufnahme einer mit Pirfenidon behandelten A. carotis 14 Tage nach Denudation, die mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv gemacht wurde. Die medialen Wandbestandteile (M) sind mit rot angefärbten Fasern durchsetzt. In den neointimalen Abschnitten (N) lassen sich keine roten Strukturen erkennen.

Picrosirius Rot Färbung (Darstellung mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv)

(1 cm entspricht 1,1 µm)

Kontroll-Gruppe 14 Tage à Dilatation ohne Pirfenidon-Applikation

(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima)

Abbildung 11c:

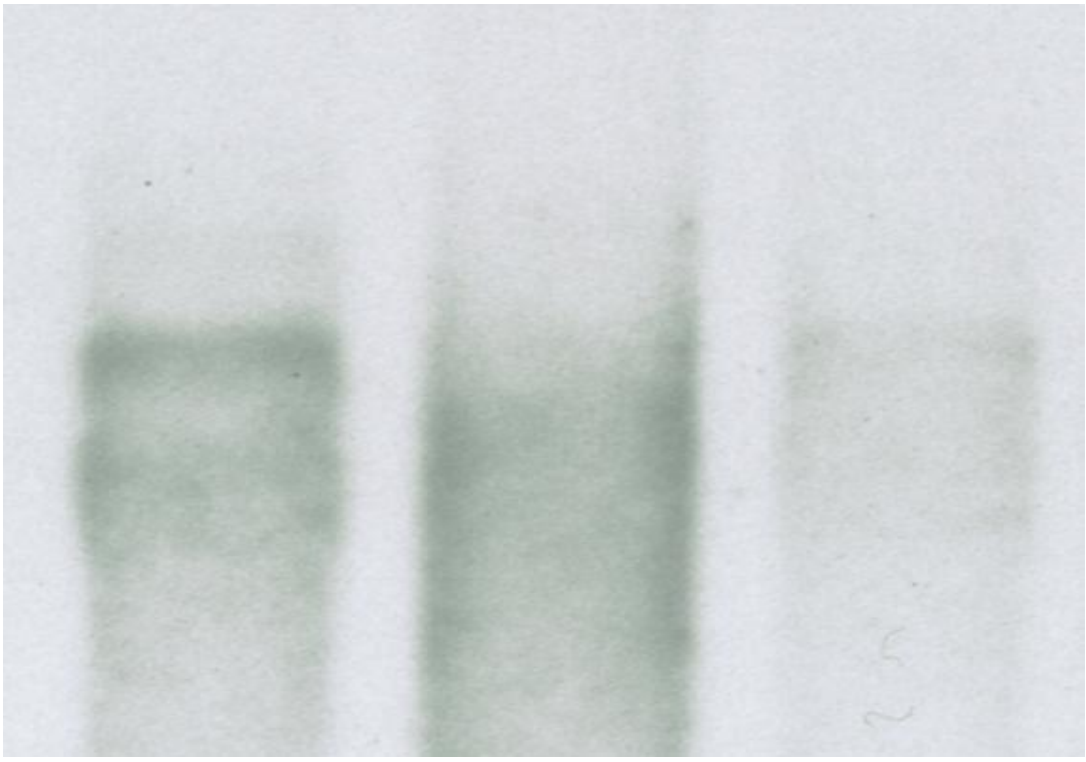
Dieses Gefäß stammt aus der Kontrollgruppe. Es erfolgte eine Gefäßdilatation ohne anschließende Pirfenidon-Applikation.

Vergleicht man die A. carotis des Kontrolltieres in Abbildung 11c mit Abbildung 11b, so lässt sich ein Unterschied in der Intensität der Rotfärbung im neointimalen Bereich erkennen. Die Neointima (N) des Kontrolltieres weist eine starke Durchsetzung von extrazellulären Matrixproteinen auf. Pirfenidon scheint vorwiegend über die Hemmung der Produktion und Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine die Bildung einer Neointima zu verhindern.

Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für sechs unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

4.4 Darstellung der Kollagen I-spezifischen Genexpression auf mRNA Ebene durch das Northern-Blot Verfahren

Mit Hilfe des Northern Blot-Verfahrens sollte die Kollagen I-spezifische Genexpression auf mRNA Ebene in den Carotiden ermittelt werden. Dieses biochemische Verfahren sollte die Wirkung des Pirfenidons auf die extrazelluläre Matrix genauer hervorheben und diente als Ergänzung der Picrosirius-Rot Färbung, wie sie unter Abbildung 11a, 11b und 11c dargestellt wurde. Das Kollagen Typ I wurde als Markerprotein für die extrazelluläre Matrix angesehen.



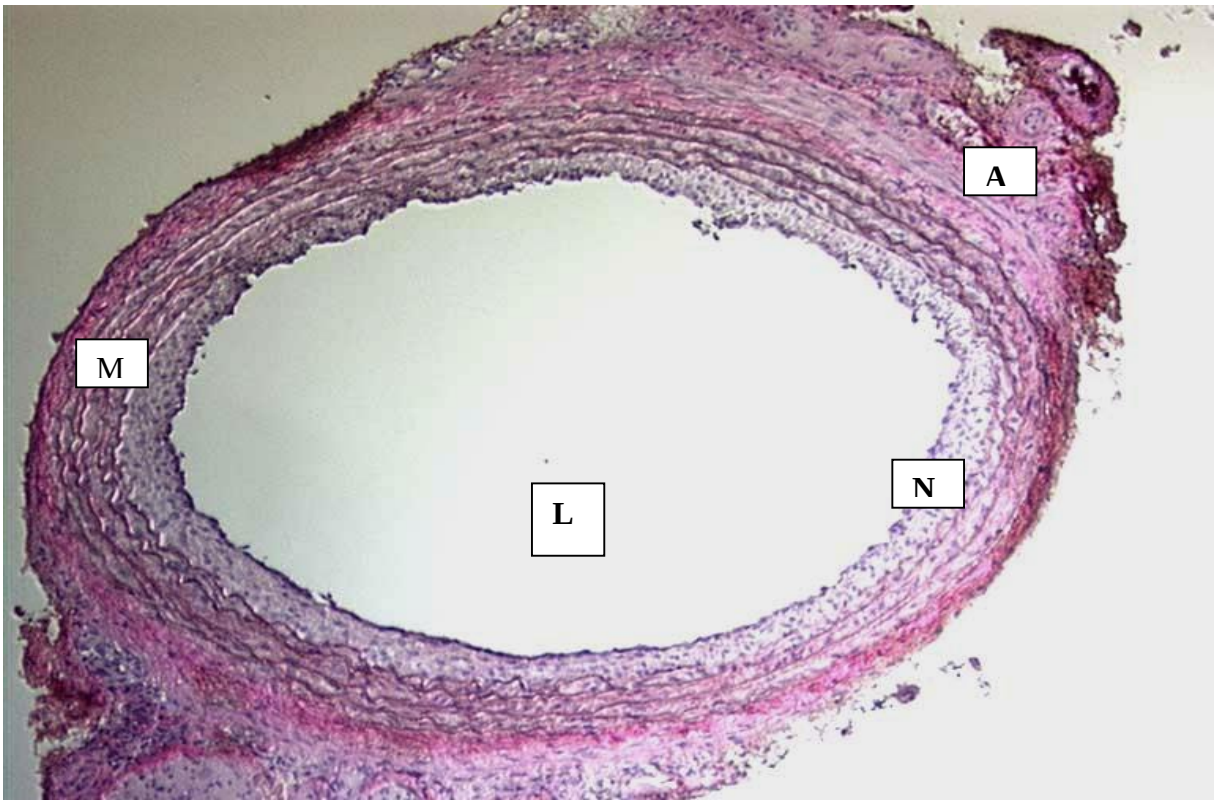
dilatiert 14 Tage **undilatiert** **dilatiert + Pirfenidon-Applikation 14 Tage**

Abbildung 12

Das Ergebnis des Northern Blots bestätigt das Resultat der Picrosirius-Rot Färbung. Die Pirfenidon-Gruppe weist eine deutlich reduzierte Genexpression der Kollagen I- spezifischen mRNA auf. Dieses Ergebnis wurde in drei unabhängigen Versuchen bestätigt.

4.5 Neointimabildung nach Absetzen des Pirfenidons

Diese Versuchsreihe sollte die neointimale Entwicklung nach Beendigung der Pirfenidon-Therapie untersuchen. Eine Gruppe, bestehend aus sechs Tieren, wurde die ersten 14 Tage nach Angioplastie mit der Substanz behandelt, danach erfolgte ein Therapieabbruch für weitere 14 Tage. Demgegenüber stand eine gleich große Kontrollgruppe, die nur der Carotisdilatation unterzogen wurde. Nach Ablauf von 4 Wochen kam es zur histologischen Aufarbeitung der jeweiligen Carotiden.



(1 cm entspricht 86,2 µm)

14-tägige Pirfenidon-Therapie. Anschließender Therapieabbruch für weitere 2 Wochen.
(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima, L: Lumen)

Abbildung 13:

In Abbildung 13 sieht man eine A. carotis in Haematoxylin-Eosin Färbung. Es handelt sich um ein Präparat aus der Pirfenidon-Gruppe. Hier lässt sich eine randständige neointimale Struktur erkennen, die sich jedoch in ihrer Ausprägung kaum von Abbildung 6 unterscheiden lässt.

(1 cm entspricht 86,2 µm)

Kontroll-Gruppe 14 Tage à Dilatation ohne Pirfenidon-Applikation

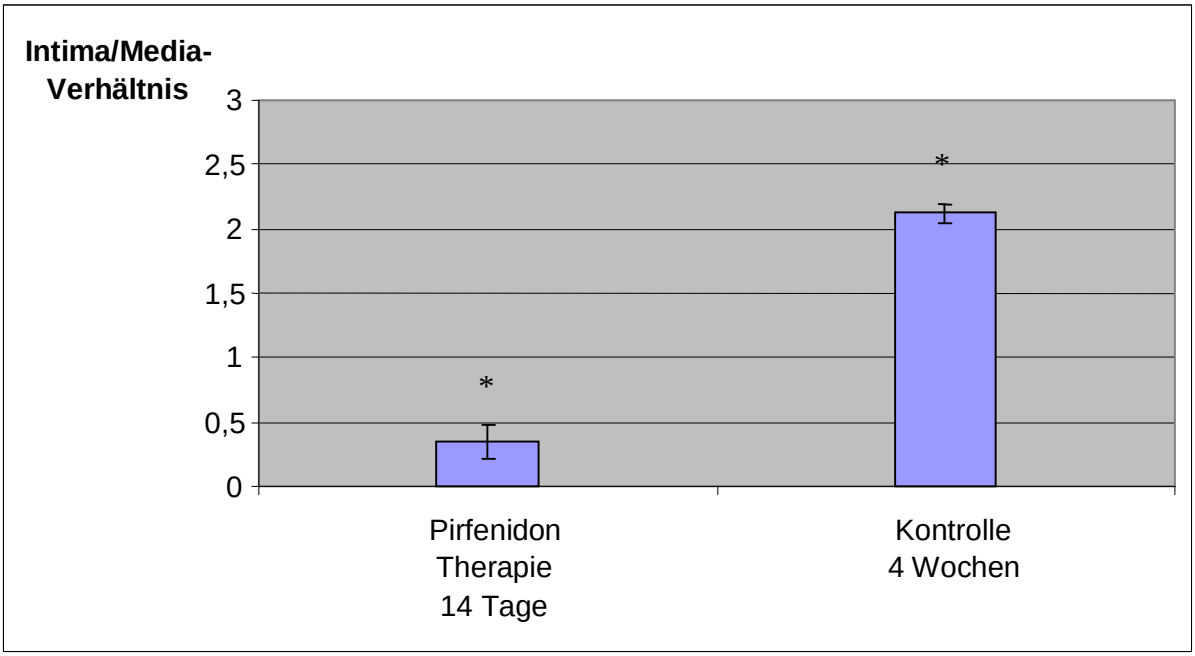
(M: Media, A: Adventitia, N: Neointima)

Abbildung 14:

Das Präparat in Abbildung 14 stammt aus der 4-wöchigen Kontrollgruppe und zeigt eine starke Lumeneinengung im Querschnitt der dilatierten A. carotis.

Dieser Versuch wurde ebenfalls an sechs Tieren pro Gruppe wiederholt. Die jeweiligen histologischen Querschnitte konnten dann nach morphometrischen Gesichtspunkten untersucht werden, um schließlich die Intima/Media-Ratio quantitativ zu bestimmen.

Das Ergebnis ist aus Abbildung 15 ersichtlich.



* = p<0,001

Abbildung 15:

Die Grafik in Abbildung 15 stellt unter Berücksichtigung aller verwendeten Tiere den Unterschied des Intima/Media-Verhältnisses zwischen Pirfenidon- und Kontroll-Gruppe dar. Das Verhältnis der Pirfenidon-Gruppe liegt bei **0,35 ± 0,13**, während die Kontrollgruppe einen Wert von **2,12 ± 0,07** erreicht.

Aus diesen Ergebnissen erschließt sich, dass die Neointima 14 Tage nach Therapieabbruch in ihrer Quantität nicht weiter zugenommen hat.

Auch der Vergleich der unbehandelten Tiere zeigt, dass die Neointima vom 14. Tag (2,42 $\pm$ 0,15, siehe Abb.7) bis Tag 28 nicht weiter zugenommen hat.

Dieser Versuch wurde ebenfalls sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt.

5. Diskussion

Vaskuloproliferative Erkrankungen, wie die Atherosklerose, die Restenose nach Ballonangioplastie, die Venen-Bypass-Erkrankungen und die Transplantatvaskulopathie, stellen weiterhin die primäre Ursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt dar (Herrman et al. 1993a; Herrman et al. 1993b).

Durch funktionsgestörte Endothelzellen, inflammatorische Zellen, Thrombozyten und glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) kommt es in der Folge zur Freisetzung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Ross, 1995). Die subsequente Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen in Verbindung mit der Zellzyklusinitiierung, die gesteigerte Zellmigration, die Expression chemotaktisch wirkender Mediatoren und Adhäsionsmoleküle und die Produktion extrazellulärer Matrixproteine stellen die einzelnen Bestandteile vaskuloproliferativer Erkrankungen dar (Braun-Dullaeus et al. 1998). Der primäre pathophysiologische Mechanismus vieler vaskulärer Erkrankungen ist die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC). In der Klinik werden heute verschiedene antiproliferativ wirkende Substanzen erfolgreich eingesetzt, um die Zahl der Restenosen zu minimieren. Ein vielversprechendes Medikament ist das Rapamycin (Sirolimus), was neben seiner immunsuppressorischen Wirkung auch eine blockierende Wirkung auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) aufweist (Gregory et al. 1993). Eine weitere vielversprechende Substanz ist Paclitaxel (Taxol), welches eine zytostatische Aktivität besitzt, die ursprünglich in der Behandlung des Ovarialkarzinoms angewandt wurde. Taxol wirkt der neointimalen Formation in Tiermodellen entgegen. Beide Substanzen sind derzeit erfolgreich in Form beschichteter Stents in die Klinik eingeführt (RAVEL, SIRIUS, TAXUS). Auch die Markierung eines Stents mit ß- oder γ-strahlenden Isotopen reduzieren neointimale Proliferationen (Grise et al. 1999; Waksman et al. 2000).
Neben der Proliferation VSMCs hat die Bildung extrazellulärer Matrixproteine einen bedeutenden Anteil an der neointimalen Gefäßstenosierung. Gerade in restenotisch veränderten Gefäßläsionen besteht die Neointima nur zu 11% aus zellulären Bestandteilen, der Rest hingegen aus extazellulärer Matrix (Schwartz et al. 1992). Das Ziel dieser Studie war, die Matrixbildung als therapeutisches „target“ zur Verhinderung der Neointimabildung zu untersuchen.

5.1 Die Bedeutung extrazellulärer Matrixbildung im Restenoseprozess

Neben der gesteigerten Zellzyklusinitiierung spielt die dysregulierte Matrixproduktion ortsständiger glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) bei der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen eine bedeutende Rolle.

Bei Primaten konnte festgestellt werden, dass thrombozytogene Produkte zu einer gesteigerten Kollagensynthese führen (Burke and Ross 1977). Der „Transforming-Growth-Factor-ß“ (TGF-ß), ein Produkt der Thrombozyten sowie der Monozyten und Makrophagen, aber auch der vaskulären Endothel- und Muskelzellen, konnte als bedeutender Regulator der kollagenen Gen-Aktivität in Fibroblasten und VSMC’s herausgestellt werden (Liau and Chan, 1989; Liau et al. 1985). Phagozytäre Leukozyten, die sich am Ort der Läsion finden, produzieren „Interleukin1“ (IL1), „Tumor-Necrosis-Factor“ (TNF) und TGF-ß. Diese Substanzen beeinflussen die Funktionen der Endothel-, sowie der glatten Gefäßmuskelzellen. Die beiden vaskulären Zelltypen (Endothel, VSMC) reagieren nicht nur auf IL1, TNF und TGF-ß, sondern können auch selbst Gene expremieren, die diese Mediatoren kodieren.

Maximale Konzentrationen des IL1 fördern die Kollagen-Produktion in einem geringeren Maße als Faktoren wie „Platelet-Derived-Growth-Factor“ (PDGF) oder TGF-ß. Die Ursache liegt in der Tatsache, dass IL1 bei seiner Wirkung auf die VSMC’s zuerst die Expression von PDGF-A oder „basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF) induziert, die ihrerseits erst auf die Gefäßwandzellen einwirken können. Der Effekt des IL1 ist also indirekter Natur (Raines et al. 1989). Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren, wie sie in mesenchymalen Zellen stattfinden, beziehen sich möglicherweise auch auf die Gefäßwand. Beispielsweise stimuliert PDGF die TGF-ß-Produktion (Pierce et al. 1989). Umgekehrt induziert TGF-ß die Bildung des PDGF und moduliert darüber hinaus die Expression der PDGF-Rezeptoren. (Majack et al. 1990). Genauso wie IL1 und PDGF kann TGF-ß die Expression des eigenen Gens induzieren. (van Obberghen-Schilling et al. 1988).

Neben den Makrophagen konnten auch Infiltrate von T-Lymphozyten in den Regionen der Gefäßläsion beobachtet werden (Jonasson et al. 1986; Tsukada et al. 1986; Emeson and Robertson, 1988). Diese Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche einen IL-2 Rezeptor, der als Marker für die Aktivität der Zelle fungiert (Hansson et al. 1989). Aktivierte T-Lymphozyten sezernieren ihrerseits „Interferon-gamma“ (IFN-γ), ein Lymphokin mit verschiedenen Wirkungen auf die glatte Gefäßmuskelzelle. Die Inkubation humaner VSMC’s mit IFN-γ führte beispielsweise zur Hemmung des PDGF- oder IL1 induzierten Wachstums (Hansson et al. 1988).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Beobachtungen zeigen multilaterale zelluläre Interaktion auf. Diese dienen der Erhaltung der Homöostase in der Gefäßwand und spielen eine zentrale Rolle für die Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen.
Somit stellt die Matrixbildung, als Endstrecke der oben beschriebenen Faktoren, einen interessanten Ansatz zur Hemmung der Neointimabildung dar.

5.2 Pirfenidon, ein Inhibitor der Neointimabildung!

Viele indirekt wirkende antiproliferative Substanzen sind bereits im Hinblick auf Verhinderung einer Restenose nach Ballonangioplastie oder Venenbypass-Implantation erprobt worden, so z.B. Heparin, ACE-Inhibitoren, Wachstumsfaktor-Inhibitoren (Terbinafin oder Trapidil, beides Inhibitoren des PDGF), Angiopeptin, Zytostatika (wie Etoposid und Doxorubizin), Kalzium-Calmodulin-Antagonisten oder das Spindelgift Colchicin. Obwohl im Tierexperiment erfolgreich getestet, konnten klinische Studien beim Menschen keinerlei Effekt erzielen. (Herrman et al. 1993a; Herrman et al. 1993b). Dies mag an Speziesunterschieden liegen oder daran, dass in Tiermodellen in der Regel eskalierende Dosen einer Substanz verabreicht werden können.
Dagegen konnte in klinischen Studien eine antiproliferative Wirkung bei mit Taxol, Rapamycin und Isotopen besetzten Stents nachgewiesen werden, was im Kapitel 5 genauer beschrieben wurde.
Der Beweis für die breite antifibrotische Wirkung des Pirfenidons wurde durch eine Vielzahl von Studien bezüglich fibrotischer Erkrankungsprozesse angestellt. Diese Forschungen fanden an in vivo Tiermodellen mit fibrotischen Erkrankungen und den damit assoziierten organischen Dysfunktionen statt. Beispielsweise am Hamstermodell der Bleomycin induzierten Lungenfibrose konnte eine präventive Wirkung des Pirfenidons nachgewiesen werden (Iyer et al. 1995; Gurujeyalakshmi et al. 1999). Auch der experimentell induzierten Glomerulosklerose der Maus konnte durch orale Pirfenidon-Applikation entgegengewirkt werden. (Park et al. 2003). Die chemisch induzierte Peritonealsklerose im Rattenmodell konnte ebenfalls durch die orale Gabe von Pirfenidon in ihrem Fortschreiten gehindert werden (Suga et al. 1995). Darüber hinaus konnte die Wirkung der Substanz auch bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose im Endstadium, im Rahmen einer Phase II Studie, beobachtet werden (Raghu et al. 1999). Auch in vitro Versuche mit humanen mesenchymalen Zellkulturen aus Lungenfibroblasten, dermalen Fibroblasten, Prostatagewebszellen und

renalen Mesenchymzellen zeigten einerseits die inhibierende Wirkung auf die exzessive Proliferation dieser Zellen, andererseits konnte ein hemmender Einfluss auf die TGF-ß induzierte Produktion extrazellulärer Matrixproteine festgestellt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Pirfenidon die TGF-ß, PDGF, bFGF und EGF getriggerte Proliferation mesenchymaler Zellen blockiert wird (Iyer et al. 1999; Gurujeyalakshmi et al. 1999).

5.2.1 Der Wirkungsmechanismus des Pirfenidons

Zu diesem Zeitpunkt ist der genaue Wirkungsmechanismus dieser Substanz nur unvollständig bekannt. Die Fähigkeit des Pirfenidons direkt oder indirekt die Wirkungen zentraler Wachstumsfaktoren (TGF-ß, EGF, PDGF, bFGF) zu blockieren, legt die Vermutung nahe, dass der Wirkungsort im Nukleus der Zelle lokalisiert ist. Hier könnte es auf prätranskriptioneller Ebene entsprechende Sequenzen belegen und damit in Wechselwirkungen mit Signalproteinen treten, wodurch der Transkriptionsprozess der oben beschriebenen Wachstumsfaktoren unterbunden wird (Iyer et al. 1999). Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt jedoch eine ausschließliche Inhibition der Matrixsynthese. Die antiproliferative Wirkung durch Hemmung von EGF, PDGF und bFGF wie sei durch Iyer et al. beschrieben wird konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 4 Abschnitt 4.3.2).

5.3 Ergebnisdeutung

Die Motivation dieser Arbeit bestand darin, den Effekt des Pirfenidons auf das Ratten-Carotis-Modell zu übertragen. Da bei vaskuloproliferativen Erkrankungen, wie oben beschrieben, die Neointimabildung auf zwei Säulen basiert, der Proliferation und Matrixdeposition, sollte diese Versuchsreihe eine Alternative bzw. eine Ergänzung zu den klinisch erfolgreichen antiproliferativen Substanzen (Rapamycin, Taxol u.a.) darstellen.
Mit der anfänglichen Überlegung durch Pirfenidon sowohl Proliferation als auch Matrixdeposition zu beeinflussen, stellte sich während des Versuchs eine primäre Wirkung auf die Matrixsynthese heraus. Trotzdem weist dieser Therapieversuch einen neuen Ansatz zur Behandlung vaskulärer proliferativer Erkrankungen auf, wenn man bedenkt, dass der neointimale Aufbau nur zu 11% aus Zellproliferationen besteht, während der Anteil extrazellulärer Matrixproteine die restlichen 89% ausmacht (Schwartz et al. 1992). Eine ausschließliche Matrix-Inhibition würde also eine deutliche Verminderung der Restenose nach Ballonangioplastie hervorrufen.
Vergleicht man die Ergebnisse aus Kapitel 4.2 mit denen aus Kapitel 4.5 sieht man, dass die Substanz seine zentrale Wirkung in den ersten 14 Tagen aufweist, denn die neointimale Ausbreitung nimmt nach dem Therapieabbruch (Kapitel 4.5) kaum zu. Daraus lässt sich folgern, dass Pirfenidon über die Applikationszeit von 14 Tagen hinaus wirkt, bzw. dass die ersten 14 Tage die Zeit der aktivsten Wachstumsvorgänge repräsentieren.

Die Wirkung des Pirfenidons auf den atherosklerotischen Plaque soll an dieser Stelle kritisch durchleuchtet werden. Wie oben beschrieben synthetisieren die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) die kollagenen Strukturen extrazellulärer Matrixproteine. Kollagen I ist hier ein zentraler Matrixbestandteil, der eine bedeutende Rolle bezüglich der Plaque-Stabilisierung einnimmt. Eine Plaque-Instabilität kann zur Plaque-Ruptur führen, was die Organisation eines thrombotischen Verschlusses nach sich ziehen kann. Diese Kausalität ist vielfach verantwortlich für die Entstehung eines Herzinfarktes oder eines apoplektischen Insultes. Metalloproteinasen, gebildet von ortsständigen Makrophagen sind beispielsweise verantwortlich für die kollagene Proteolyse (Aikawa et al.1998; Newby et al. 1997). Wie aus Kapitel 4.4 ersichtlich inhibiert auch Pirfenidon die Kollagen Synthese und damit die Möglichkeit der Plaque-Stabilisierung. Der ohnehin vaskulär vorgeschädigte Patient könnte also durch die Anwendung dieser Substanz nach PTCA an einem anderen Gefäßabschnitt eine

Plaque-Instabilität aufweisen, die in einen akuten thrombotischen Gefäßverschluss mündet. Dieser Zusammenhang muss in weiteren Studien genauer hinterfragt werden.

6. Zusammenfassung

Das Charakteristikum vaskulär proliferativer Erkrankungen ist die lokal hohe Konzentration von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche die Migration und Proliferation vieler glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (ECM) induzieren. Schlüsselprozesse neointimaler Formationen sind vaskuläres Remodeling und die später folgende Lumeneinengung.

Die Hypothese dieser Arbeit bestand nun darin, dass die Inhibition der ECM-Synthese eine interessante neue Strategie zur Prävention traumatisch induzierter Neointimabildung darstellt. Die A. carotis am Rattenmodell wurde mit Hilfe eines Ballonkatheters dilatiert. Anschließend konnte den Tieren Pirfenidon zugeführt werden (1 g/kg KG, per os mit der üblichen Nahrung), eine neue antifibrotisch wirkende Substanz, welche schon in anderen Versuchsreihen eine Hemmung der durch Wachstumsfaktoren induzierten Kollagensynthese aufwies. Zwei Wochen später wurden die Gefäße entnommen und histologische Querschnitte angefertigt, welche der computergesteuerten Morphometrie zugeführt wurden. Die Ergebnisse konnten mit den Resultaten einer unbehandelten dilatierten Gruppe (jeweils n=6) verglichen werden. Die neointimale proliferative Aktivität wurde immunhistochemisch durch Auszählung PCNA positiver Nuklei quantifiziert. Kollagene Strukturen konnten mit der Picrosirius-rot Färbung visualisiert werden, ergänzt durch ein semi-quantitatives Northern Blot-Verfahren. Der Gehalt neointimaler glatter Gefäßmuskelzellen konnte durch Anfärbung des *α*-Aktins immunhistochemisch dargestellt werden.

Die unbehandelte Kontrollgruppe bildete innerhalb 14 Tage eine starke Neointima aus (I/M = Intima-Media-Ratio : 2,42 ± 0,15). Dies entsprach einer luminalen Einengung von 89,2%. Der neointimale Hauptbestandteil wurde durch glatte Gefäßmuskelzellen gebildet welche in kollagenen Strukturen eingebettet waren. Die Neointimabildung konnte bei den mit Pirfenidon behandelten Tieren deutlich reduziert werden (I/M: 0,22 ± 0,08, $P<0,001$). Dies entsprach einer Lumeneinengung von 7,9%. Die proliferative Aktivität der ortsständigen Zellen konnte durch das Medikament nicht beeinflusst werden. 4,4% (behandelte Tiere) vs. 4,8% (unbehandelte Tiere) der neointimalen Zellen färbten sich PCNA-positiv. Durch die Picrosirius Rot-Färbung zeigte sich jedoch, dass die Kollagendeposition bei der therapierten Gruppe nahezu aufgehoben war, was sich zusätzlich durch ein entsprechendes Northern Blot-Verfahren bestätigte.

Pirfenidon wird gegenwärtig in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener fibrosierender Erkrankungen erforscht. In dieser Versuchsreihe kristallisierte sich die Fähigkeit heraus, die neointimale Gefäßläsion durch vorwiegende Hemmung extrazellulärer Matrixdeposition zu minimieren. Die extrazelluläre Matrix stellt möglicherweise einen interessanten Ansatzpunkt zur Prävention vaskulärer proliferativer Erkrankungen dar.

6. Summary

Vascular proliferative diseases are characterized by high local concentrations of growth factors and cytokines which induce migration and proliferation of mainly vascular smooth muscle cells and the synthesis of extracellular matrix molecules (ECM). Either are key processes of neointima formation, vascular remodeling and late lumen loss.

We hypothesized that inhibition of ECM synthesis represents an intriguing new strategy to prevent trauma-induced neointima formation. We balloon-injured rat carotid arteries and treated the animals with pirfenidone (1 g/kg body weight, per os with the regular diet), a new anti-fibrotic agent which has been demonstrated to prevent growth factor-induced collagen synthesis. Two weeks later, computer-aided morphometry was done and compared with untreated controls (each n= 6). Neointimal proliferative activity was quantified immunohistochemically by counting PCNA positive nuclei and collagen deposition was visualized by picrosirius red staining and semi-quantified by Northern Blot. Smooth muscle cell α-actin was detected immunohistochemically.

Control-injured animals developed marked neointimal thickening within 2 weeks (I/M, mean intima:media ratio 2.42 ± 0.15) resulting in a 89.2% luminal narrowing. The neointima mainly consisted of vascular smooth muscle cells embedded in collagen. Neointima formation was strongly reduced when balloon-injured animals had been treated with pirfenidone (I/M ratio 0.22 ± 0.08, $P < 0.001$), resulting in a minimal residual narrowing of the lumen (7,9%). Proliferative activity within the neointima was unaffected by the drug. 4,4% vs. 4,8% of neointimal cells stained positive for PCNA in carotid arteries of treated vs. untreated animals, respectively. However, picrosirius red staining demonstrataed that collagen deposition was nearly abolished, a finding which was further confirmed by Northern Blot of homogenized vessels.

Pirfenidone, currently beeing investigated clinically for the treatment of various fibrotic diseases, is able to prevent neointimal lesion formation most likely through inhibition of local ECM deposition. Targeting matrix deposition may have an intriguing potential for the prevention of vascular proliferative diseases.

7. Literaturangaben

Abe, J., W. Zhou, et al. (1994). "Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery." Biochem Biophys Res Commun **198**(1): 16-24.

Aikawa, M., E. Rabkin, et al. (1997). "Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization." Circulation **95**: 2433-2444.

Aoyagi, M., M. Yamamoto, et al. (1997). "Expression of p53 protein and p53 gene transcripts in rabbit carotid arteries after balloon denudation." Histochem Cell Biol **107**(5): 365-370.

Braun-Dullaeus, R. C., M. J. Mann, et al. (1998). "Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease." Circulation **98**(1): 82-89.

Braun-Dullaeus, R. C., M. J. Mann, et al. (2001). "Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1152-1158.

Burke, J. M. and R. Ross (1977). "Collagen synthesis by monkey arterial smooth muscle cells during proliferation and quiescence in culture." Exp Cell Res **107**(2): 387-395.

Burke, J. M., G. Balian, et al. (1977). "Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells in vitro." Biochemistry **16**(14): 3243-3249.

Celis, J.E. and R. Bravo (1984): "Synthesis of the nuclear protein cyclin in growing, senescent and morphologically transformed human skin fibroblasts." FEBS Lett. **165**: 21-25.

Clowes, A. W., M. A. Reidy, et al. (1983a). "Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium." Lab Invest **49**(3): 327-333.

Clowes, A. W., M. A. Reidy, et al. (1983b). "Mechanisms of stenosis after arterial injury." Lab Invest **49**(2): 208-215.

Clowes, A. W., M. M. Clowes, et al. (1989). "Regulation of smooth muscle cell Growth in injured artery." J Cardiovasc Pharmacol **14 Suppl 6**: 12-15.

DeGregori, J., T. Kowalik, et al. (1995). "Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes." Mol Cell Biol **15**(8): 4215-4224.

Dzau V.J., R.C. Braun-Dullaeus, D.G. Sedding, (2002). "Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies." Nature Medicine **8**: 1249-1256.

Dzau, V. J., G. H. Gibbons, et al. (1991). "Molecular mechanisms of vascular renin angiotensin system in myointimal hyperplasia." Hypertension **18**(4 Suppl): II 100-105.

Dzau, V. J., G. H. Gibbons, et al. (1997). "Future horizons in cardiovascular molecular therapeutics." Am J Cardiol **80**(9A): 33I-39I.

Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science **274**(5293): 1664-1672.

Emeson, E. E. and A. L. Robertson, Jr. (1988). "T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis." Am J Pathol **130**(2): 369-376.

Ferns, G. A., E. W. Raines, et al. (1991). "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF." Science **253**(5024): 1129 1132.

Gallo, R., A. Padurean, et al. (1999). "Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle." Circulation **99**(16): 2164-2170.

Garcia, L., I. Hernandez, et al. (2002). "Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis." J Hepatol **37**(6): 797-805.

Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." N Engl J Med **330**(20): 1431-1438.

Grant M.B., Wargovich T.J., Ellis E.A., et al. (1994). "Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis?" Circulation **89**: 1511-1517.

Gregory, C. R., P. Huie, et al. (1993). "Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels." Transplantation **55**(6): 1409-1418.

Grise, M. A., V. Massullo, et al. (2002). "Five-year clinical follow-up after intracoronary radiation: results of a randomized clinical trial." Circulation **105**(23): 2737-2740.

Gurujeyalakshmi, G., M. A. Hollinger, et al. (1999). "Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L311-318.

Hansson, G. K., L. Jonasson, et al. (1988). "Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro." Circ Res **63**(4): 712-719.

Hansson, G. K., M. Hellstrand, et al. (1989). "Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells." J Exp Med **170**(5): 1595-1608.

Herrman, J. P., W. R. Hermans, et al. (1993 a). "Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (PartI)." Drugs **46**(1): 18-52.

Herrman, J. P., W. R. Hermans, et al. (1993 b). "Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail?(PartII)." Drugs **46**(2): 249-262.

Hewitson, T. D., K. J. Kelynack, et al. (2001). "Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis." J Nephrol **14**(6): 453-60.

Iyer, S. N., G. Gurujeyalakshmi, et al. (1999). "Effects of pirfenidone on Transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 367-373.

Iyer, S. N., J. S. Wild, et al. (1995). "Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters." J Lab Clin Med **125**(6): 779-785.

Jawien, A., D. F. Bowen-Pope, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor Promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty." J Clin Invest **89**(2): 507-511.

Jonasson, L., J. Holm, et al. (1986). "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." Arteriosclerosis **6**(2): 131-138.

Jordan, M.A., Toso, R.J., et al. (1993). "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 9552-9556.

Kaneko, M., H. Inoue, et al. (1998). "Pirfenidone induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) down-regulation on cultured human synovial fibroblasts." Clin Exp Immunol **113**(1): 72-76.

Katsuda, S., H. C. Boyd, et al. (1992). "Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults." Am J Pathol **140**(4): 907-914.

King, R. W., P. K. Jackson, et al. (1994). "Mitosis in transition." Cell **79**(4): 563-71.

King, R. W., R. J. Deshaies, et al. (1996). "How proteolysis drives the cell cycle." Science **274**(5293): 1652-1659.

Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-331.

Liau, G. and L. M. Chan (1989). "Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence." J Biol Chem **264**(17): 10315-10320.

Liau, G., Y. Yamada, et al. (1985). "Coordinate regulation of the levels of type III and type I collagen mRNA in most but not all mouse fibroblasts." J Biol Chem **260**(1): 531-536.

Libby, P. and G. K. Hansson (1991). "Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions." Lab Invest **64**(1): 5-15.

Lowe, S. W., E. M. Schmitt, et al. (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-849.

Majack, R. A., M. W. Majesky, et al. (1990). "Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta." J Cell Biol **111**(1): 239-247.

Majesky, M. W., V. Lindner, et al. (1991). "Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury." J Clin Invest **88**(3): 904-10.

Mann, M. J., A. D. Whittemore, et al. (1999). "Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial." Lancet **354**(9189): 1493-1498.

Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (1993). "Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8474-8478.

Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (1994). "Intimal hyperplasia after vascular injury Is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides." J Clin Invest **93**(4): 1458-1464.

Nabel E.G., Yang Z., et al. (1993b). "Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo". J Clin Invest **91**, 1822-1829.

Nabel, E. G., L. Shum, et al. (1993). "Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia." Proc Natl Acad Sci USA **90**(22): 10759-10763.

Nestor A.L; G.T. Cicila, et al. (2006). "Linkage analysis of neointimal hyperplasia and vascular wall transformation after balloon angioplasty." Physiological genomics **25**(2): 286-293.

Newby, A. C. (1997). "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 **8**(3-4): 213-224.

Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science **246**(4930): 603-608.

Pardee, A. B. (1994). "Multiple molecular levels of cell cycle regulation." J Cell Biochem **54**(4): 375-378.

Park, H. S., L. Bao, et al. (2003). "Pirfenidone Suppressed the Development of Glomerulosclerosis in the FGS/Kist mouse." J Korean Med Sci **18**(4): 527-533.

Pickering, J. G., L. Weir, et al. (1993). "Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization." J Clin Invest **91**(4): 1469-1480.

Pierce, G. F., T. A. Mustoe, et al. (1989). "Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms." J Cell Biol **109**(1): 429-440.

Raghu, G., W. C. Johnson, et al. (1999). "Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: results of a prospective, open-label Phase II study." Am J Respir Crit Care Med **159**(4 Pt 1): 1061-1069.

Raines, E. W., S. K. Dower, et al. (1989). "Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA." Science **243**(4889): 393-396.

Rakugi, H., D. K. Kim, et al. (1994). "Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. Possible role in restenosis." J Clin Invest **93**(1): 339-346.

Reidy M.A, J. Fingerle, et al. (1992). "Factors controlling the development of arterial lesions after injury." Circulation **86**(III): 43-46.

Ross R. and J.A.Glomset, (1973). "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis". Science **180**: 1332-1339.

Ross, R. (1995). "Cell biology of atherosclerosis." Annu Rev Physiol **57**: 791-804.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-420.

Schwartz, R. S., D. R. Holmes, Jr., et al. (1992). "The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms." J Am Coll Cardiol **20**(5): 1284-1293.

Serruys, P. W., P. de Jaegere, et al. (1994). "A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group." N Engl J Med **331**(8): 489-495.

Sherr, C. J. (1993). "Mammalian G1 cyclins." Cell **73**(6): 1059-1065.

Sherr, C. J. (1994). "G1 phase progression: cycling on cue." Cell **79**(4): 551-555.

Sherr, C. J. (1994). "Growth factor-regulated G1 cyclins." Stem Cells **12 (**Suppl 1): 47 55; discussion 55-57.

Sherr, C. J. (1995). "Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression." Proc Assoc Am Physicians **107**(2): 181-186.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin Dependent kinases." Genes Dev **9**(10): 1149-1163.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.

Stillman, B. (1994). "Smart machines at the DNA replication fork." Cell **78**(5): 725-728.

Tsukada, T., M. Rosenfeld, et al. (1986). "Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit." Arteriosclerosis **6**(6): 601-613.

Tunstall-Pedoe, H., K. Kuulasmaa, et al. (1999). "Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease." Lancet **353**(9164): 1547-1557.

van Obberghen-Schilling, E., N.S. Roche, et al. (1988). "Transforming growth factor beta 1 positively regulates it's own Expression in normal and transformed cells". J Biol Chem **263**: 7741-7746

Virchow, R. (1856). "Der atheromathöse Prozess der Arterien". Wien Med Wochenschrift **6**: 825-832

Waga, S., G. J. Hannon, et al. (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent Kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature **369**(6481): 574-578.

Walksman, R. et al. (2000). "Intracoronary gamma-radiation therapy after angioplasty inhibits recurrence in patents with in-stent restenosis." Circulation **101**: 2165-2171.

Wei, G. L., K. Krasinski, et al. (1997). "Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty." Circ Res **80**(3): 418-426.

8. Lebenslauf

Andreas Backes

Falterbachstr.15

56479 Elsoff

09.08.1977	Geboren in Hadamar als Sohn der Eheleute Inge Backes, geb. Flick und Gerd Backes.
1984-1988	Grundschule Oberrod/Westernohe
1988-1990	Hauptschule Rennerod
1990-1994	Realschule Rennerod
1994-1997	Peter-Paul-Cahensly-Schule Limburg/Lahn
1997-1998	Zivildienst: Deutsches Rotes Kreuz Limburg/Lahn
1998-2005	Studium der Medizin an der Justus Liebig Universität Gießen
ab Juli 2005	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik des St. Vincenz-Krankenhaus Limburg

Prüfungen

August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	Erster Abschnitt der ärztl. Prüfung
April 2004	Zweiter Abschnitt der ärztl. Prüfung
Mai 2005	Dritter Abschnitt der ärztl. Prüfung

Famulaturen

März 2002	Innere Medizin/Kardiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Juli und August 2002	Chirurgie am St. Anna Krankenhaus Hadamar
September 2002	Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Weilburg
März 2003	Innere Medizin/Kardiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Praktisches Jahr

Innere Medizin, Chirurgie und Neurologie im St. Vincenz-Krankenhaus Limburg.

Akademisches Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-Universität Gießen

9. Publikationen

9.1 Abstrakts

A. Backes, D. Sedding, U.Seay, S. Margolin, H. Tillmanns, R. Braun-Dullaeus

Pirfenidone prevents intimal hyperplasia following rat carotid balloon injury.

Supplementum 1 zur Zeitschrift für Kardiologie. Band 92 (2003).

R. Braun-Dullaeus, A.Backes, D. Sedding, U.Seay, S. Margolin, H. Tillmanns,

Inhibition of Matrix Accumulation: A new approach for the prevention of Restenosis?

Zeitschrift für Innere Medizin in Klinik und Praxis. Abstract Band I (2003)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Rüdiger Braun-Dullaeus für das interessante Thema und die engagierte Betreuung, aber auch für die Möglichkeit des unabhängigen Arbeitens. Durch seine wissenschaftliche Diskussion, seine Ideen und engagierte Betreuung wurde mir der Zugang zur wissenschaftlichen Arbeit gelehrt. Auch für die Durchsicht der Arbeit gilt ihm mein Dank.

Herrn Dr. med. Daniel Sedding danke ich für die Betreuung und technische Anleitung während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Labors, besonders Frau Ulrike Seay und Herrn Harry Michnacs für die hilfsbereite Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.