Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor Professor Dr. Wolfgang Rottbauer

Der Effekt von Valproat auf die reaktive Zellproliferation und Migration von humanen koronaren Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Ricarda Krebs
aus Ulm

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 19.05.2011

Widmung

Diese Arbeit widme ich Christoph Riepl

Nr. *Titel* *Seite*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Die Restenose als ungelöstes Problem der interventionellen Kardiologie 1

1.2 Grundlagen der Restenoseentstehung 2

1.3 Valproat und seine Wirkungen 3

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit 9

2. Material und Methoden 10

2.1 Material 10

2.1.1 Zellkultur 10

2.1.2 Proliferationsmessung 13

2.1.3 Migrationstest 14

2.1.4 Zellvitalitätstest 15

2.2 Methoden 16

2.2.1 Zellkultivierung 16

2.2 2 Proliferationsmessungen 17

2.2.3 Migrationstest 20

2.2.4 Vitalitätstest 22

2.2.5 Statistik 24

2.2.6 SI/MPL-Ratios 24

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Valproat auf die Proliferation von humanen koronaren Zellen 25

3.1.1 Humane umbilikale venöse Endothelzellen 25

3.1.2 Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media 27

3.1.3 Humane koronare arterielle Endothelzellen 29

3.1.4 HUVEC, HCMSMC und HCAEC im Vergleich 31

3.2 Effekte von Valproat auf die Vitalität von humanen koronaren Zellen 32

3.2.1 Humane umbilikale venöse Endothelzellen 32

3.2.2 Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media 34

Nr. *Titel* *Seite*

3.2.3 Humane koronare arterielle Endothelzellen 35
3.2.4 HUVEC, HCMSMC und HCAEC im Vergleich 36
3.3 Effekte von Valproat auf die Migration von HCMSMC 37

4. Diskussion 42
4.1 Restenose als Problem der interventionellen Kardiologie . 42
4.2 Wirkungen von Valproat auf humane koronare Zellen 43
4.3 Die Beeinflussung der Proliferation und Migration durch Valproat in früheren Veröffentlichungen 46
4.4 Der Effekt von Valproat auf die Vitalität 47

5 Zusammenfassung 48
6. Literaturverzeichnis 50

Danksagung 61

Lebenslauf 62

Abkürzungsverzeichnis

5-LO	= 5-Lipoxygenase
86HG39-Zellen	= humane Glioblastomzellen der Linie 86HG39
85HG66-Zellen	= humane Astrozytomzellen der Linie 85HG66
A172-Zellen	= humane Glioblastomzellen der Linie A172
BFGF	= basic fibroblast growth factor
C	= Kontrolle
DanG-Zellen	= humane Pankreaskarzinomzellen
DES	= Drug-eluting Stent
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EBM	= Endothel cell basal medium
EDTA	= Ethylene diamine tetraacetic acid
EGM	= Endothel cell growth medium
Fcs	= Fetal calf serum
HAT-29-Zellen	= Kolonkarzinomzellen der Linie HAT-29
HCAEC	= Humane koronare arterielle Endothelzellen
HCMSMC	= Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media
HDAC	= Histondeacetylasehemmer
HUVEC	= Humane umbilikale venöse Endothelzellen
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule-1
µg/ml	= Mikrogramm pro Milliliter
MPL	= maximal plasma level
Media	= Tunica media
NaCl	= Kochsalz
n.s.	= nicht signifikant
p	= Signifikanzniveau
PBS-	= Phosphate Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium
PDGF	= platelet-derived growth factor
PTCA	= Perkutane transluminale Angioplastie
RCC-Zellen	= Renal cell carcinoma- Zellen
SI/MPL-Ratio	= significant inhibitory effect/ maximum plasma level-Ratio
SmBM	= Smooth muscle cell basal medium
SmGM	= Smooth muscle cell growth medium

T98G-Zellen	= humane Glioblastomzellen der Linie T98G
TNF-alpha	= tumor necrosis factor alpha
TNS	= Trypsin-neutralising solution
VPA	= Valproat, Valproinsäure

1. Einleitung

1.1 Die Restenose als ungelöstes Problem der interventionellen Kardiologie

In der westlichen Welt stellen nach wie vor kardiovaskuläre Erkrankungen, hierunter insbesondere die koronare Herzkrankheit , die häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen dar. Mit der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTCA) entwickelte Andreas Grüntzig vor annähernd 30 Jahren eine nicht-chirurgische Behandlungsmethode von Koronarstenosen (Grüntzig et al, 1979).
Seitdem stellt die PTCA das Standardverfahren zur Behandlung und Beseitigung symptomatischer Gefäßstenosen der Koronararterien dar.
Nach wie vor steht jedoch die interventionelle Kardiologie vor dem Problem der Restenoseentstehung nach PTCA als eine der Hauptlimitationen der perkutanen koronaren Revaskularisationstherapie (Califf et al, 1991, Gruberg et al, 2000).
Aufgrund der Tatsache, dass eine gesteigerte Proliferation (Dartsch et al, 1990) und Migration (Bauriedel et al, 1992) von humanen glatten Gefäßmuskelzellen ein Schlüsselereigniss bei der Entstehung von Restenosen nach Gefäßintervention bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit darstellt, wurden in den 80er und 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts in klinischen Studien potente antiproliferative Behandlungskonzepte entwickelt. Wegen zu niedriger Medikamentenkonzentrationen in vivo scheiterten diese Studien allesamt (Voisard et al, 2004).
Vor zehn Jahren konnte gezeigt werden, dass Zytostatika in vitro in der Lage waren, eine signifikante Hemmung der Proliferation von humanen glatten Gefäßmuskelzellen in Konzentrationen, wie sie standardmäßig im Rahmen von Chemotherapien erreicht werden, herbeizuführen (Voisard et al, 1993). Wegen der Nebenwirkungen ist jedoch die Applikation von Zytostatika beschränkt auf eine lokale Applikation, so zum Beispiel im Rahmen von DES (drug eluting stents).
DES sind in der Prävention von Restenosen nach koronararteriellen Interventionen sehr erfolgreich. Allerdings wurde als bedeutsamer nachteiliger Effekt bei Paclitaxel und Sirolimus freisetzenden Stents die DES-Thrombose beschrieben (Chatterjee et al, 2008).
Weiterhin stellt eine Überdosierung der aus den DES freigesetzten Substanzen ein mögliches Problem dar (Voisard et al, 2007), nicht zuletzt deshalb sollten alternative Substanzen und Medikamentenkombinationen in naher Zukunft untersucht werden.

1.2 Grundlagen der Restenoseentstehung

Als Restenose bezeichnet man eine lokale Entzündungsreaktion, welche sich nach mechanischer Verletzung einer arteriellen Gefäßwand, z.B. im Rahmen einer PTCA oder Stentimplantation, ausbildet. Sie resultiert zum Einen in einer Neointimabildung, zum Anderen in einem negativen Remodelin des Gefäßes, das bedeutet eine postinterventionelle Verkleinerung des Gefäßdurchmessers (Pasterkamp et al, 1997). Grundsätzlich versteht man unter einer Restenosierung eine angiographisch gemessene Lumeneinengung von 50% oder mehr, die innerhalb von sechs Monaten nach Durchführung einer PTCA entsteht (Voisard et al, 2002).

Wichtige Schlüsselvorgänge bei der Restenoseentstehung stellen nach Schädigung des Gefäßendothels, z.B. im Rahmen einer Ballondilatation, folgende Prozesse dar: Es kommt zur Thrombozytenaggregation, Einwanderung von Leukozyten und Freisetzung verschiedener Entzündungs- und Wachstumsfaktoren. Hierunter spielen insbesondere platelet-derived growth factor (PDGF), Interleukin-1, Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha), basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und transforming growth factor-ß (TGF-ß) eine entscheidende Rolle. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von glatten Muskelzellen und der Bildung extrazellulärer Matrix (Hombach et al, 1995, Costa et al, 2005).

Seit Längerem weiß man auch um die herausragende Bedeutung des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1), einem Immunglobulin-artigen Protein, welches auf der Zelloberfläche von glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert wird. Während es in der Gewäßwand gesunder Erwachsener fehlt, findet es sich in atherosklerotischen Läsionen gehäuft wieder (Poston et al., 1992).

Die sich im Rahmen der Entzündungsreaktion entstehende Neointima wird im Laufe der Zeit umgebaut, infolgedessen kommt es zu einer Vermehrung der extrazellulären Matrix und einer abnehmenden Zelldichte. Normalerweise stehen auf- und abbauende Prozesse im Bereich der Matrix im Gleichgewicht: in den ersten Monaten nach Gefäßverletzung überwiegen die aufbauenden, in den Folgemonaten die abbauenden Prozesse. In der Gesamtheit sind diese Vorgänge als Remodeling bekannt. Eine postulierte Ursache für die Restenose nach PTCA ist das sogenannte „negative Remodeling“, welches bislang nicht völlig erklärbar scheint (Plow et al, 1997). Eine Theorie der Entstehung dieses „negativen Remodelings“ besagt, dass es

auf einer vermehrten Kollagenproduktion von Adventitiamyofibroblasten mit konsekutiver Gewebekontraktion beruht (Labinaz et al, 1999).

1.3 Valproat und seine Wirkungen

Die verzweigtkettige Fettsäure Valproat (VPA) ist das am meisten verwendete Antiepileptikum in der Behandlung generalisierter Epilepsien. Sie wird weiterhin zur Therapie fokaler Epilepsien und bipolarer Störungen sowie bei Migräne und neuropathischem Schmerz verwendet.
Zum ersten Mal synthetisiert wurde Valproinsäure von B.S. Buron im Jahre 1882.
Erst die Gruppe um Pierre Eymard, welche Valproinsäure als Lösungsmittel für Versuche mit potenziellen Antiepileptika verwendete, entdeckte, dass das Lösungsmittel selbst eine potente Substanz zur Kupierung von Anfällen war (Kostrouchovà et al, 2007).

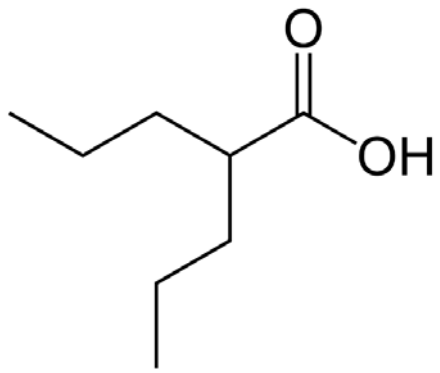

Abb. 1: 2-propylvaleric acid, Valproinsäure

Zwar galt Valproat lange Zeit als relativ sicheres Medikament, jedoch zeigten sich während der seit dem Jahr 1967 dauernden Verwendung als Antiepileptikum auch zunehmend Nebenwirkungen. Diese reichen von Dyspepsie, Gewichtszunahme, Dysphorie, Benommenheit, Haarausfall, Kopschmerzen, Müdigkeit und Tremor über eine Beeinträchtigung der Leberfunktion bis hin zu Thrombopenie und Verlängerung der Blutgerinnungszeit (Kostrouchovà et al, 2007).
Man kennt mittlerweile das teratogene Potential von VPA bei der Behandlung schwangerer Epilepsiepatientinnen, welches sich im Auftreten von

Neuralrohrdefekten, hauptsächlich Spina bifida, bei Feten von in der Frühschwangerschaft mit Valproat behandelten Patientinnen äußert (Lammer et al, 1987).

Während der letzten Jahre verdichteten sich die Hinweise, dass einige der Mechanismen, die für die durch VPA erzeugten fetalen Miss- und Fehlbildungen verantwortlich sind, mit verschiedenen antineoplastischen Eigenschaften des Medikamentes zusammenhängen. 30 Jahre nach Entdeckung des antikonvulsiven Potenzials von VPA postulierten Cinal et al. 1997 auch eine antineoplastische Wirkung der Substanz, welche sich in in-vivo-Versuchen mit an Neuroblastom erkrankten Mäusen in einer Reduktion der Tumormasse nach Applikation von Valproat bekräftigen ließ. Diese faszinierende Entdeckung eröffnete neuartige Aspekte in der Behandlung von Tumor-Patienten. (Blaheta et al, 2002).

Unter der Vielzahl von antineoplastischen Medikamenten, allgemein bezeichnet als „Target-Therapie“ (Duenas-Gonzalez et al, 2007) sind epigenetische Medikamente vielversprechend. Im Unterschied zu anderen Stoffen, welche ein bestimmtes Genprodukt als Ziel haben, zielt die Wirkung von epigenetischen Medikamenten durch Hemmung der Histondeacetylase und DNA-Methyltransferase auf das Chromatin ab. Deshalb sind sie in der Lage, unspezifisch die meisten oder alle Tumorarten in ihrem Wachstumsverhalten zu beeinflussen, zumal die Dysregulation des methylierenden und deacetylierenden zellulären Systems ein wichtiges Kennzeichen von Neoplasien ist.

VPA wurde bereits in präklinischen Versuchen in seiner Interaktion bei Haut-, Brust-, Kolon-, Leber-, Prostata-, Zervix- und kleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht. Aktuell wird das Medikament in Phase-II-Studien zur Behandlung von soliden Tumoren untersucht. Sowohl präklinische als auch klinische Daten legen nahe, dass VPA gegebenenfalls in Kombination mit klassichen Zytostatika oder Bestrahlung bei einer Vielzahl von soliden Tumoren eine neue Behandlungsoption darstellen könnte (Münster et al, 2007; Duenas-Gonzalez et al, 2007).

Weiterhin wird VPA klinisch bei Myelodysplastischen Syndromen, AML, chronisch lymphatischer Leukämie sowie Non-Hodgkin-Lymphompatienten untersucht (Michaelis et al).

Die experimentelle Untersuchung von VPA läuft weiterhin, viele Fragen sind noch immer unbeantwortet.

In der Vergangenheit gab es bereits verschiedenste Untersuchungen zur Detektion der zahlreichen molekularen Mechanismen von Valproat, um ein besseres Verständnis der Wirkungen der Substanz zu gewinnen:

Valproinsäure hemmt Histondeacetylasen

Die Überführung von Chromatin von einer offene in eine geschlossene Form stellt einen Schlüsselvorgang bei der Regulierung der Genexpression dar. Histonacetyltransferasen transportieren Acetylgruppen zu Histonen, dies hat eine lokale Expansion von Chromatin und eine verbesserte Zugänglichkeit für Regulatorproteine zur DNA zur Folge.
Histondeacetylasen (HDACs) hingegen katalysieren die Entfernung von Acetylgruppen, was zur Kondensation von Chromatin und einem Rückgang von Transkriptionsvorgängen führt (Bolden et al, 2006).
Die Hemmung von HDACs erwies sich als potente Möglichkeit, in aberrante epigenetische Veränderungen, welche mit Krebserkrankungen assoziiert sind, einzugreifen.
Für VPA konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Gruppen von HDAC hemmen kann (Göttlicher M et al, 2001, Gurvich et al, 2004, Krämer et al, 2003).

Valproinsäure beeinflusst den MAP-Kinase-Signalweg

Die MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase)/ ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) und ihre Regulierung spielt eine herausragende Rolle in der Kontrolle von zellulären Prozessen, unter Anderem der Proliferation, dem Zellüberleben, der Zelldifferenzierung und –motilität. Häufig ist der MAPK-Signalweg in menschlichen Tumorzellen verstärkt aktiviert (Kohno et al, 2006).
Bezüglich der Beeinflussung des MAP-Kinase-Signalwegs durch VPA ergaben sich diskrepante Ergebnisse: Von einer Arbeitsgruppe um Witt wurde 2002 von einer Hemmung des ERK 1/2-Wegs durch VPA berichtet, ein Ergebnis, das durch andere Versuche mit verschiedenen HDAC-Hemmern gestützt wurde, die ebenfalls eine Hemmung des ERK 1/2-Wegs bewirken konnten (Yu et al, 2003 und Jung et al, 2005).

Andere Gruppen wiederum kamen zu dem Ergebnis, dass VPA sowohl in Zellen tierischen Ursprungs als auch in menschlichen Krebszelllinien zu einer Phosphorylierung von ERK 1/2 führte (Yuan et al, 2001).
Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Versuchsergebnisse fehlt bislang.

Valproinsäure beeinflusst die DNA-Methylierung

In der Vergangenheit wurden DNA-Methylierungs-Inhibitoren als antitumuröse Substanzen untersucht (Yoo et al, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass VPA in der Lage war, nicht nur die Aktivität der intrazellulären Demethylase zu verstärken, sondern sogar zu einer Depletion von DNA-Methyltransferase führte (Marchion et al, 2005). Somit kann darauf geschlossen werden, dass die VPA-induzierte DNA-Hypomethylierung zu VPA-induzierten antikanzerösen Effekten beiträgt. Von verschiedenen Gruppen wurde bereits von synergistischen antitumurösen Wirkungen von VPA in Kombination mit DNA-Methylierungs-Inhibitoren berichtet (Mongan et al, 2005, Siitonen et al, 2005, Yang et al, 2005, Chavez-Blanco et al, 2006, Garcia-Manero et al, 2006).

Valproinsäure beeinflusst die 5-Lipoxygenase-Expression

5-Lipoxygenase (5-LO) wird von einer Vielzahl von Tumorzellen, die unter Anderem ihren Ursprung von Colon, Lunge, Prostata, Pankreas, Knochen, Gehirn und Mesothel nehmen, exprimiert und regt das Tumorzellwachstum sowie die Neoangiogenese an (Romano et al, 2003). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass VPA zu einem Anstieg der 5-LO-Exprimierung beiträgt (Manev et al, 2002 und Blaheta et al, 2005). Infolgedessen muss der durch VPA angeregte Anstieg der 5-LO in Tumorzellen als unerwünschter Effekt betrachtet werden, wenn man VPA als mögliches antineoplastisches Medikament etablieren möchte. Jedoch kann möglicherweise eine kombinierte Applikation von VPA mit 5-LO-Inhibitoren zu synergistischen antitumurösen Effekten bei bestimmten Tumorarten führen, diesbezüglich sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Valproinsäure beeinflusst die Zellproliferation, -lebensfähigkeit und Apoptose

Von größtem Interesse in Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist die Beeinflussung der zellulären Proliferation, der Zellüberlebensfähigkeit und eine mögliche Apoptoseinduktion durch VPA. Für verschiedene Krebszelllinien hat sich bezüglich VPA in früheren Untersuchungen eine Induktion von Apoptose und Hemmung der Zellproliferation ergeben (Blaheta et al, 2002 und 2005; Takai et al, 2004; Catalano et al 2005; Sakajiri et al, 2005; Shen et al, 2005). Andererseits wurden auch Arbeiten veröffentlicht, in denen sich ein antiapoptotischer und zytoprotektiver Effekt von VPA nachweisen ließ (Yuan et al, 2001 und Michaelis et al, 2006).
Zusammenfassend lässt sich in Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse feststellen, dass VPA in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Effekte entfalten kann. Bislang hat man die molekularen Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, noch nicht verstanden (Michaelis et al, 2007).

Valproinsäure beeinflusst die zelluläre Adhäsion, Invasion und Migration

Eine essenzielle Voraussetzung für die Fähigkeit eines Primärtumors metastatisch zu streuen, ist die Möglichkeit von Tumorzellen umliegendes Gewebe zu infiltrieren und zu wandern. Für VPA konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass es zelluläre Adhäsion, Invasion und Migration über verschiedenste Mechanismen hemmen kann (Blaheta et al, 2002 und 2005; Beecken et al, 2005).
So untersuchte beispielsweise vor vier Jahren eine Gruppe um Sato die Wirkung der HDAC-Inhibitoren VPA und SAHA auf Pankreaskarzinomzellen, es zeigte sich eine Hemmung der zellulären Migration.
In einer anderen Untersuchung von Chen et al aus dem Jahr 2006 zeigte sich, dass durch Zugabe von VPA die zelluläre Fähigkeit zur Invasion umliegenden Gewebes bei Blasenkarzinomzellen in drei von vier Blasenkrebszelllinien vermindert war, während sich hier keine Beeinflussung der Migration ergab.

Valproinsäure hemmt die Angiogenese

Damit ein Tumor wachsen und in Progress gehen kann ist es eine unabdingbare Voraussetzung, dass dem Tumorgewebe eine ausreichende Blutversorgung zur Verfügung steht (Naumov et al, 2006). Somit kommt Substanzen, welche antiangiogenetisch wirksam sind, bei der Auswahl potenzieller antineoplastischer Medikamente eine wichtige Bedeutung zu.
Für VPA wurde verschiedentlich berichtet, dass es die Angiogenese einerseits durch direkte Effekte auf Endothelzellen, andererseits durch eine Beeinflussung der Expression von pro- und antianginösen Faktoren durch Tumorzellen hemmen kann (Blaheta et al, 2005). In ersten Untersuchungen stellte man fest, dass VPA in Neuroblastomzellen die Produktion der antianginösen Faktoren Thrombospondin-1 und Activin A erhöhte (Cinatl et al, 2002). Darüber hinaus entdeckte man schließlich, dass VPA auch die VEGF- und bFGF-Produktion in Kolonkarzinomzellen als auch die VEGF-Produktion in Zellen des Multiplen Myeloms hemmte (Zgouras et al, 2004 und Kaiser et al, 2006).
Schließlich wurde evident, dass VPA die Angiogenese nicht nur indirekt, sondern durch direkte Beeinflussung von Endothelzellen zu hemmen in der Lage war, wie sich in verschiedenen Untersuchungen an Tiermodellen bestätigen ließ (Michaelis et al, 2004).

Valproinsäure beeinflusst die antineoplatische Immunität und chronische Entzündung

Vor einigen Jahren verdichteten sich Hinweise, dass HDAC-Inhibitoren in der Lage sind, direkt die Aktivität von Immunzellen zu beeinflussen. Die Gruppe um Skov konnte 2003 zeigen, dass HDAC-Hemmer eine neue Klasse von Immunsuppressiva darstellen. Sie hemmten die CD-4-T-Zellproliferation dosisabhängig- ein Effekt, der nicht durch Apoptoseinduktion oder herabgesetzte Überlebensfähigkeit der Zellen zustande kam (Skov et al, 2003).
Zahlreiche Studien, die sich mit der Beeinflussung von Lymphozyten durch VPA oder andere HDAC-Hemmer beschäftigen, lassen die Vermutung zu, dass diese Medikamentengruppe auch eine neue Interventionsmöglichkeit gegen Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen

darstellen könnte (Michaelis et al). Jedoch muss genau diese in erster Linie unerwünschten zusätzlichen Wirkung von VPA Rechnung getragen werden, wenn man es als mögliches antitumuröses Medikament oder als Medikament zur Beschichtung von Stents verwenden möchte.
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch VPA eine Beeinflussung der Zytokinproduktion, sowohl in normalen als auch malignen Zellen vorgenommen werden kann, ein Effekt der zur Modulation der körperlichen Immunantwort und chronisch-entzündlichen Prozessen beitragen könnte. VPA unterdrückte die Produktion von IL-6 und TNF-alpha in menschlichen monozytären Leukämiezellen (THP-1) und in menschlichen Gliomzellen (A-172) (Ichiyama et al, 2000), in Prosatatakarzinomzellen hemmte VPA die Produktion von IL-6 (Abdul et al, 2001).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht den Effekt des Antiepileptikums VPA auf die Proliferation und Migration von humanen koronaren glatten Muskelzellen. Es wurden hierfür glatte Muskelzellen aus humanen Koronararterien (HCMSMC) und Endothelzellen aus humanen Koronarien (HCAEC) verwendet. Ebenso kamen aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der zu erhebenden Daten Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) zum Einsatz (Klein et al, 1994).
Ergänzend wurde auch die Wirkung von Valproat auf die Zellvitalität der einzelnen Zellreihen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der SI/MPL-Ratio eingeordnet.
SI/MPL-Ratios (Voisard et al, 2004 und 2007) charakterisieren die Beziehung zwischen der Konzentration einer Substanz mit einem signifikanten antiproliferativen Effekt in vitro (SI) und dem maximalen systemischen Plasmaspiegel derselben Substanz in vivo (MPL). Diese Ergebnisse erlauben eine erste Aussage darüber, ob ein beobachteter In-vitro-Effekt auch nach systemischer Verwendung oder nur im Rahmen einer lokalen hoch dosierten Applikation, z.B. durch DES, erzielt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Zellen

Es wurden drei verschiedene Zellarten verwendet:

- humane Endothelzellen aus umbilikalen (=Nabelschnur-) Venen (=HUVEC)
- humane glatte Muskelzellen aus der Media koronarer Arterien (=HCMSMC)
- humane Endothelzellen aus koronaren Arterien (=HCAEC)

Humane umbilikale venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)

Die HUVEC werden aus Nabelschnurvenen isoliert und kultiviert, die uns freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik Ulm zur Verfügung gestellt wurden.

Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media (HCMSMC)

Die HCMSMC wurden von der Firma Cambrex Company, Verviers in Belgien kommerziell erworben.

Humane koronare arterielle Endothelzellen (HCAEC)

Die HCAEC wurden ebenso wie die HCMSMC von der Firma Cambrex Company, Verviers in Belgien erworben.

2.1.1.2 Kulturmedien

Kulturmedium für Endothelzellen

Für die HUVEC und HCAEC wurde als Kulturmedium Endothel cell growth medium (EGM) verwendet. Dieses wurde hergestellt aus Endothel cell basal medium (EBM, erworben bei Cambrex Company, Verviers, Belgien) und folgenden Substanzen, die dem EBM zugegeben werden:

- 12 µg/ml bovine brain extract
- 10 ng/ml epidermal growth factor
- 50 µg/ml Gentamycin
- 50 ng/ml Amphotericin
- 1 µg/ml Hydrocortison
- 5% Kälberserum

Kulturmedium für glatte Muskelzellen

Für die HCMSMC wurde als Medium Smooth muscle cell growth medium (SmGM) verwendet.

Es setzt sich aus Smooth muscle cell basal medium (SmBM, erworben von Cambrex Company, Verviers, Belgien) und folgenden Zusätzen zusammen:

- 5 µg/ml Insulin
- 2 ng/ml fibroblast growth factor
- 0,5 ng/ml epidermal growth factor
- 50 µg/ml Gentamycin
- 50 ng/ml Amphotericin
- 5% fetales Kälberserum

2.1.1.3 Temperatur, Begasung und pH-Wert

Die Zellkulturen wurden im Begasungsinkubator (HERAcell, Heraeus, Kendro, Hanau) bei einer Temperatur von 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 inkubiert.

Durch den genau festgelegten CO_2-Partialdruck konnte der pH-Wert des Systems mithilfe des CO_2/$HCO3^-$-Puffersystems auf Werte zwischen 7,2-7,4 eingependelt werden.

2.1.1.4 Pufferlösung

Bei der Kollagenbeschichtung der Kulturschalen und zum Spülen des Zellrasens vor der Trypsin-Zugabe wurde folgende Pufferlösung verwendet:

- Phosphate buffered saline Dulbecco´s without calcium and magnesium (PBS^-)

Die Pufferlösung wurde bei PAA Laboratories in Linz, Österreich erworben.

2.1.1.5 Enzymlösung

Zum Ablösen der Zellen von der Kunststofffläche der Kulturschale wurde

- Trypsin/EDTA-Solution (Cambrex Company)

verwendet.

2.1.1.6 Trypsin-Neutralisationslösung

Zur Neutralisation der oben beschriebenen Trypsin/EDTA-Solution diente

- Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS).

Diese wurde ebenfalls von Cambrex Company erworben.

2.1.1.7 Kollagen

Als Adhäsionsfaktor für Endothelzellen wurde eine Beschichtung der Kulturgefäße mit

- Kollagen Typ 1 aus Rattenschwänzen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

verwendet. Es wurde 1 mg des Kollagens in 1 ml 0,1 M Essigsäure (Merck, Darmstadt) gelöst und mit 0,2 µm-Filtern (VWR, Darmstadt) steril filtriert.

2.1.1.8 Zentrifugenröhrchen

Bei den verwendeten Kunststoffröhrchen zur Zentrifugation der Zellsuspension handelte es sich um

- PS-Röhrchen der Firma Greiner in Frickenhausen.

2.1.1.9 Kulturgefäße

Für die Routinekultur standen zur Verfügung

- Cellstar-Kulturschalen (Greiner, Frickenhausen) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2

2.1.1.10. Technische Geräte

- Flow: Laminar-Flow (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
- Inkubator: HERAcell (Heraeus, Kendro, Hanau)
- Wasserbad: SW-20C (Julabo, Seelbach)
- Gasbrenner: Fireboy eco (Integra Biosciences, Fernwald)
- Pipettierhilfe: Pipetboy plus (Integra Biosciences, Fernwald)
- Pumpe: Vakuumpumpe KNF (VWR, Darmstadt)

- Mikroskop: Nikon TMS-Inversmikroskop mit ELWD-Kondensor und den Phasenkontrast-Objektiven CF Plan Achromat 4/0,13 DL, CF Plan Achromat 10/0,3 DL und CF Plan Achromat 20/0,4 DL
- Zentrifuge: Universal 2S (Hettich, Tuttlingen)

2.1.2 Proliferationsmessung

2.1.2.1 Testsubstanz

Bei dem von uns verwendeten Medikament handelte es sich um
- Valproic acid sodium salt (=Sodium-Valproat) , erworben von Sigma-Aldrich

2.1.2.2 Reagenzien

Zur Herstellung von Medikamentenverdünnungen wurde
- 0,9% steriles NaCl (B.Braun, Melsungen AG)

verwendet.

2.1.2.3 Kulturgefäße

Zur Versuchsdurchführung wurde eine Aussaat der Zellen in
- 6-Loch-Schalen Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm^2 pro Vertiefung

vorgenommen.

2.1.2.4 Messgefäße

Bei den zur Zellzählung verwendeten Gefäßen wurden
- Zellcountermessgefäße 22 x 65 PPN (Schärfe, Reutlingen)

benutzt.

2.1.2.5 Reaktionsgefäße

Da verschiedene Verdünnungen des Medikamentes zur Verwendung kamen, nutzte man
- Eppendorf-Cups, Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg).

2.1.2.6 Technische Geräte

Vor jeder Zellaussaat und zur Proliferationsmessung wurde mit dem Zellcounter
- CASY TTC (Schärfe, Reutlingen)

die Zellzahl gemessen.
10 ml Zellsuspension wurden verwendet. Hierfür wurde ein
- Dyspenser (VWR, Darmstadt)

benutzt.

2.1.3 Migrationstest

2.1.3.1 Testsubstanz

Als Testsubstanz beim Migrationstest diente
- Sodium-Valproat, verdünnt mit destilliertem Aqua steril.

2.1.3.2 Ruhekulturmedium für HCMSMC

Es wurde ein serumarmes Ruhekulturmedium hergestellt, um die Proliferation der glatten Muskelzellen zu behindern. Dieses setzte sich zusammen aus
- serumarmem, 1%igem Smooth muscle cell basal medium (SMBM, erworben bei Cambrex Company, Verviers, Belgien), sowie
- 50 µg/ml Gentamycin
- 50 ng/ml Amphotericin
- ohne Insulin
- ohne fibroblast growth factor
- ohne epidermal growth factor.

2.1.3.3 Migrationsassay

Zur Messung der Zellmigration der HCMSMC wurde eine Boyden-Kammer (QCMtm 24-well colorimetric cell migration assay, Chemicon Europe, UK) verwendet.

2.1.3.4 Technische Geräte

Die fotometrische Messung der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm mittels eines ELISA Readers *(Firma?)* gemessen.

2.1.4 Zellvitalitätstest

2.1.4.1 Kulturschalen

Bei allen drei Zellarten, bei denen eine Vitalitätsmessung erfolgte, wurde eine

- weiße 96-Loch-Schale (steril) von Nalge Nunc International, VWR International, Darmstadt, verwendet

2.1.4.2 Zellvitalitätstest-Kit

Die Vitalitätsmessung der HUVEC, HCMSMC und HCAEC erfolgte mithilfe des Testsystems

- CellTiter-Glo tm Luminescent Zellvitalitätstest (Promega GmbH, Mannheim).

2.1.4.3 Technische Geräte

Die Lumineszenzmessung wurde mit dem

- Luminator Centro LB 960 Berthold Technologies, Bad Wildbad, Programm Micro Win 2000

ausgeführt.

Als Magnetschüttler zur kreisenden Inkubation des Testansatzes diente der

- Variomag (H+P Labortechnik, VWR Darmstadt).

2.1.4.5 Statistik

Statistische Teilaspekte wurden mit einem adäquaten Computerprogramm namens

- Statistikprogramm SigmaStat Version 2.0, paired-t-test

bearbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

2.2.1.1 HUVEC

Kollagenbeschichtung der Kulturschalen

Sowohl bei den HUVEC (B 1.1.1) als auch bei den HCAEC (B 1.1.3) war vor der Aussaat eine Beschichtung der Kulturschalen mit Rattenkollagen Typ 1 (B 1.7) erforderlich. Für die HUVEC wurden in einer Kulturschale 1 mg/ml Kollagenlösung in 5 ml PBS^- (B 1.4) verdünnt, während der Kultivierungsphase in der 6-Loch-Schale wurden in jedes Loch 20 µl Kollagen auf 2 ml PBS^- gegeben. Für die HCAEC wurde jeweils die doppelte Menge Kollagen verwendet, das heißt in der Kulturschale 200 µl Kollagen gelöst in 5 ml PBS^-, beziehungsweise 40 µl Kollagen auf 2 ml PBS^- in der 6-Loch-Schale. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C.

Zellkultivierung

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte mit 10 ml Kulturmedium in Kulturschalen mit 75 cm^2 Wachstumsfläche (B2.7).

Bei konfluentem Wachstum wurden die Kulturschalen zweimal mit je 5 ml PBS^- gespült und die Zellen anschließend mithilfe von 2 ml Trypsin-EDTA-Solution (B 1.5) von der Kunststoffunterlage gelöst.

Um einer Schädigung der Zellen durch das einwirkende Trypsin entgegenzuwirken wurde die Zellsuspension mit 5 ml Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS, B 1.6) neutralisiert. Anschließend wurden sofort 100 µl der Suspension entnommen und in ein Counter-Gefäß (B 2.4) überführt, um nach Zugabe von 9,9 ml NaCl-Lösung und damit einer Ergänzung auf 10 ml am Zellcounter (B 2.6) die Zellzahl zu bestimmen.

Die verbliebene Zell-Trypsin-TNS-Suspension wurde im Anschluss daran fünf Minuten lang bei 1200 U/min zentrifugiert und der dabei entstehende Überstand abgesaugt. Nach Auflösung des Zellpellets in Kulturmedium konnten die Zellen dann mit einer Dichte von 5 x 10^3 Zellen/cm^2 Wachstumsfläche entweder in andere Kulturschalen oder in 6-Loch-Schalen für die Versuchsdurchführung passagiert werden. Während der Kultur wurde das Medium jeweils nach zwei bis drei Tagen ausgewechselt.

2.2.1.2 HCMSMC

Bei der Kultivierung der glatten Muskelzellen wurde wie mit den HCAEC verfahren, jedoch war hier im Vorfeld keine Kollagenbeschichtung der Kulturschalen erforderlich. Die übrigen Schritte unterschieden sich nicht von denen der Kultivierung der Endothelzellen.

2.2.2. Zellproliferationsmessungen

2.2.2.1 Zellaussaat

In der Versuchsvorbereitung wurden die HUVEC, HCMSMC und HCAEC vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens wie bei der Routinekultivierung abtrypsiniert, zentrifugiert und ihre Gesamtzahl im Counter (B 2.4) bestimmt.
Zur Versuchsdurchführung wurden 6-Loch-Schalen mit einer Fläche von 10 cm^2 pro Vertiefung verwendet, die für die Endothelzellen im Vorfeld wie bei der Routinekultivierung mit Kollagen beschichtet wurden. Es wurden dann jeweils 50.000 Zellen in je 2 ml Kulturmedium pro Vertiefung ausgesät. Für jede der sechs unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen wurden je drei Vertiefungen verwendet.
Weiterhin benötigten wir zwei 6-Loch-Schalen zur Durchführung einer Kontrolle und einer 24-h-Kontrolle zur Ermittlung der adhärenten Zellen. Hier erfolgte ebenso wie bei den Versuchsschalen die Aussaat von 50.000 Zellen in je 2 ml Nährmedium in jeweils drei Vertiefungen.
Einen Überblick zeigt Abbildung 1:



Kontrolle



24-h-Kontrolle



300 µg VPA

250 µg VPA



200 µg VPA

150 µg VPA



100 µg VPA

50 µg VPA

Abb. 1: Versuchsprotokoll der Proliferationsmessung (6-Loch-Schalen; VPA= Valproat in absteigender Dosierung von 300- 50 µg/ml)

2.2.2.2 Medikamentenzugabe

Das erste Mal erfolgte eine Medikamentenzugabe von Sodium-Valproat (B 2.1) zu den HUVEC, HCMSMC und HCAEC 24 Stunden nach Zellaussaat. Es wurden die Verdünnungen 300 µg/ml, 250 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml und 50 µg/ml von Valproat verwendet. Zur Medikamentenverdünnung diente steril filtriertes pyrogenfreies Wasser (B 2.2).
Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen und dem darauf folgenden ersten Mediumwechsel wurde dem Medium der HUVEC, HCMSMC und HCAEC das Medikament entsprechend der oben aufgeführte Konzentrationen zugegeben.
Dabei wurde stets in drei Vertiefungen dieselbe Konzentration von Valproat hinzugefügt, so dass man je drei Vertiefungen mit der Konzentration von 300 µg, je drei Vertiefungen mit 250 µg, je drei mit 200 µg Valproat und so weiter erhielt. In den Kontrollfeldern wurde ohne Zugabe von Medikament nur das Kulturmedium erneuert.
Eine erneute Medikamentenzugabe zu den Zellen mit denselben Konzentrationen erfolgte am dritten Tag nach Zellaussaat nach erneutem Mediumwechsel.
Die Kulturdauer während eines Versuches dauerte von der Aussaat bis zur Zellzählung sechs Tage, wobei eine Inkubation der Zellen mit Medikament während der letzten fünf Tage erfolgte.

2.2.2.3 Auswertung des Proliferationstests

Die Messung der Proliferation der Zellen erfolgte mithilfe des Zellcounters (B 2.6). Genau 24 Stunden nach Aussaat wurde eine Zählung der 24-h-Kontrollschale durchgeführt und die Anzahl der adhärierenden Zellen ermittelt. Am sechsten Tag nach Aussaat erfolgte dann die Bestimmung der Zellzahl sowohl der unbehandelten Kontrollen als auch der mit Medikament inkubierten Schalen. Die Vertiefungen der 6-Loch-Schalen wurden für die Zählung mittels Counter vorbereitet, indem jedes Loch zweimal mit PBS^- gespült wurde. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml Trypsin-EDTA-Solution von der Unterlage gelöst und vereinzelt. Danach fügte man mittels Dyspenser (B 2.6) je 4 ml 0,9 %iges NaCl pro Vertiefung zu den Zellen hinzu und überführte das NaCl-Zell-Gemisch in Messgefäße. Zur besseren Vereinzelung der adhärierenden Zellen wurde mit einer 5 ml-Pipette jedes Messgefäß je fünfmal gut

durchgemischt. Da die Zellzahl in den Gefäßen für eine Messung am Zellcounter zu hoch war, entnahm man aus jedem Messgefäß 1 ml und versetzte diesen mit 9 ml 0,9 %igem NaCl, wobei man jeweils eine Verdünnung von 1:10 erhielt. In dieser Verdünnung konnte eine Zellzählung am Counter ausgeführt werden. Eine Aussage über die erfolgte Zellproliferation ließ sich anhand folgender Überlegungen machen:
Die Zellzahl sechs Tage nach Aussaat (Kontrollschale) wurde abzüglich der Zellzahl in der 24-h-Kontrollschale gleich 100 % gesetzt.
Für die Zellen, welche mit Valproat inkubiert worden waren, ergab sich folgender Zusammenhang:
Die Zellzahl, die sich sechs Tage nach Aussaat in den 6-Loch-Schalen mit Medikament messen ließ, stellte abzüglich der Zellzahl in der 24-h-Kontrolle x %, also einen prozentualen Anteil von der gleich 100 % gesetzten Kontrolle, dar.

Die Proliferation oder Proliferationsinhibition konnte daher bei den mit Valproat behandelten Zellkulturen als prozentualer Anteil der Proliferation der unbehandelten Kontrollen (100 %) errechnet werden. Der sechstägige Versuch wurde pro Zellart jeweils dreimal durchgeführt, anschließend erfolgte eine Berechnung der Mittelwerte und der Signifikanz .

2.2.3 Migrationstest

2.2.3.1 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay nach dem Boyden Chamber-Prinzip

Die Migration der glatten Muskelzellen wurde nach der Mikrofilterporentechnik nach dem Boyden Chamber-Prinzip gemessen. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass glatte Muskelzellen, welche die Tendenz zur Migration besitzen, die Poren einer Membran durchwandern. Die Membran trennt eine Kammer, die so genannte Boyden-Kammer, in zwei Kompartimente (Abbildung 2). Dabei werden die Zellen in das obere Kompartiment auf den Filter ausgesät, die zu untersuchende Substanz, in unserem Falle Valproat, in das untere. Dabei gilt es zu beachten, dass die Porengröße so gewählt wird, dass die verwendete Zellart in der Lage ist, durch aktive Migration die Poren zu durchwandern. In diesem Fall wurde eine Porengröße von 8 µm verwendet. Anschließend wird untersucht, ob die Substanz im unteren

Kompartiment die Migration der glatten Muskelzellen inhibiert, und wenn ja, ob dies auch konzentrationsabhängig geschieht.

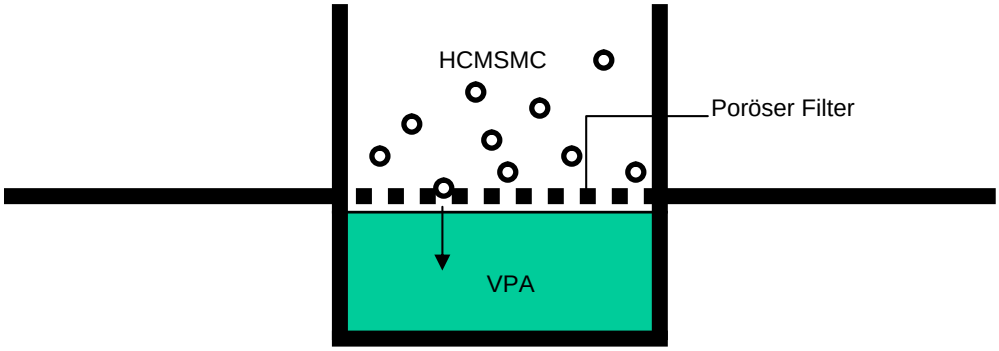

Abb. 2: modifizierte Boyden-Kammer
(HCMSMC= humane glatte Muskelzellen der Media; VPA= Valproat)

2.2.3.2 Zellaussaat

Den Migrationstest führten wir mit humanen glatten Muskelzellen der Media (HCMSMC) durch (B 1.1.2). Es wurde eine Zellkulturflasche mit HCMSMC verwendet, die zu 80 % konfluent war und die über 48 Stunden mit Ruhekulturmedium (B 3.2) inkubiert wurde. Das Ruhekulturmedium bestand aus 100 ml SMBM sowie 100 µl Gentamycin und 1% fCS.

Nach der 48-stündigen Inkubationszeit in Ruhekulturmedium wurde eine Zellsuspension mit 10^4 Zellen pro Filter ausgesät. 300 µl dieser Suspension wurden in 1% fCS auf den Filter der Kammer ausgesät, 500 µl Medium mit 10% fCS in die untere Hälfte der Kammer unterhalb der Membran. .Es erfolgte eine Inkubation der Boyden-Kammer über 24 Stunden.

2.2.3.3 Medikamentenzugabe

Einen Tag nach Zellaussaat wurde jeweils in drei übereinanderliegende Vertiefungen Valproat in Dosierungen von 50, 100, 150, 200, 250 und 300 µg/ml in die obere Kammer zugegeben.
Man erhielt so je drei Löcher mit glatten Muskelzellen, die mit den sechs abgestuften Konzentrationen von Valproat inkubiert wurden, sowie drei Löcher zur Kontrolle ohne

Medikament und drei Löcher mit Zellen, die in 1%igem Nährmedium kultiviert wurden.

2.2.3.4 Auswertung des Migrationstestes

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank (B1.10) wurden die Filter gefärbt, für 20 Minuten inkubiert, mit H2O gespült und über 40 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Zellen der Oberseite der Membran vollständig mit Wattestäbchen entfernt. Zur Quantifizierung der angefärbten Zellen, die in der Lage gewesen waren, die Poren der Membran durch Migration zu durchdringen und sich demnach an der Unterseite der Membran befinden mussten, wurden die Filter für 15 Minuten in Extraktionspuffer inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die fotometrische Messung der optischen Dichte von 100 µl der Lösung bei 560 nm unter Errechnung eines Mittelwertes, SmBM-Medium mit zugesetztem 10%igem Kälberserum wurde als Kontrolle verwendet (100%).

2.2.4 Vitalitätstest

2.2.4.1 Zellaussaat

Der Zellvitalitätstest wurde mit allen drei untersuchten Zellarten HUVEC, HCMSMC und HCAEC durchgeführt. Zur Versuchsvorbereitung wurden die Zellen wie bereits für die Routinekultur beschrieben kultiviert, abtrypsiniert, zentrifugiert und die Gesamtzellzahl im Zellcounter bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in weiße 96-Loch-Schalen (B 4.1) mit einer Fläche von 0,33 cm²/Loch. Die Platte enthielt eine Leerwertreihe, eine Kontrollreihe sowie sechs Reihen mit je einer der sechs verschiedenen verwendeten Verdünnungen von Valproat. Vor der Aussaat wurde die Schale bei den HUVEC und den HCAEC mit Kollagen beschichtet und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in alle 12 Vertiefungen der sieben von acht Reihen ausgesät, so dass für jede Versuchsbedingung 12 Messungen resultierten. Es wurden jeweils 100 µl Medium mit je 5000 Zellen/cm² ausgesät, insgesamt wurden also 138600 Zellen in den 84 Vertiefungen kultiviert. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden in die 12 Vertiefungen der achten Reihe keine Zellen ausgesät, hier war nur Medium enthalten. Gleichzeitig wurden in den 12 Vertiefungen der ersten Reihe Zellen als Kontrolle mitgeführt.

Die Zellen wurden sechs Tage in Kultur gehalten und während der letzten fünf Tage wurden allen Zellen der Reihen zwei bis sieben Valproat in den Konzentrationen 300 µg, 250 µg, 200 µg, 150 µg, 100 µg, 100 µg und 50 µg zugegeben (Abb.3).

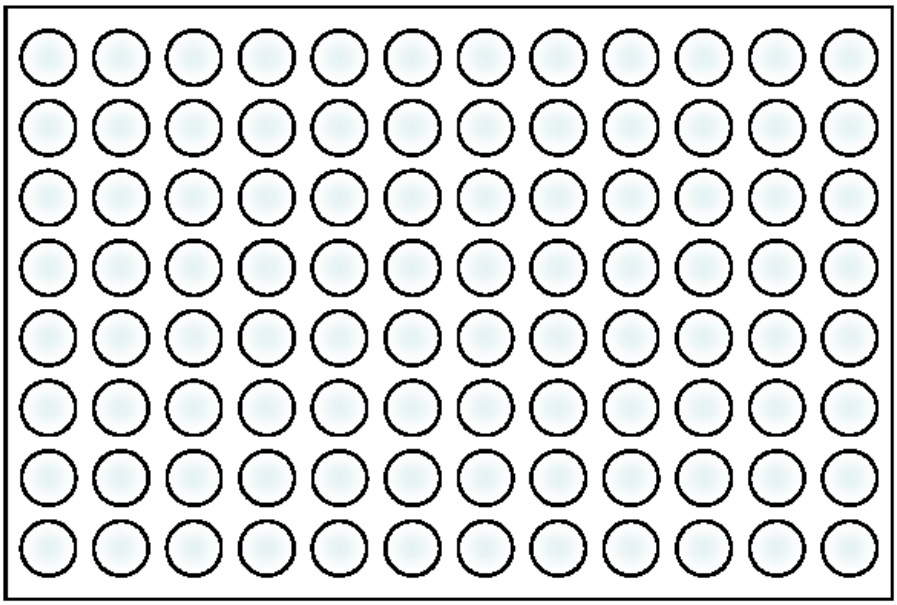

Abb. 3: Versuchsprotokoll des Vitalitätstests
Zugegebene Menge Valproat in absteigender Dosierung von 300-50 µg/ml

2.2.4.2 Messung der Zellvitalität

Am sechsten Tag nach Aussaat wurde jedem Loch der 96-Loch-Schale je 100 µl CellTiter-Glo Reagent (B 4.2) hinzugefügt, ohne vorher das Medium abzupipettieren. Die Schale wurde anschließend für 2 Minuten kreisend gemischt und daraufhin 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.
Das Prinzip des Testes beruht darauf, dass der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen in einer Reaktion mit Luziferase als Maß für die Anzahl vitaler Zellen gesehen wird. Während der Zelllyse der glatten Muskelzellen durch das zugegebene CellTiter-Glo Reagent werden endogene ATPasen aktiviert und das Lumineszenzsignal kann im Luminometer gemessen werden. Zusammenfassend lässt sich die ablaufende Reaktion so darstellen:
Luciferin + Magnesium + O_2 + ATP → Oxyluciferase + AMP + PP + CO_2 + Licht
Die relaive light units (RLU) wurden mit dem Programm MicroWin 2000 des Luminometers (B 4.3) für 0,25-1 sec./well gemessen.

2.2.4.3 Auswertung des Zellvitalitätstests

Es wurden die Mittelwerte der jeweils drei Versuchswerte der sechs Medikamentenkonzentrationen und der Kontrollen, sowie die Mittelwerte der Leerwerte berechnet. Von den Mittelwerten der Kontrollen und der mit Valproat behandelten Zellen wurde der Leerwertmittelwert subtrahiert. Der damit erhaltene Vitalitästmittelwert der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und mit den Vitalitätswerten der mit Medikament behandelten Zellen verglichen.

2.2.5 Statistik

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Versuchsergebnisse wurde ein paired-t-test des Programms SigmaStat 2.0 verwendet, es wurde eine Signifikanz für $p<0,05$ akzeptiert (B 5.0). Das Prinzip des paired-test beruht auf der Aufstellung einer Nullhypothese H0, welche besagt, dass sich unter Inkubation der verwendeten Zellen mit VPA in verschiedenen Konzentrationen keinerlei Effekt, das heißt weder eine Steigerung noch eine Hemmung der Proliferation der Zellen, ergibt. Eine zweiseitige Fragestellung wurde gewählt, um nicht nur eine mögliche Hemmung, sondern auch eine mögliche Steigerung der Proliferation durch Inkubation mit Valproat zu erfassen. Zur Überprüfung der aufgestellten Nullhypothese konnte anschließend, da es sich um einen Vergleich von Wertepaaren handelt, der paired-t-test herangezogen werden. Aufgrund kleiner Fallzahlen wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt.

2.2.6 SI/MPL-Ratios

Zur Ermittlung einer möglichen klinischen Relevanz der in vitro erhaltenen Ergebnisse verwendeten wir SI/MPL-Ratios. Die SI/MPL-Ratio errechnet sich als Relation zwischen dem signifikant hemmenden Effekt in vitro (significant inhibitory effect = SI) und dem maximalen Plasmaspiegel nach systemischer Applikation eines Medikamentes (maximal plasma level = MPL).

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Valproat auf die Proliferation von humanen koronaren Zellen

3.1.1 HUVEC

Mittels Zellcounter erfolgte die Auswertung der Beeinflussung der Proliferation von humanen umbilikalen Endothelzellen durch Zugabe von Valproat-Sodium.
Eine eventuelle Proliferationssteigerung oder Proliferationsinhibition der mit Valproat behandelten Zellen konnte nach Ermittlung der absoluten Zellzahlen als Prozentsatz der unbehandelten Zellen der mitgeführten Kontrolle (100%) nach Durchführung von drei Versuchen als Mittelwert angegeben werden.

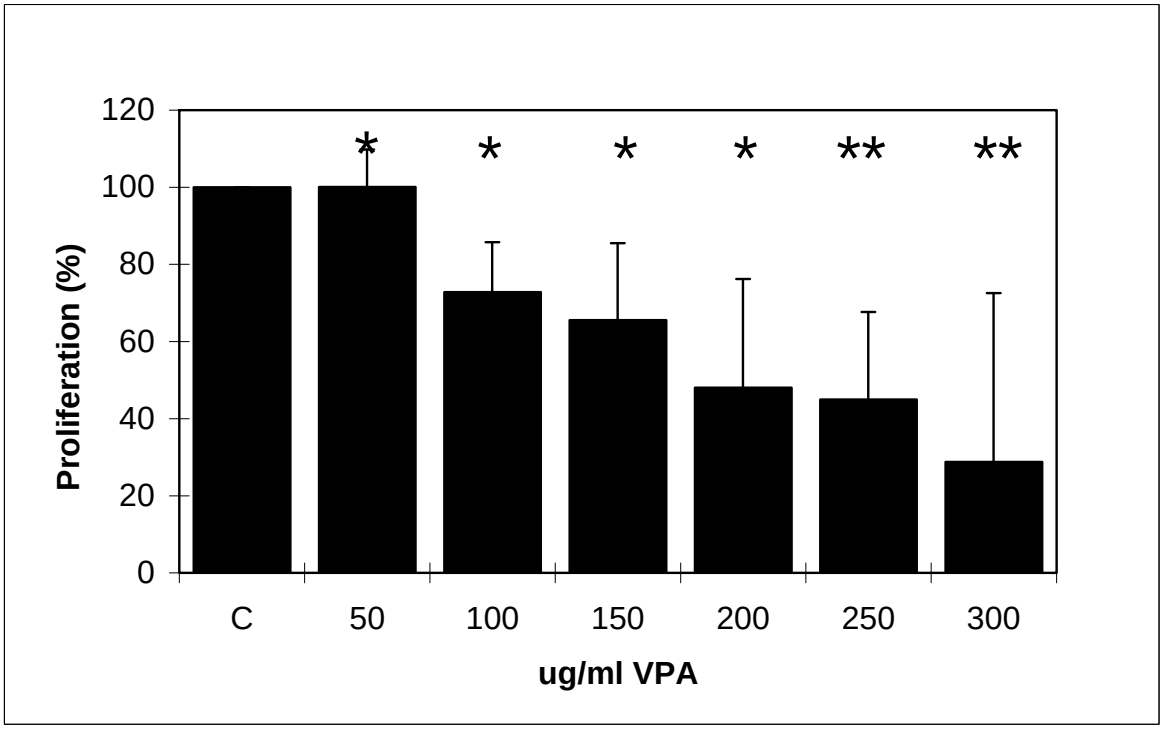

Abb. 4:Proliferation bei humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) in Prozent nach Inkubation mit Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C). Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen. p: * ≤ 0,05, ****** ≤ 0,01

Eine graphische Darstellung der Proliferation von HUVEC in Prozent nach Inkubation mit Valproat in den Dosierungen 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml und 300 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle liefert Abb. 4. Aus der Grafik lassen sich sowohl die Mittelwerte der Proliferation in Prozent als auch die Standardabweichungen der drei Versuche ersehen (Abb. 4).

Im Anschluss an die Versuchsauswertung erfolgte mittels paired-t-test die Untersuchung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse, wobei aufgrund kleiner Fallzahlen von einer Signifikanz ab $p<0,05$ ausgegangen werden kann.

Nach Inkubation der HUVEC mit 50 µg/ml VPA ergab sich im Vergleich zu der mitgeführten Kontrolle, bestehend aus unbehandelten HUVEC, keine Veränderung des Mittelwertes der Proliferation in Prozent (100,1 % $\pm$ 9,8 %).
Gemäß paired-t-test handelte es sich hierbei um ein nicht signifikantes Ergebnis.
Eine Abnahme der prozentualen Proliferationsrate zeigte sich bei Inkubation der HUVEC mit 100 µg/ml über sechs Tage: Der Mittelwert sank hierbei auf 72,8 $\pm$ 12,9 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Hierfür ergab sich ein signifikantes Ergebnis von $p \leq 0,05$ im paired-t-test.
Ein weiterer Abfall des Mittelwertes ergab sich bei der nächsthöheren Konzentration von VPA (150 µg/ml) auf 65,5 $\pm$ 20,0 %. Auch dieses Ergebnis erwies sich nach Überprüfung mittels paired-t-test als signifikant ($p \leq 0,05$).
Bei Inkubation der HUVEC mit 200 µg/ml VPA fand sich noch einmal ein starker Abfall der Proliferationsrate auf 48,0 $\pm$ 28,2 %, was unter Annahme von $p<0,05$ gemäß paired-t-test ein signifikantes Ergebnis darstellte.
Ein weiterer leichter Abfall auf 45,0 $\pm$ 22,7 % verglichen mit der Kontrollschale war bei Inkubation der Zellen mit 250 µg/ml VPA erkennbar.
Bei der höchsten Konzentration von VPA (300 µg/ml) zeigte sich im Versuch mit einem Abfall des Mittelwertes auf 28,8 $\pm$ 43,8 % noch einmal ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,01$).

3.1.2 HCMSMC

Wie bei den HUVEC erfolgte auch bei den HCMSMC die Ermittlung der Proliferationsrate am Zellcounter. Hierzu wurde eine etwaige Proliferationszunahme bzw. Proliferationsinhibition der mit Sodium-Valproat behandelten glatten Muskelzellen als prozentualer Anteil der Proliferation der unbehandelten Kontrollzellreihen als Mittelwert aus fünf durchgeführten Versuchen ermittelt.
Die erhaltenen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen werden im Folgenden erläutert. Wiederum wurde mit dem paired-t-test die statistische Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse untersucht, so dass im Anschluß daran eine Aussage möglich wird, ob VPA die Proliferation der HCMSMC signifikant beeinflusst.
Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der Proliferationsrate der HCMSMC nach Inkubation mit VPA in verschiedenen Konzentrationen in Prozent, ebenso sind die Standardabweichungen ersichtlich:

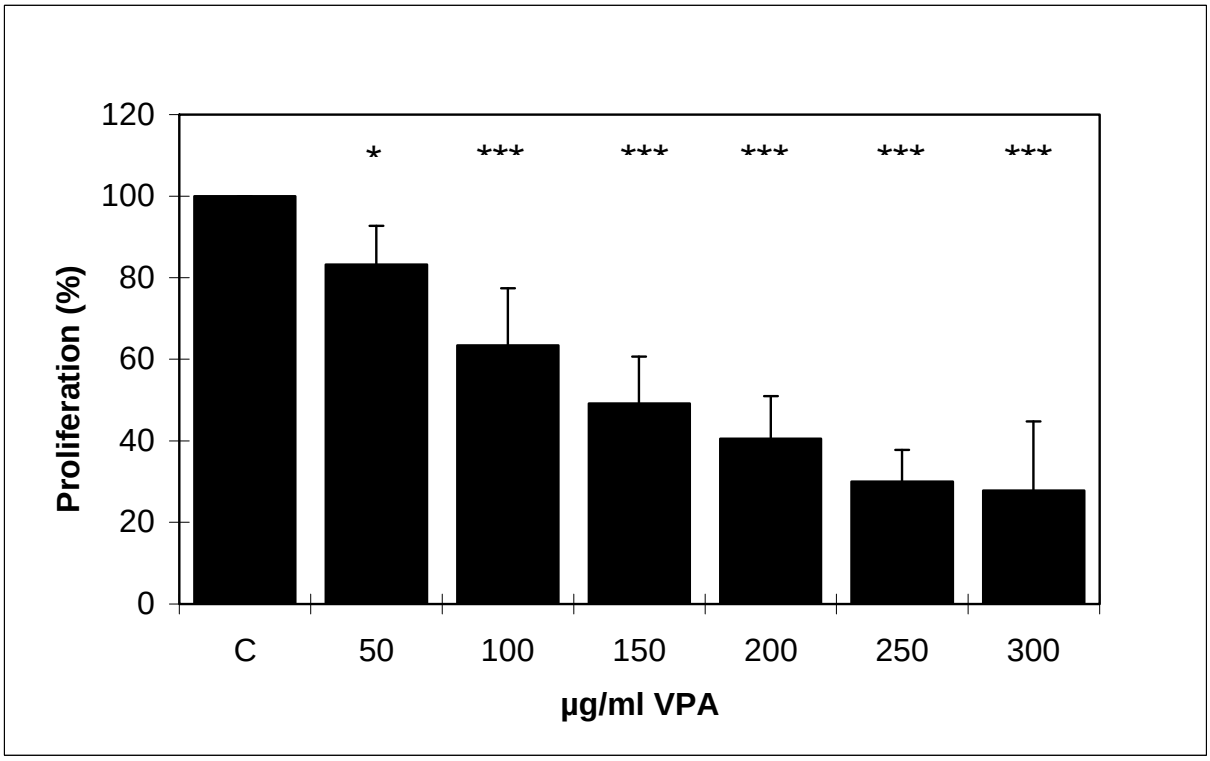

Abb.5: Proliferation bei humanen glatten Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) in Prozent nach Inkubation mit Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C). Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen. p: * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001

Unter der Annahme, die Proliferation der Kontrolle betrage 100 %, erfuhren die mit 50 µg/ml VPA inkubierten glatten Muskelzellen einen Abfall des Mittelwertes auf 83,3% ± 9,5% verglichen mit der Kontrolle, was auch gemäß des paired-t-tests ein signifikantes Ergebnis von $p \leq 0,05$ darstellte. Ein Absinken des Mittelwertes war auch bei den folgenden höheren VPA-Konzentrationen zu beobachten:

So lag der Mittelwert der mit 100 µg/ml VPA inkubierten Zellen bei 63,4% ± 14,1%, derjenige der mit 150 µg/ml VPA über sechs Tage inkubierten Zellen noch bei 49,2% ± 11,5%. Bei beiden Ergebnissen handelte es sich nach einer Überprüfung mittels paired-t-tests um signifikante Ergebnisse ($p \leq 0,001$).

Auch die nächsthöhere Konzentration führte zu einem weiteren Abfall der mittleren Proliferationsrate verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellpopulationen: Bei Inkubation der glatten Muskelzellen mit 200 µg/ml VPA lag die gemittelte Proliferationsrate bei 40,5% ± 10,5% ($p \leq 0,001$).

Unter der höchsten und zweithöchsten VPA-Konzentration erfuhr der Mittelwert noch einmal einen signifikanten, deutlichen Abfall. So lag der Mittelwert der Proliferation unter 250 µg/ml VPA nur noch bei 30,0% ± 7,8% ($p \leq 0,001$) und fiel schließlich unter Inkubation mit der höchsten Konzentration an VPA (300 µg/ml) bis auf 27,8% ± 17,0% ab ($p \leq 0,001$).

3.1.3 HCAEC

Wie bei den anderen beiden Zellarten (HUVEC und HCMSMC) wurden auch die Proliferationstests der HCAEC mit dem Zellcounter ausgewertet.
Aus drei Versuchen mit HCAEC konnte im Anschluß die Proliferationsänderung der mit Sodium-Valproat behandelten Zellen prozentual zur Proliferation der unbehandelten Kontrollzellpopulationen als Mittelwert berechnet werden.
Wieder wurde mithilfe des paired-t-tests die statistische Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse beurteilt, wobei die Annahme $p<0,05$ für ein signifikantes Ergebnis beibehalten wurde.
Eine grafische Übersichtsdarstellung der Proliferationsrate der HCAEC unter VPA-Inkubation und der Standardabweichungen liefert Abbildung 6.

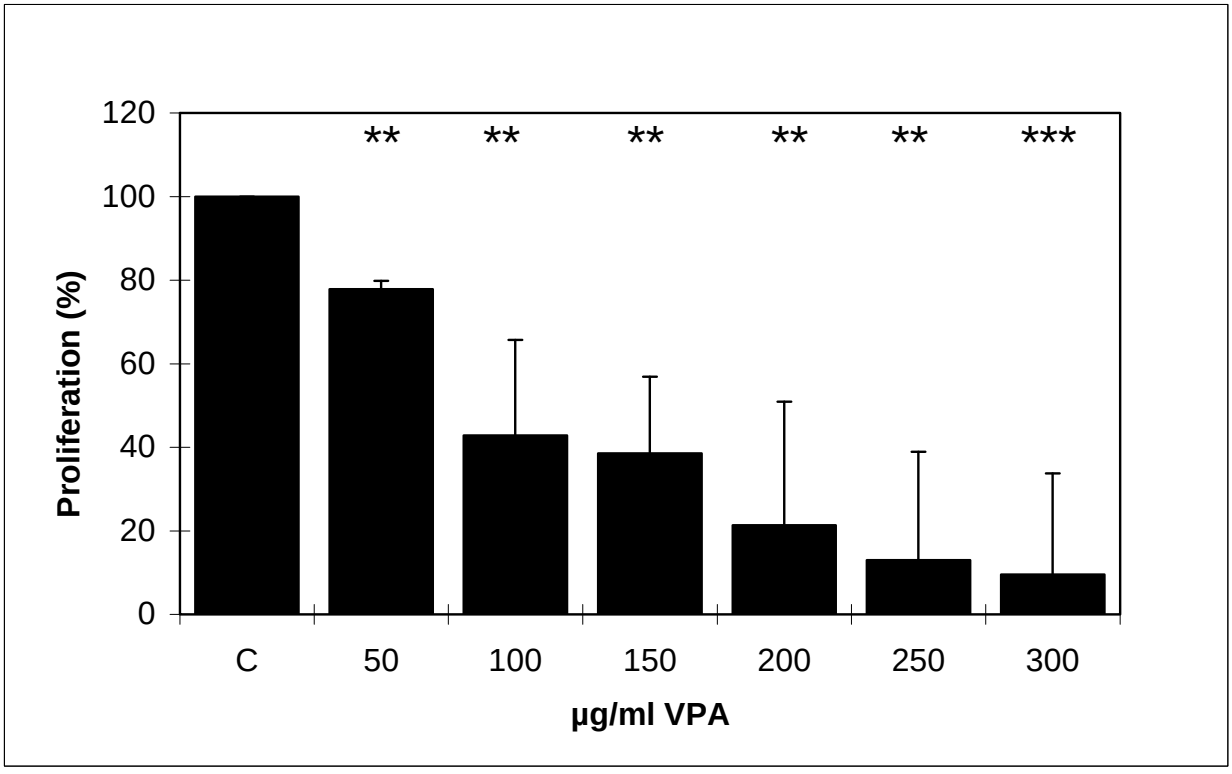

Abb.6: Proliferation bei humanen koronaren arteriellen Endothelzellen (HCAEC) in Prozent nach Inkubation mit Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C). Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.
p: ** ≤ 0,01, ** ≤ 0,001

Verglichen mit der Proliferationsrate der Kontrolle (C), die bei 100 % angenommen wurde, erfuhren bereits die mit 50 µg/ml VPA inkubierten HCAEC eine Hemmung der Proliferation, so dass sich hier ein Prozentsatz von 77,8% ± 2,0% bezogen auf die Kontrollzellpopulation ergab.
Eine weitere starke Zellproliferationshemmung war bei Inkubation der Zellen mit 100 µg/ml VPA mit einem Proliferationsrückgang auf 42,8% ± 22,9% zu verzeichnen.
Ein weiterer leichter Abfall auf 38,6% ± 18,4% konnte bei Inkubation der HCAEC mit 150 µg/ml VPA beobachtet werden.
Sowohl bei der Konzentration 50 µg/ml als auch bei den Konzentrationen 100 µg/ml und 150 µg/ml VPA handelte es sich jeweils nach Überprüfung mittels paired-t-test um signifikante Ergebnisse ($p \leq 0,01$).
Erwartungsgemäß fiel die Proliferationsrate der HCAEC unter der nächsthöheren VPA-Konzentration von 200 µg/ml weiter ab auf 21,3% ± 29,7%, entsprechend den vorherigen Ergebnissen war dies wiederum ein signifikantes Resultat.
Auch eine Inkubation mit 250 µg/ml VPA resultierte in einem Abfall der Zellproliferation, prozentual anteilig zur Proliferation der Kontrollzellen lag die der untersuchten HCAEC noch bei 13,0% ± 26,0%. Zuletzt kam es auch unter Zugabe von 300 µg/ml VPA zu einer Erniedrigung der Proliferation auf nur noch 9,6% ± 24,2%. Bei beiden letztgenannten Ergebnissen handelte es sich um signifikante Resultate mit $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$.

3.1.4. Proliferation der HUVEC, HCMSMC und HCAEC nach Inkubation mit VPA im Vergleich

Zusammenfassend (Abb.7) lässt sich konstatieren, dass alle drei untersuchten Zellarten (HUVEC, HCMSMC und HCAEC) durch Inkubation mit ansteigenden VPA-Konzentrationen eine zunehmend höhere Proliferationsinhibition erfuhren, wobei die Inhibition bei vergleichbaren Konzentrationen von VPA bei den HCMSMC ausgeprägter war als bei den HUVEC, und die Inhibition der HCAEC nochmals ausgeprägter als die der HCMSMC und damit sehr viel deutlicher als die der HUVEC.

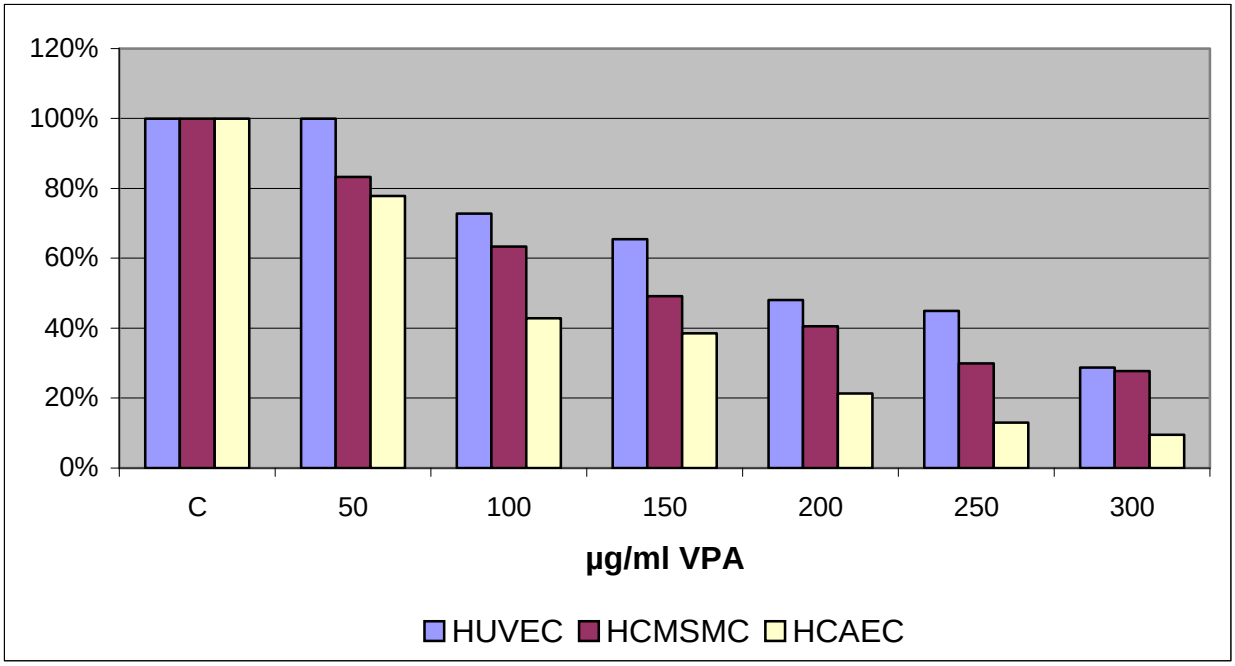

Abb. 7: Proliferation bei humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC), humanen glatten Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) und humanen koronaren arteriellen Endothelzellen (HCAEC) in Prozent nach Inkubation mit Valproat (VPA) im Vergleich und im Vergleich zur Kontrolle (C).
Zweidimensionale Darstellung

3.2 Effekte von Valproat auf die Vitalität von humanen koronaren Zellen

3.2.1 Vitalität der HUVEC nach Inkubation mit VPA

Zur Untersuchung der Vitalität der HUVEC nach Zugabe von VPA wurde das CellTiter-Glo^{TM}-System verwendet, welches auf der Messung der relative light units (RLU) beruht.
Das Prinzip der Vitalitätsmessung mit diesem System beruht darauf, dass eine umso größere Menge ATP gebildet wird, je mehr Zellen vital sind, was letztlich in einer größeren Anzahl gemessener relative light units (RLU) resultiert.
Die mitgeführte Kontrolle ohne Zugabe von VPA wurde als Vitalität=100% gesetzt.
Die Änderung der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen VPA wurde in Abhängigkeit zur Kontrolle erfasst und als prozentualer Anteil dieser angegeben.

Bereits bei Inkubation mit 50 µg/ml VPA konnte man eine Reduktion der Zellvitalität der HUVEC auf noch 80,7 ± 2,9% beobachten. Die Vitalität nahm weiter ab unter Zugabe von 100 µg/ml VPA auf 72,9 ± 4,8%. Auch unter der nächsthöheren VPA-Konzentration von 150 µg/ml reduzierte sich die Vitalität der HUVEC weiter, um einen Wert von 68,3 ± 2,33% anzunehmen. Die Verminderung der Vitalität der Zellen setzte sich fort unter 200 µg/ml Medikament und betrug im Vergleich zur Kontrolle 59,6 ± 3,2%. Sowohl die zweithöchste als auch die höchste Sodium-Valproat-Konzentration von 250 µg/ml bzw. 300 µg/ml erniedrigte die Vitalität der HUVEC nochmals auf 55,7 ± 2,6% bzw. 51,1 ± 8,1% (vgl. Abb. 8).

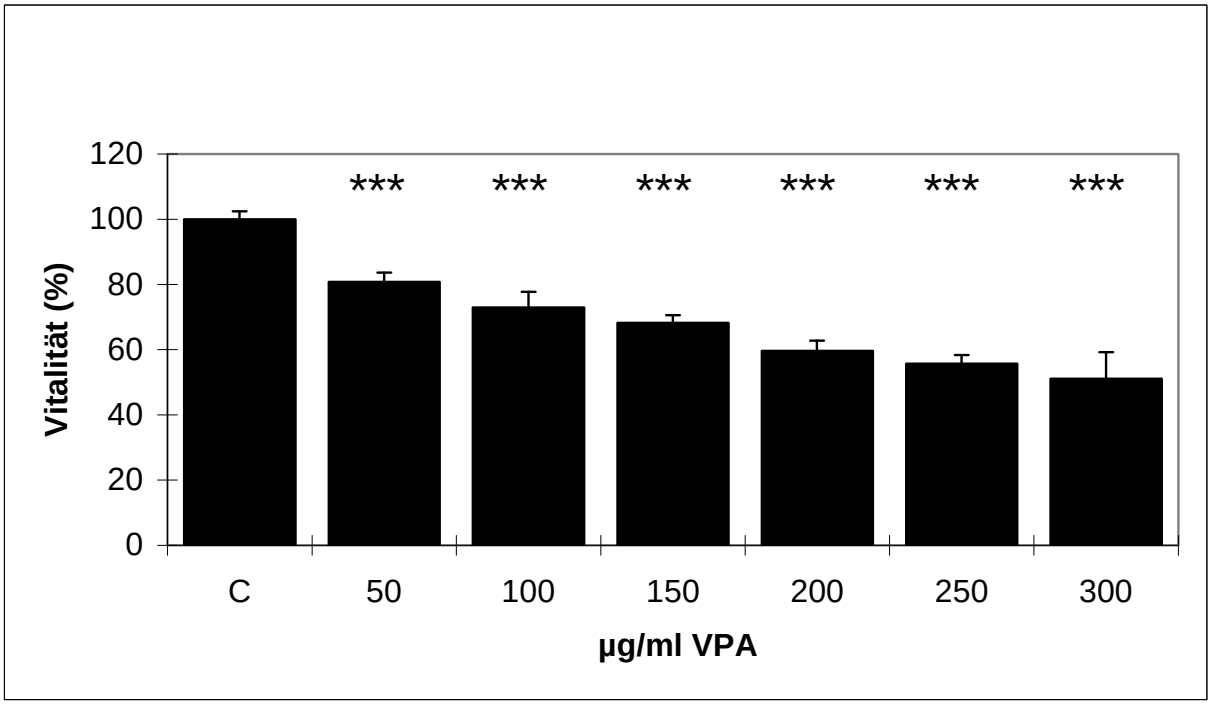

Abb.8: Vitalität bei humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) in Prozent nach Zugabe von Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C). Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass es dosisabhängig zu einer Vitalitätsreduktion der HUVEC unter Inkubation mit VPA kam.

3.2.2 Vitalität der HCMSMC nach Inkubation mit VPA

Ebenso wie bei den HUVEC wurde die Vitalität der HCMSMC mithilfe des CellTiter-Glo^{TM}-System versuchsweise ermittelt. Wie schon bei den HUVEC kam es auch bei den HCMSMC durch Inkubation mit VPA zu einer Reduktion des Anteils vitaler Zellen: Bei Inkubation mit 50 µg/ml VPA betrug dieser noch 92,8 ± 6,3%, bei Zugabe von 100 µg/ml VPA lag der Anteil vitaler glatter Muskelzellen bei 89,8 ± 4,0% verglichen mit der Kontrolle. Bei Inkubation mit 150 µg/ml VPA war eine Vitalität der HCMSMC von 85,3 ± 5,8% detektierbar, bei 200 µg/ml VPA lag sie bei 82,7 ± 7,0%. Eine weitere Erhöhung der Valproatkonzentration führte zu einer Reduktion der Zellvitalität, die absank auf 80,1 ± 9,6%. Die höchste VPA-Konzentration von 300 µg/ml schließlich ließ die Vitalität der inkubierten glatten Muskelzellen abfallen auf 72,5 ± 14,2% (Abb.9).

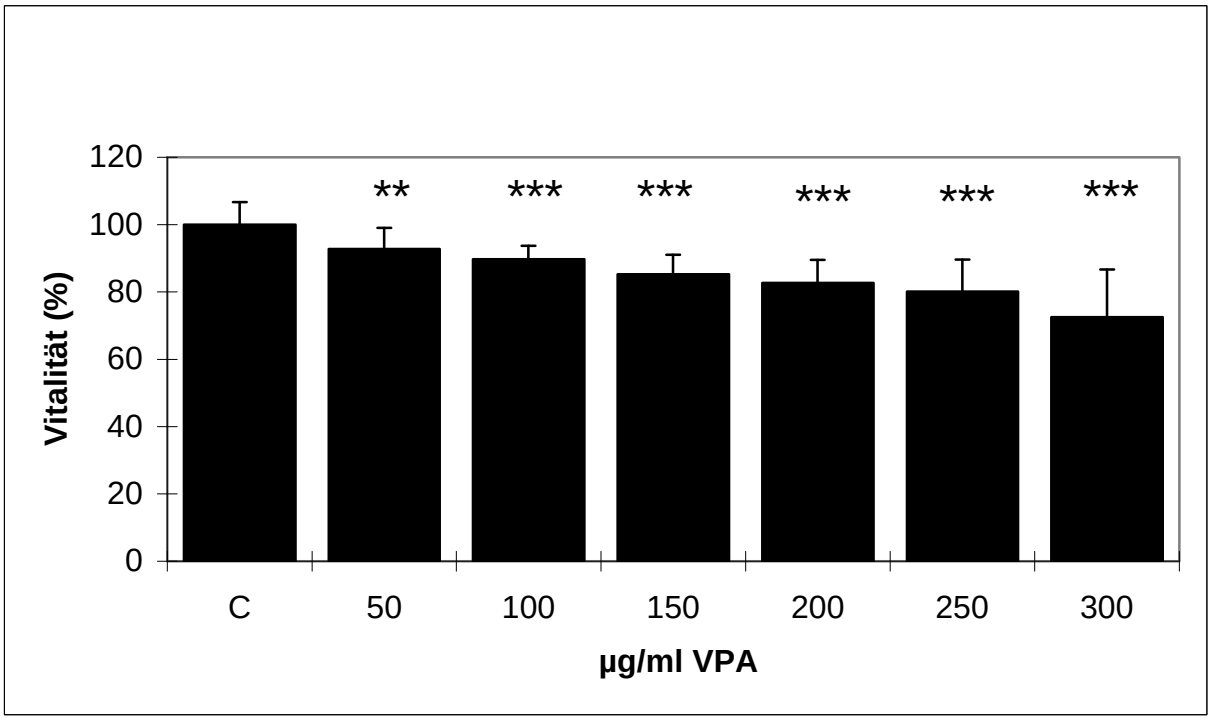

Abb.9: Vitalität bei humanen koronaren glatten Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) in Prozent nach Zugabe von Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle. Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.

3.2.3 Vitalität der HCAEC nach Inkubation mit VPA

Zur Testung der Vitalität der mit VPA inkubierten HCAEC wurde in gleicher Weise verfahren wie bei den HUVEC und HCMSMC.
Auch hier zeigte sich in Abhängigkeit von der zugegebenen VPA-Konzentration eine herabgesetzte Vitalität der Zellen nach Auswertung der Versuche. Bei Inkubation mit 50 µg/ml VPA sank bereits die Vitalität auf einen Wert von 89,5 ± 3,7% ab, einen weiteren Abfall auf 77,9 ± 3,3% erfuhr sie unter 100 µg/ml VPA. Die beiden nächsthöheren Konzentrationen von 150 µg/ml und 200 µg/ml VPA reduzierten die Vitalität der HCAEC weiter auf 65,0 ± 6,8% bzw. 57,4 ± 3,7% im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle. Ein starkes Absinken der Vitalität der Zellen konnte unter Zugabe von 250 µg/ml VPA auf einen Wert von 48,3 ± 3,9% beobachtet werden, und die Inkubation mit 300 µg/ml VPA schließlich führte zu einem Wert von 42,6 ± 6,2%. Im Gegensatz zu HUVEC und HCMSMC ist die Vitalitätsreduktion unter zunehmend höherer VPA-Dosis bei den HCAEC noch deutlicher ausgeprägt, der Wert liegt bei Inkubation mit der höchsten VPA-Dosis von 300 µg/ml nur noch bei 42,6 ± 6,2%.
(s. Abb10).

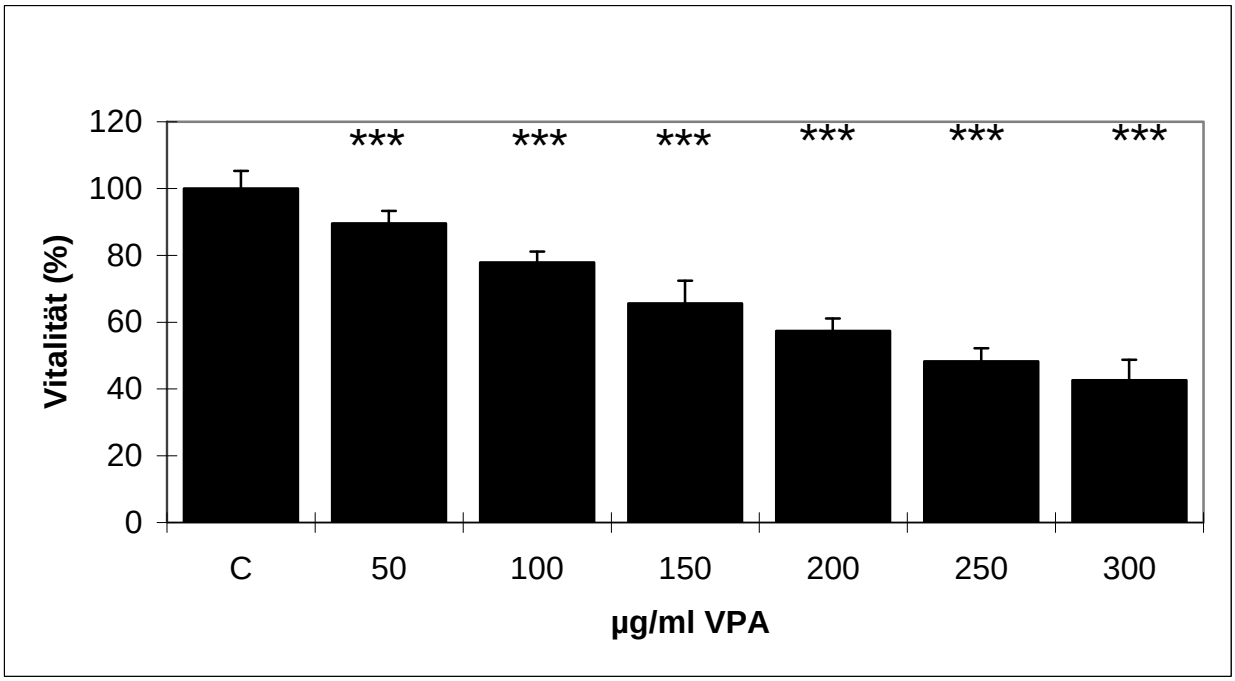

Abb. 10: Vitalität bei humanen koronaren arteriellen Endothelzellen (HCAEC) in Prozent nach Zugave von Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C).
Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen

3.2.4. Vitalität der HUVEC, HCMSMC und HCAEC im Vergleich

Zusammenfassend (Abb.11) lässt sich feststellen, dass alle drei untersuchten Zellarten eine dosisabhängige Reduktion ihrer Vitalität durch Inkubation mit Valproat erfuhren, dass die verschiedenen Zellarten jedoch in unterschiedlichem Maße mit einem Vitalitätsrückgang auf das Medikament reagierten: Am unempfindlichsten schienen die glatten Muskelzellen (HCMSMC) bezüglich einer Beeinflussung ihrer Vitalität durch VPA zu sein, während die HCAEC weniger resistent gegen diesen äußeren Einfluß zu sein schienen und sich die HUVEC verglichen mit den beiden anderen Zellarten in der Mitte bewegten, was ihre Reaktion auf die Medikamentenzugabe betraf.

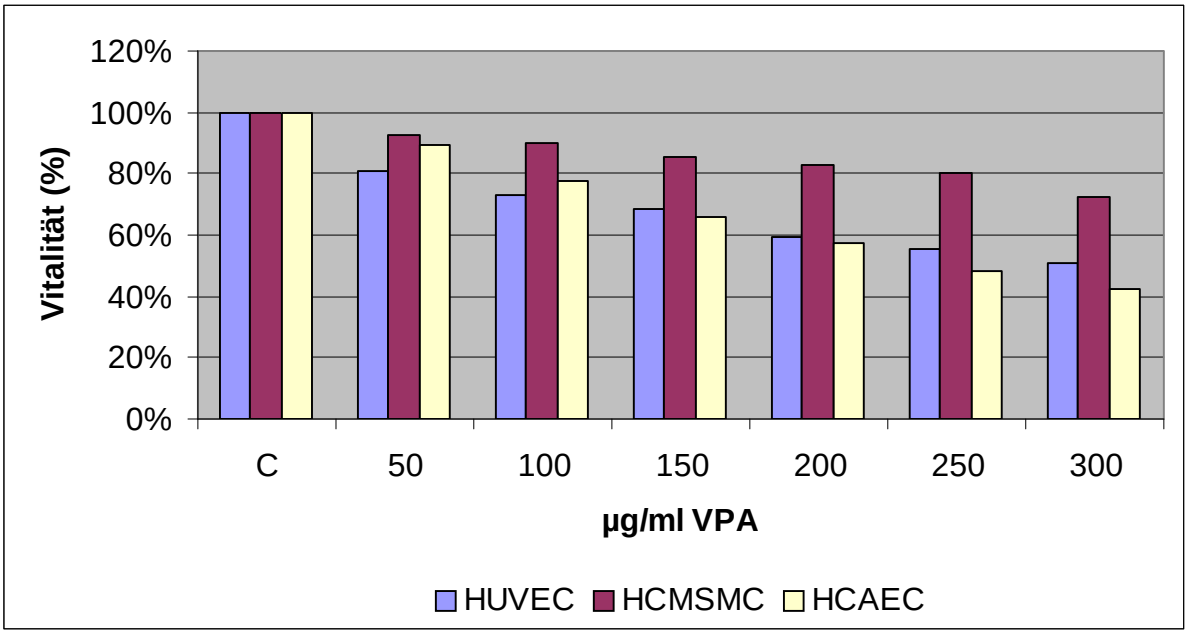

Abb. 11: Vitalität bei humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC), humanen koronaren glatten Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) und humanen koronaren arteriellen Endothelzellen (HCAEC) in Prozent nach Zugabe von Valproat (VPA) im Vergleich und im Vergleich zur Kontrolle (C).

3.3 Effekte von VPA auf die Migration der HCMSMC

Zur Auswertung der Beeinflussung des Migrationsverhaltens von glatten Muskelzellen aus der Gefäßmedia durch Inkubation mit Sodium-Valproat wurde ein Migrations-Assay nach dem Boyden Chamber-Prinzip verwendet.
Dabei machte man sich die Fähigkeit der HCMSMC zur Migration auf chemotaktische Reize hin zunutze: Es wurde untersucht, inwieweit die Migration der Zellen durch die Zugabe von Valproat in die untere Abteilung der Boyden Kammer, welche durch einen von Poren durchsetzten Filter von der oberen Abteilung, in die die Zellen ausgesät werden, getrennt ist, beeinflusst wurde. Dies gelang durch Anfärben der durch die Poren migrierten Zellen und anschließende fotometrische Messung und damit Quantifizierung.

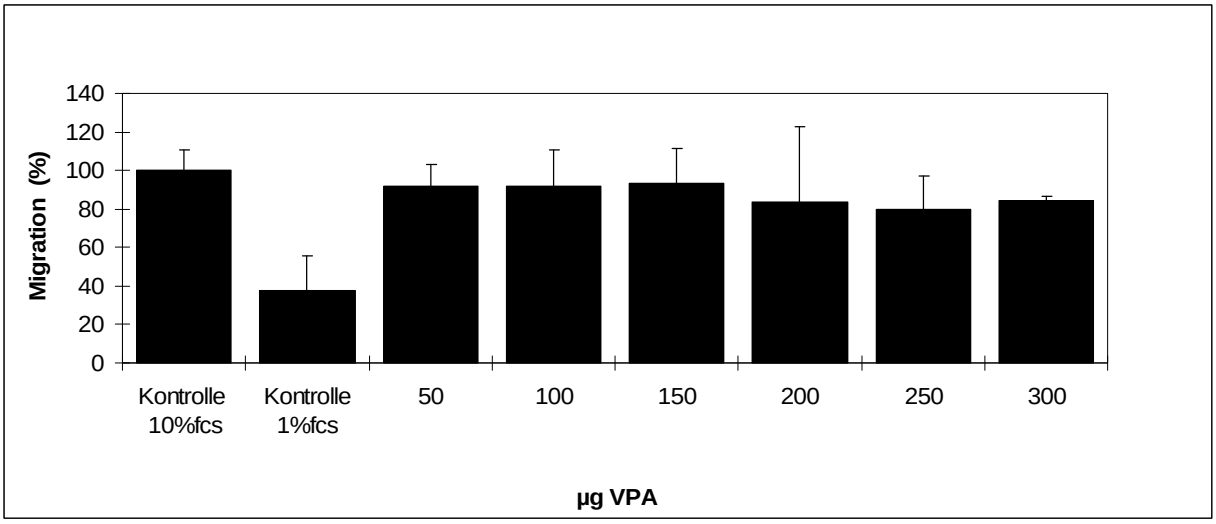

Abb 12: Migration bei humanen koronaren glatten Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) nach Inkubation mit Valproat (VPA) im Vergleich zur Kontrolle (C). Ersichtlich sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.

Die Migration der Zellen der mitgeführten Kontrolle, welche in 10% serumhaltigem Medium inkubiert wurden, wurde gleich 100% gesetzt und anschließend der prozentuale Anteil der Veränderung des Migrationsverhaltens der mit unterschiedlichen Dosierungen von VPA inkubierten Zellen im Vergleich zu dieser Kontrolle erfasst.
Bei Inkubation der HCMSMC mit 50 µg/ml VPA ergab sich im Vergleich zur Kontrolle ein prozentualer Anteil von migrierenden Zellen von 91,7 ± 11,3% (s. Abb.12). Ein sehr ähnliches Migrationsverhalten wiesen die Zellen auch unter Inkubation mit der nächsthöheren VPA-Konzentration von 100 µg/ml auf: Hier ergab sich ein Anteil von 91,9 ± 18,7%.
Bei weiterer Erhöhung der Dosis von VPA auf 150 µg/ml resultierte sogar ein noch höherer Prozentsatz an migrierenden Zellen von 93,3 ± 17,9% verglichen mit der Kontrolle.
Unter 200 µg/ml VPA kam es zu einem Abfall des prozentualen Anteils der Zellen, die die Fähigkeit zur Migration durch die Filtermembran besaßen, auf 83,2%, jedoch mit einer hohen Standardabweichung von ± 39,5%. Die leicht rückläufige Tendenz setzte sich unter 250 µg/ml VPA fort und resultierte in einem Ergebnis von 79,8 ± 17,3% im Vergleich zur Kontrollzellpopulation, welche nicht medikamenteninkubiert war. Bei Inkubation mit der höchsten und letzten Konzentration von Sodium-Valproat (300 µg/ml) ließ sich wieder ein leichter Anstieg der migrierenden Zellen auf einen Anteil von 84,2 ± 2,3% feststellen.

Gemäß der erhaltenen Ergebnisse lässt sich festhalten, dass durch Inkubation mit Sodium-Valproat keine signifikante Beeinflussung des Migrationsverhaltens der HCMSMC erfolgt und dass sich auch durch zunehmende Steigerung der VPA-Dosis keine prägnante Veränderung der Migration der Zellen hervorrufen lässt. Zwar kam es unter Inkubation mit 200 µg/ml und 250 µg/ml zu einem scheinbaren Abfall des prozentualen Anteils migrierender Zellen verglichen mit der Kontrolle, unter der höchsten der in unserem Versuch verwendeten Konzentration von Valproat (300 µg/ml) jedoch kam es wiederum zu einem Anstieg der Migration, so dass hier unter Berücksichtigung der Standardabweichung keine Beeinflussung der Migration glatter Muskelzellen der Media durch Sodium-Valproat vorzuliegen scheint.

4. Diskussion

4.1. Die Restenose als Problem der interventionellen Kardiologie

Nach Entwicklung der PTCA im Jahre 1979 (Grüntzig et al, 1979) stellte die Einführung und Weiterentwickung der Stentimplantation eine der größten Errungenschaften der interventionellen Kardiologie dar. Wenngleich auch durch die Stentimplantation die Restenoserate deutlich gesenkt werden kann, stellt letztere weiterhin eines der größten und bislang nur ungenügend gelösten Probleme der Kardiologie dar. Zu einer Restenose nach koronararterieller Intervention kommt es trotz Stentimplantation mit einer Häufigkeit von 20-30%, somit stellt die Restenose unter anderem auch eine große finanzielle Belastung für das Gesundheitswesen dar (Poon et al, 2002). Eine Möglichkeit, die Entstehung von In-Stent-Restenosen zu reduzieren, stellt die in den letzten Jahren zunehmende Verwendung von Medikamenten-beschichteten Stents (DES) dar, eine attraktive Alternative zu den seit 1994 eingesetzten unbeschichteten Stents (BMS), da ihre Verwendung zu einem Rückgang der Reinterventionsrate führte (Ligthart et al, 2007).

Ein Vorteil der mit antiproliferativen Substanzen beschichteten Stents gegenüber der systemischen Medikamentenverabreichung besteht darin, dass sie eine hohe lokale Gewebekonzentration des Medikaments im Bereich der Gefäßläsion ohne systemische Nebenwirkungen erreichen (Fattori und Piva, 2003). Bei der systemischen Gabe können signifikante antiproliferative Effekte leider of nur durch Plasmaspiegel erreicht werden, welche die zulässige Maximalkonzentration um ein Vielfaches übersteigen.

Es gibt deutliche Hinweise dafür, dass es über verschiedene Reaktionsmechanismen der Gefäßwand im Rahmen von koronarer Intervention und Stentimplantation zu In-Stent-Restenosen kommt. Drei wesentliche Prozesse werden hierfür verantwortlich gemacht: elastische Rückstellkräfte der Gefäßwand, negatives Remodeling und die Hyperplasie der Neointima. Letztere wird bedingt durch die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und die Ablagerung von extrazellulärer Matrix (Costa u. Simon, 2005, Charron et al, 2006). Insbesondere konnte durch experimentelle Studien die Vermutung bekräftigt werden, dass die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen für die Ausbildung einer Neointima nach mechanischer Verletzung, wie sie z.B. im Rahmen einer PTCA oder Stentimplantation verursacht

wird, eine entscheidende Rolle spielt (Boehm et al, 2004). Sollte es also möglich sein, medikamentös, z.B. im Rahmen der Implantation von DES (drug eluting stents), diese gesteigerte Proliferation der koronaren glatten Gefäßmuskelzellen zu hemmen, könnte dies eine erhebliche Beeinflussung der Restenose zur Folge haben. Infolgedessen wurden Stoffe mit starkem antiproliferativem Effekt auf menschliche koronare Gefäßzellen in in vitro-Versuchen untersucht, wie z.B. Calciumkanalinhibitoren (Voisard et al, 1997), Steroide (Duenas-Gonzalez et al, 2008) und Zytostatika (Voisard et al, 1997). Aufgrund einer zu niedrigen Dosierung von systemisch applizierten Stoffen scheiterten in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts mehr als 50 klinische Studien, die sich mit dem Thema Restenose befassten und verursachten der Pharmaindustrie Verlustgeschäfte in Millionenhöhe (Voisard et al, 2004).

Um bereits vorher abschätzen zu können, ob die Testung eines Medikamentes in einer klinischen Studie lohnenswert ist, empfahlen wir bereits früher, die SI/MPL-Ratio (Voisard et al, 2004 und 2007) anzuwenden. Diese errechnet sich aus dem Verhältnis zwischen derjenigen Medikamentenkonzentration mit einem signifikanten hemmenden Effekt in vitro (SI = significant inhibitory effect) und dem maximalen Plasmaspiegel (MPL = maximal plasma level) des untersuchten Medikaments in vivo. SI/MPL-Ratios <1 weisen auf Medikamentenwirkungen hin, von denen man zumindest theoretisch erwarten kann, sie nach systemischer Verabreichung auch in vivo zu finden. SI/MPL-Ratios >1 beschreiben Wirkungen, die in vivo lediglich nach hochdosierter lokaler Verabreichung gesehen werden, so zum Beispiel bei medikamentenfreisetzenden Stents (DES).

4.2 Wirkungen von Valproat auf humane koronare Zellen

Die vorliegende in vitro-Studie untersucht die Effekte von VPA auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen als Schlüsselereignisse in der Restenoseentstehung nach koronararteriellen Interventionen (Dartsch et al, 1990 und Bauriedel et al, 1992).

VPA ist ein gängiges Medikamente in der Langzeitbehandlung von Epilepsie. Dies aus mehreren Gründen:
Es kann oral verabreich werden, unerwünschte Wirkungen sind selten und die pharmakokinetischen Eigenschaften sind vorteilhaft.
Histondeacetylasehemmer (HDAC) wie VPA stellen eine vielversprechende Gruppe antineoplastischer Medikamente mit Beeinflussung von Tumorgröße, -differenzierung und –invasion dar. Antiproliferative Wirkungen von VPA wurden bereits anhand von in-vitro-Versuchen mit Zelllinien humaner Gliomzellen
(Knüpfer et al, 2001), Nierenzellkarzinomen sowie Colon- und Pankreaskarzinomen (Jones et al, 2008) beschrieben.
Histondeacetylasehemmer sind potente antineoplastische Medikamente, die Differenzierung, Wachstumsstillstand und Apoptose von transformierten Zellen induzieren (Marks et al, 2001; Vigushin et al, 2002; Rosato et al, 2003).
Vor Kurzem wurde für Histondeacetylasehemmer eine Verstärkung ihrer zellschädigenden Wirkung durch Medikamente, welche als Ziel direkt die DNA haben, berichtet (Marchion et al, 2005; Catalano et al, 2006). Der genaue Mechanismus, dem dieser Effekt unterliegt, ist jedoch bislang wenig verstanden.
Catalano et al zeigten 2006, dass VPA die Wirkung von Paclitaxel auf Zellüberleben und Apoptose offensichtlich dadurch verstärkt, dass es in die Regulierung der Tubulinacetylierung eingreift.
Das et al untersuchten 2007 die Fähigkeit von VPA, die Genexpression zu modulieren und Glioblastomzellen gegenüber den zxtotoxischen Effekten von Etoposid in vitro zu sensibilisieren.

In der vorgelegten Arbeit ergaben sich bezüglich der Fähigkeit von Valproat, die Proliferation von menschlichen Koronarzellen zu beeinflussen, drei wesentliche Ergebnisse:
Als Erstes konnte gezeigt werden, dass sich sowohl bei der Inkubation von HUVEC ($p<0,05$) als auch von HCAEC ($p<0,01$) und HCMSMC ($p<0,001$) mit VPA in Konzentrationen von 50-300 µg/ml ein dosisabhängiger signifikanter antiproliferativer Effekt ergab.
Zweitens zeigte sich keine Beeinflussung der Zellmigration nach Inkubation von HCMSMC mit VPA in Konzentrationen von 50-300 µg/ml.

Drittens ist der antiproliferative Effekt von VPA zumindest teilweise durch zytotoxische Effekte begründet.

In der aktuellen Studie wurden gering ausgeprägte, jedoch signifikante antiproliferative Effekte sowohl auf HCAEC als auch HCMSMC nach Inkubation mit VPA in einer Konzentration von 50 µg/ml (SI/MPL-Ratio: 0,5) ermittelt. Eine SI/MPL-Ratio von 0,5 beschreibt einen antiproliferativen in-vitro-Effekt, welcher mit 50% des maximal erreichbaren Plasmaspiegels nach systemischer Applikation des Medikamentes erzielt wird. Daraus folgt, dass man zumindest theoretisch eine geringe antiproliferative Wirkung von VPA nach systemischer Medikamentengabe in einer Dosierung von 50 µg/ml erwarten kann. Es ist den Autoren unbekannt, ob das Restenoserisiko bei Epilepsiekranken, welche eine systemische Therapie mit VPA erhalten, verringert ist oder nicht. Dies könnte Untersuchungsziel weiterer Studien sein.

Signifikante proliferationshemmende Effekte von mehr als 50% zeigten sich nach Inkubation von HCAEC mit VPA in Konzentrationen ≥100 µg/ml (SI/MPL-Ratio:1) und von HCMSMC nach Inkubation mit VPA in Konzentrationen ≥150 µg/ml (SI/MPL-Ratio:1,5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HCAEC verglichen mit HCMSMC in vitro sensitiver gegenüber der Wirkung von VPA sind.
Sollte diese Entdeckung übertragbar auf die in-vivo-Situation sein, würde die nachteilige Hemmung von Endothelzellen vor dem hemmenden Effekt auf HCMSMC wirksam werden.

Ferner ist eine stark antiproliverative Wirkung auf HCMSMC nach Verabreichung von VPA in einer Konzentration von 150 µg/ml zu erwarten, das 1,5-fache der maximal zulässigen Plasmakonzentration des Medikamentes. Folglich kann das große antiproliferative Potenzial von VPA lediglich im Rahmen einer lokalen hochdosierten Medikamentenapplikation, wie zum Beispiel im Rahmen von DES, zum Tragen kommen.

Die Zellmigration von HCMSMC durch eine poröse Filtermembran wurde in einer modifizierten Boyden Kammer (Boyden et al, 1962 und Kleinman et al, 2001) studiert, die aus einem oberen und einem unteren Kompartiment besteht. Weil bei dieser Arbeit die chemotaktische Zellmigration im Vordergrund stand, wurde das Medikament wie beschrieben dem unteren Kompartiment zugesetzt (Boyden et al, 1962 und Kleinman et al, 2001). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine hemmende Wirkung auf die Zellmigration von HCMSMC nach Inkubation mit VPA in Konzentrationen von 50 µg/ml bis 300 µg/ml.

4.3 Die Beeinflussung der Proliferation und Migration durch Valproat in früheren Veröffentlichungen

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse entsprechen früheren Veröffentlichungen von Jones et al (2008), welche sich mit der Wirkung von VPA auf die Proliferation von Nierenzellkarzinomen (RCC-Zellen, Jones et al, 2008), Colon- und Pankreaskarzinomzellen (Jones et al, 2008) beschäftigten. Humane Adenokarzinomzellen des Colons (HAT-29-Zellen, Jones et al, 2008) und Pankreaskarzinomzellen (DanG-Zellen, Jones et al, 2008) wurden mit VPA in einer Konzentration von 1 mM für drei und fünf Tage kultiviert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation beider Zelllinien maßgeblich gehemmt. Bei den RCC-Zellen (Jones et al, 2008) wurde die Wirkung nach Inkubation mit VPA in Konzentrationen von 0,25, 0,5 und 1 mM, was 41,6 µg/ml, 83,3 µg/ml und 166,6 µg/ml entspricht, untersucht. Auch hier entdeckte man entsprechend den aktuell präsentierten Ergebnissen signifikante und dosisabhängige hemmende Wirkungen von VPA, beginnend mit einem kleinen aber signifikanten hemmenden Effekt nach Inkubation mit 0,25 mM (entsrechend 41,6 µg/ml) VPA und einem starken antiproliferativen Effekt nach Inkubation mit VPA in einer Konzentration von 1 mM (entsprechend 166,6 µg/ml).

Vor beinahe zehn Jahren untersuchten Knüpfer et al die Wirkung von VPA in Konzentrationen von 0,1mM und 1 mM (entsprechend 16,6 µg/ml und 166 µg/ml) auf die Proliferation von Zelllinien des Glioblastoma multiforme (T98G-Zellen, A172-Zellen, 86HG39-Zellen) und malignen Astrozytoms (85HG66-Zellen).

In Übereinstimmung mit den aktuell vorliegenden Daten wurden signifikante antiproliferative Effekte sowohl bei A172-Zellen, als auch 86HG39-Zellen und 85HG66-Zellen nach einer Inkubationszeit von vier Tagen beschrieben.
T98G-Zellen blieben hingegen unbeeinflusst (Voisard et al, 2010).
2010 berichtete die Gruppe um Mitmaker von hemmenden Effekten auf die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9, eine Kombination mit dem demethylierenden Wirkstoff 5-AZC führte zu einer Hemmung des Zellwachstums menschlicher papillärer und follikulärer Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.
Im selben Jahr untersuchten Zhao et al die Wirkung von VPA auf das Proliferationsverhalten dreier unterschiedlicher Arten von Magenkarzinom-Zellen. Die Proliferation wurde durch Apoptoseinduktion und das Auslösen eines Stopps im Zellzyklus in der G1-Phase gehemmt.

Bezüglich einer Beeinflussung des zellulären Migrationsverhaltens berichtete im Jahr 2001 die Gruppe um Knüpfer sowohl von einer stimulierenden als auch hemmenden Wirkung auf T98G-Zellen, A172-Zellen, 86HG39-Zellen und 85HG66-Zellen nach Inkubation mit VPA in den Konzentrationen 0,1 mM und 1 mM in der Boyden Kammer. Die Migration von 86HG39-Zellen wurde angeregt, während die Migration von T98G-Zellen und 85HG66-Zellen nachließ. Bei den A172-Zellen zeigte sich keinerlei Beeinflussung der Migrationstendenz.
Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist gegeben, da sowohl Knüpfer et al als auch unsere Gruppe eine Boyden Kammer für die Durchführung der Versuche verwendete. Somit entsprechen die Ergebnisse unserer Gruppe den von Knüpfer et al für die A172-Zellen veröffentlichten, wir gehen daher nicht von einer Beeinflussung des zellulären Migrationsverhaltens durch Valproat aus.

4.4 Der Effekt von Valproat auf die Vitalität

Die nach der Valproatinkubation mittels Luminometer analysierte Vitalität der einzelnen Zellreihen diente der Erfassung des Anteils gesunder Zellen. Es ergab sich hierbei mit steigender Valproatkonzentration bei allen drei Zellreihen eine Abnahme der Vitalität, am ausgeprägtesten war der Vitalitätsverlust unter Verwendung der höchsten getesteten Valproatkonzentration von 300 µg/ml. Es sind daher die signifikanten Proliferationshemmungen nach Zugabe hoher Valproatkonzentrationen

nur unter Berücksichtigung der Tatsache zu interpretieren, dass es parallel dazu stets zu einer signifikanten Vitalitätsreduktion kam. Hier ist die Gefahr der Variablenkonfundierung und damit möglichen Fehlinterpretation der Untersuchungsdaten gegeben. Es lässt sich somit für alle Zellreihen, bei denen sich signifikante Proliferationsrückgänge nach Valproatapplikation zeigten, nicht klar unterscheiden, ob die erfassten Hemmeffekte infolge einer Valproatwirkung auf vitale Zellen resultierten oder dadurch bedingt sind, dass relevante Mengen apoptotischer Zellen miterfasst wurden. Jedoch spielt eine derartige Differenzierung für die Fragestellung dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle, da lediglich dem potenziell antiproliferativen und damit antiatherosklerotischen Effekt des untersuchten Medikamentes eine tragende Bedeutung zukommt.

5. Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte den direkten in vitro-Effekt des Antiepileptikums Valproinsäure auf die Proliferation und Migration humaner koronarer Gefäßwandzellen. Hierfür wurden humane glatte Muskelzellen aus der Media (HCMSMC) und Endothelzellen aus humanen Koronarien (HCAEC), sowie aus Gründen der Vergleichbarkeit der erhobenen Daten Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren (HUVEC) verwendet.
Die erhaltenden Ergebnisse wurden mit der oben beschriebenen SI/MPL-Ratio eingeordnet, welche das Verhältnis zwischen einem signifikanten in-vitro-Effekt der untersuchten Substanz und dem maximalen Plasmaspiegel in vivo beschreibt.
Der maximale Plasmaspiegel für Valproat liegt bei 100 µg/ml.
Der Effekt von Valproat auf die reaktive Zellproliferation wurde für HUVEC; HCMSMC und HCAEC nach fünftägier Inkubation in aufsteigenden Dosierungen von VPA von 50 µg/ml bis 300 µg/ml mit dem Zellcounter erfasst. Ergänzend wurde für die einzelnen Zellreihen auch die Beeinflussung der Zellvitalität nach fünftägiger Inkubation mit Valproat in Konzentrationen von 50 µg/ml bis 300 µg/ml mittels Luminometer ermittelt.

Insgesamt stellt Valproat aufgrund seiner dosisabhängigen antiproliferativen Effekte mit SI/MPL-Ratios von 0,5 einen vielversprechenden Kandidaten für die systemische und lokale Therapie von postinterventionellen Restenoseereignissen dar. Starke antiproliferative Effekte von mehr als 50 % wurden in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation von HCMSMC mit VPA in Konzentrationen von mindestens 150 µg/ml ermittelt, dies entspricht dem 1,5-fachen des maximalen Plasmaspiegels von VPA bei systemischer Verabreichung. Vitalitätsverluste zeigten sich bei zunehmend höherer Valproatkonzentration für alle drei Zellreihen.
Bezüglich möglicher Effekte von Valproat auf das Migrationsverhalten der verwendeten Zellreihen ergab sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Wirkung.
Da starke antiproliferative Effekte von mehr als 50 % nach Inkubation von HCMSMC mit VPA ab einer Konzentration von 150 µg/ml ermittelt wurden und dies dem 1,5-fachen des maximalen Plasmaspiegels bei systemischer Verabreichung entspricht,

könnte der Testsubstanz lediglich in Form einer lokalen Hochdosisapplikation eine potenzielle Bedeutung zukommen.
In Anbetracht des in dieser Arbeit ermittelten vielversprechenden Ergebnisses sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden, ob die Herstellung Valproat-beschichteter Stents möglich ist, um sie dann im Tierversuch weiter zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde Valproat lediglich als Einzelsubstanz getestet.
Die Frage ob und in welchem Ausmaß Valproat jedoch die Fähigkeit hat, die Wirkung anderer Substanzen, deren antiproliferative Eigenschaften bekannt sind, zu unterstützen oder gar zu potenzieren, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Additive und darüber hinausgehende inhibitorische Effekte auf die Zellproliferation humaner koronarer Gefäßzellen waren bereits von unserer Gruppe nach der kombinierten Verabreichung von Sirolimus und Meycophenolat Mofetil berichtet worden.
Die Beeinflussung antiproliferativer Effekte von Zytostatika oder Immunsuppressiva durch lokal oder systemisch verabreichtes Valproat sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdul M, Hoosein N. Inhibition by anticonvulsants of prostate-specific antigen and interleukin-6 secretion by human prostate cancer cells. *Anticancer Res,* 2001; 21: 2045-2048

2. Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzel T, Hentsch B, Schwarz SE, Hövelmann S, Göttlicher M, Knuth A, Jäger E. Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Cancer,* 2007; 97: 177-182

3. Bauriedel G, Windstetter U, DeMaio SJ Jr, Kandolf R, Höfling B. Migratory activity of human smooth muscle cells cultivated from coronary and peripheral primary and restenotic lesions removed by percutaneous atherectomy. *Circulation,* 1992; 85: 554-564

4. Beecken WD, Engl T, Ogbomo H, Relja B, Cinatl J Jr, Bereiter-Hahn J, Oppermann E, Jonas D, Blaheta RA. Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression in human tumor cells. *Int Immunopharmacol,* 2005; 5: 757-769

5. Blaheta RA, Cinatl J Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev,* 2002; 22: 492-511

6. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev,* 2005; 25: 383-397

7. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J Jr. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem.* 2002;9: 1417-1433

8. Boehm M, Nabel EG: Cell cycle and cell migration: New pieces to the puzzle. *Circulation,* 2001; 103: 2879-2881

9. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov,* 2006; 5: 769-784

10. Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med,* 1962; 115: 453-466

11. Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Poli R, Bosco O, Mastrocola R, Aragno M, Boccuzzi G. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cell. *Journal of Endocrinology*, 2006; 191: 465-472

12. Catalano MG, Poli R, Pugliese M, Fortunati N, Boccuzzi G. Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocrine-Related Cancer*, 2007; 14: 839-845

13. Charron T, Nili N, Strauss BH: The cell cycle: A critical therapeutic target to prevent vascular proliferative disease. *Can J Cardiol,* 2006; 22 (Suppl B): 41B-55B

14. Chatterjee S, Pandey A. Drug eluting stents: friends or foe? A review of cellular mechanisms behind the effects of Paclitaxel and Sirolimus eluting stents. *Curr Drug Metab,* 2008; 9: 554-566

15. Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, Carrasco-Legleu C, Rangel-Lopez E, Segura-Pacheco B, Taja-Chayeb L., Trejo-Becerril C.,.Gonzalez-Fierro A., Candelaria M., Cabrera G., Duenas-Gonzalez A. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int,* 2006; 6: 1-9

16. Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y., Yung B.J.M, Lupold S.E., Rodriguez R.
Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther,* 2006; 319: 533-542

17. Cheng LS, Prasad AN, Rieder MJ. Relationship between antiepileptic drugs and biological markers affecting long-term cardiovascular function in children and adolescents. *Can J Clin Pharmacol,* 2010; 17: e5-46

18. Cinatl J Jr, Kotchetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J. Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol,* 2002; 20: 97-106

19. Costa MA, Simon DI: Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation,* 2005; 111: 2257-2273

20. Dartsch PC, Voisard R, Bauriedel G, Höfling B, Betz E. Growth characteristics and cytoskeletal organization of cultured smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions. *Arteriosclerosis,* 1990; 10: 62-75

21. Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, Gopalakrishnan V. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol,* 2007; 85: 159-170

22. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug, preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumor. *Cancer Treat Rev,* 2008; 34: 206-222

23. Fattori R, Piva T: Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet,* 2003; 361: 247-249

24. Franssen EJ, van Essen GG, Portman AT, de Jong J, Go G, Stegman CA, Uges DR. Valproic acid toxicokinetics: serial hemodialysis and hemoperfusion. *Ther drug Monit,* 1999; 21: 289-292

25. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O´brien S, Estey E, Buesco-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP. Phase I/II study of the combination of 5-aza-2´-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood,* 2006; 108: 3271-3279

26. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J,* 2001; 20: 6969-6978

27. Gruentzig AR, Senning A, Siegenthaler WE: Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med,* 1979; 301: 61-68

28. Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS: Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res,* 2004; 64: 1079-1086

29. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M: Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cellbiological and molecular aspects. *Z Kardiol,* 1995; 84: 5-21

30. Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. *Brain Res,* 2000; 857: 246-2451

31. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest,* 1973; 71: 2845-2856

32. Jones J, Bentas W, Blaheta RA, Makarevic J, Hudak L, Wedel S, Probst M, Jonas D, Juengel E. Modulation of adhesion and growth of colon and pancreatic cancer cells by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Int J Mol Med,* 2008; 22: 293-299

33. Jones J, Juengel E, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Blaheta RA. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med,* 2008; 12: 1-10

34. Jung JW, Cho SD, Ahn NS, Yang SR, Park JS, Jo EH, Hwang JW; Jung JY, Kim SH, Kang KS, Lee YS. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett,* 2005; 225: 199-206

35. Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica,* 2006; 91: 248-251

36. Klein CL, Kohler H, Bittinger F, Wagner M, Hermanns I, Grant K, Lewis JC, Kirkpatrick CJ: Comparative studies on vascular endothelium in vitro. I. Cytokine effects on the expression of ashesion molecules by human umbilical vein, saphenous vein and femoral artery endothelial cells. *Pathobiology,* 1994; 62: 199-208

37. Kleinman HK, Jacob K. Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001; 12: 12.2

38. Knüpfer MM, Pulzer F, Schindler I, Driever PH, Knüpfer H, Keller E. Different effects of valproic acid on proliferation and migration of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer Research.* 2001; 21: 347-352

39. Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med,* 2006; 38: 200-211

40. Kostrouchová M, Kostrouch Z. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol (Praha),* 2007; 53: 37-49

41. Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzel T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J,* 2003; 22: 3411-3420

42. Labinaz M, Pels K, Hoffert C, Aggarwal S, O´Brian ER. Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res,* 1999; 41: 255-266

43. Lammer E.J., Sever L.E., Oakley G.P. Jr. Teratogen update: valproic acid. *Teratology,* 1987; 35: 465-473

44. Ligthart S, Vlemmix F, Dendukuri N, Brophy JM: The cost effectiveness of drug-eluting stents: A systemic review. *CMAJ,* 2007; 176: 199-205

45. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Research*, 2005; 65: 3815-3822

46. Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current Opinion in Oncology*, 2001; 13: 477-483.

47. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J Jr.: Valproic acid as anti-cancer drug. *Curr Pharm Des,* 2007; 13: 3378-3393

48. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol,* 2004; 65: 520-527

49. Michaelis M, Suhan T, Michaelis UR, Beek K, Rothweiler F, Tausch L, Werz O, Eikel D, Zörnig M, Nau H, Fleming I, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and inhibits apoptosis in endothelial cells. *Cell Death Differ,* 2006; 13: 446-453

50. Mishkel GJ, Moore AL, Markwell S, Shelton MC, Shelton ME. Long-term outcomes after management of restenosis or thrombosis of drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol,* 2007; 49: 181-184

51. Mitmaker EJ, Griff NJ, Grogan RH, Sarkar R, Kebebew E, Duh QY, Clark OH, Shen WT. Modulation of matrix metalloproteinase activity in human thyroid cancer cell lines using demethylating agents and histone deacetylase inhibitors. *Surgery,* 2010, epub ahead of print

52. Mongan NP, Gudas LJ. Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2´- deoxycytidine, restores expression of silenced RARbeta2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Thera,* 2005; 4: 477-486

53. Munster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush R, Sullivan D, Daud A. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase 53. II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol,* 2007; 25: 1879-1885

54. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle,* 2006; 5: 1779-1787

55. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest,* 1996; 98: 2277-2283

56. Poon M, Badimon JJ, Fuster V: Overcoming restenosis with sirolimus: From alphabet soup to clinical reality. *Lancet,* 2002; 359: 619-622

57. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol,* 1992; 140: 665-663

58. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Biology and Therapy*, 2003; 2: 30-37

59. Sakajiri S, Kumagai T, Kawamata N, Saitoh T, Said JW, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol,* 2005; 33: 53-61

60. Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology,* 2006; 130: 548-565

61. Siitonen T, Koistinen P, Savolainen ER. Increase in Ara-C cytotoxicity in the presence of valproate, a histon deacetylase inhibitor, is associated with the concurrent expression of cyclin D1 and p27(Kip1) in acute myeloblastic leukemia cells. *Leuk Res,* 2005; 29: 1335-1342

62. Shen WT, Wong TS, Chung WY, Wong MG, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. Valproic acid inhibits growth, induces apoptosis, and modulates apoptosis-regulatory and differentiation gene expression in human thyroid cancer cells. *Surgery,* 2005; 138: 979-984

63. Skov S, Rieneck K, Bovin LF, Skak K, Tomra S, Michelsen BK, Odum N. Histone deacetylase inhibitors: a new class of immunosuppressors targeting a novel pathway essential for CD154 expression. *Blood,* 2003; 101: 1430-1438

64. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation,* 2001; 103: 192-195

65. Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF. Polymerase γ determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology,* 2010; 52: 1791-1796

66. Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res,* 2004; 10: 1141-1149

67. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*, 2002; 12: 1-13

68. Voisard R, Baur R, Herter T, Hombach V. Two decades of failing systemic restenosis trials: clinical relevance of positive in vitro data. *Perfusion,* 2004; 17: 186-197

69. Voisard R, Dartsch PC, Seitzer U, Hannekum A, Roth D, Kochs M, Hombach V. The in vitro effect of antineoplastic agents on proliferative activity and cytoskeletal components of plaque-derived smooth-muscle cells from human coronary arteries. *Coron Artery Dis,* 1993; 4: 935-942

70. Voisard R, Zellmann S, Müller F, Fahlisch F, von Müller L, Baur R, Braun J, Gschwendt J, Kountides M, Hombach V, Kamenz J. Sirolimus inhibits key events of restenosis in vitro/ex vivo: evaluation of the clinical relevance of the data by SI/MPL- and SI/DES-ratios. *BMC Cardiovasc Disord,* 2007; 7-15

71. Voisard R, Koschnick S, Baur R, Vogel U, Mattfeldt T, Hemmer W, Hannekum A, Höher M, Hombach V. High dose diltiazem prevents migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in various in-vitro models of human coronary restenosis. *Coron. Artery Dis*, 1997; 8: 189-201

72. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues H, Höher M, Hombach V. Corticosteroid agents inhibit proliferation of smooth muscle cells from human atherosclerotic arteries in vitro. *Int. J Cardiol,* 1994; 43: 257-267

73. Voisard R, Gecgüner L, Baur R, Herter T, Hombach V. Antiproliferative profile of sirolimus and mycophenolate mofetil: impact of the S/MPL-ratio. *Int J Cardiol*, 2005; 102: 435-442

74. Voisard R, von Eicken J, Baur R, Gschwend JE, Wenderoth U, Kleinschmidt K, Hombach V, Höher M. A human arterial organ culture model of postangioplasty restenosis: results up to 56 days after ballooning. *Atherosclerosis,* 1999; 144: 123-134

75. Voisard R, Stemberger A, Baur R, Herter T, Hähnel I, Resch A, Seliger C, Hemmer W, Hannekum A, Hombach V, Alt E. Triple-coated stents (Hirudin/Iloprost/Paclitaxel): an in vitro approach for characterizing the antiproliferative potential of each individual compund. *Int J Cardiol,* 2005; 102: 425-433

76. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues H, Höher M, Hombach V. Corticosteroid agents inhibit proliferation of smooth muscle cells from human atherosclerotic arteries in vitro. *Int J Cardiol,* 1994; 43: 257-267

77. Voisard R, Dartsch PC, Seitzer U, Hannekum A, Roth D, Kochs M, Hombach V. The in-vitro effect of antineoplastic agents on proliferative activity and cytosceletal components of plaque-derived smooth-muscle cells from human coronary arteries. *Coron Artery Dis,* 1993; 4: 935-942

78. Voisard R, Krebs R, Baur R, Hombach V. Valproic acid inhibits proliferation of human coronary vascular cells (SI/MPL-Ratio: 0,5): a novel candidate for systemic and local therapy of postinterventionel restenosis. *Coron Artery Dis.,* in Druck

79. Witt O, Monkemeyer S, Kanbach K, Pekrun A. Induction of fetal hemoblobin synthesis by valproate: modulation of MAP kinase pathways. *Am J Hematol,* 2002; 71: 45-46

80. Yagi Y, Fushida S, Harada S, Kinoshita J, Makino I, Oyama K, Tajima H, Fujita H, Takamura H, Ninomiya I, Fujimura T, Ohta T, Yashiro M, Hirakawa K. Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line. *J Exp Clin Cancer Res,* 2010; 29: 149

81. Yang H, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Kantarjian H, Carcia-Manero G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2´-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res,* 2005, 29: 739-748

82. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov,* 2006; 5: 37-50

83. Yu C, Subler M, Rahmani M, Reese E, Krystal G, Conrad D, et al. Induction of apoptosis in BCR/ABL+ cells by histone deacetylase inhibitors involves reciprocal effects on the RAF/MEK/ERK and JNK pathways. *Cancer Biol Ther,* 2003; 2: 544-551

84. Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizier valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem,* 2001; 276: 31674-31683

85. Zgouras D, Becker U, Loitsch S, Stein J. Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochem Biophys Res Commun,* 2004; 316: 693-697

86. Zhao X, Yang W, Shi C, Ma W, Liu J, Wang Y, Jiang G.
The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-832 gastric carcinoma cells.
Tumor Biol., 2010; in Druck

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Vinzenz Hombach für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in seiner Abteilung. Für die hervorragende und freundliche Betreuung möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Rainer Voisard danken, der mich in seiner menschlichen uns besonderen Art nicht nur auf dem Weg der Promotion begleitet hat, sondern mir auch in anderen Lebenslagen hilfreich aufgrund seiner Menschenkenntnis mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt Frau Regine Baur, welche nicht müde wurde mich mit ihrer zuverlässigen, souveränen, fachkundigen und hilfsbereiten Art stets aufs Neue zu motivieren und die mir stets mit konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Weiter möchte ich meiner Familie danken, die mir durch ihre finanzielle und emotionale Unterstützung die Verwirklichung meines Traums ermöglichte.

Ebenfalls verdienen Dank all meine wertvollen Freunde, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen. Gemeinsam haben wir durch Zusammenhalt und Gemeinschaft unser Ziel erreicht.

Zuletzt möchte ich mich bei Christoph Riepl bedanken, ohne dessen Rückhalt und bedingungslose Liebe mir nichts gelingen könnte.
Ihm möchte ich diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Name:	Ricarda Krebs
Geburtsdatum:	05.04.1984
Geburtsort:	Kempten (Allgäu)
Wohnort:	Ensingerstraße 11 89073 Ulm Tel.-Nr.: 0731-7188666 Mobil: 0152-02074524 Email ricarda.krebs@uniklinik-ulm.de
Eltern:	Karl Krebs, Bankkaufmann/Prokurist Claudia Krebs, Redaktionsassistentin
Geschwister:	Rebecca Krebs, Biotechnologische Assistentin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	1990-1994 Grundschule Durach 1994-2003 Carl-von-Linde Gymnasium, Kempten 2003 Allgemeine Hochschulreife
Studium:	Ab WS 2003 Studium der Humanmedizin/Universität Ulm

Famulaturen:

14.08.-17.09.2006 Orthopädie,
Rehabilitationskrankenhaus Ulm
19.02.-18.03.2007 HNO,
Praxis Dr. med. K. Rosskopf, Kempten
19.03.-15.04.2007 Herzchirurgie, Universitätsklinikum Ulm
01.08.-31.08.2007 Dt. Zentrum für Luft- und Raumfahrt, Köln

Autorenschaft:

„Erste Hilfe“ (Lehrbuch für Studenten)
Tammer/Schatz, Springer Verlag 2007

Praktisches Jahr:

25.08.-14.12.2008 Tertial Chirurgie
15.12.-05.04.2009: Tertial HNO
06.04.-26.07.09: Tertial Innere Medizin

Staatsexamen:	schriftlicher Teil 13./14./15.10.09 Mündlicher Teil: 02./03.09 Note Ärztliche Prüfung insgesamt: 1,66
Seit 01/2010	beschäftigt als Assistenzärztin in der Universitätsklinik Ulm Abteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde