Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik der Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

Der Effekt von Abciximab auf Proliferation, Migration und ICAM-1 Expression in humanen koronaren Gefäßwandzellen

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Mustafa Alan
Ulm

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1.Berichterstatter: PD Dr. Voisard

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Gress

Tag der Promotion: 27.04.2006

meinen Eltern,
meinen 3 Geschwistern
und meiner Verlobten
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis…….. 1

A. Einleitung..... 3
B. Material……..... 7
1. Zellkultur……..... 7
2. Durchflusszytometrie…… 10
3. Migrationtest……. 11
4. Prolifertationmessungen……... 12
5. Zellvitalitätstest……..... 13
6. Statistik……..... 13
C. Methoden……. 14
1. Routinekultivierung…….. 14
2. Durchflusszytometrie……..... 15
2.1 Versuchsansätze…… 15
2.2. ICAM-1-Färbung für die Durchflusszytometrie……..... 16
2.3 Versuchsauswertungen……..... 16
3. Migrationtest……..... 17
3.1. Zellaussaat……..... 17
3.2. Migrationsschnitt (Cut-Technik)……..... 17
3.3. Auswertung des Migrationstests……... 18
4. Prolifertionsmessungen…….. 19
4.1. Zellaussaat……..... 19
4.2. Medikamentenzugabe……..... 20
4.3. Auswertung der Proliferationstests…… 20
5. Vitalitätstest……..... 21
5.1. Zellaussaat……..... 21
5.2. Messung der Zellvitalität……..... 21
5.3. Auswertung des Zellvitalitätstests……..... 22
6. Statistik……..……...22
D. Ergebnisse……..... 23
1. Effekte von Abciximab auf die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression……... 23
1.1. HCMSMC……... 23

1.2. HUVEC…….. 28
1.3. HCAEC……. 33
1.4. TNF-α induzierte ICAM-1-Expression der HCMSMC, HUVEC und HCAEC nach Inkubation mit Abciximab im Vergleich……..... 38
2. Migration……..... 41
2.1. Effekte von Abciximab auf die Migration der HCMSMC……..... 41
3. Effekte von Abciximab auf die Proliferation……..... 44
3.1. HCMSMC……. 44
3.2. HUVEC……. 46
3.3. HCAEC……. 48
3.4. Proliferation der HCMSMC, HUVEC und HCAEC nach Inkubation mit Abciximab im Vergleich……..... 50
4. Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Abciximab……..... 52
4.1. HCMSMC……..... 52
4.2. HUVEC……. 53
4.3. HCAEC……..... 55
4.4. Vitalität der HCMSMC, HUVEC und HCAEC im Vergleich……..... 57
E. Diskussion…….. 58
1. Effekt von Abciximab bei der Restenoseentstehung…….. 58
2. Grundlagen über Abciximab……... 59
3. Effekt von Abciximab auf die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression von HCMSMC, HUVEC und HCAEC……..... 60
4. Effekt von Abciximab auf die Migration von HCMSMC……..... 60
5. Effekt von Abciximab auf die Proliferation von HCMSMC, HUVEC und HCAEC..... 61
6. Effekt von Abciximab auf die Vitalität von HCMSMC, HUVEC und HCAEC..... 62
7. Bedeutung von Abciximab bei der Verhinderung von Restenosen……..... 62
F. Zusammenfassung..... 63
G. Literaturverzeichnis……. 65
H. Danksagung……..... 73
I. Lebenslauf……..... 74

Abkürzungsverzeichnis

AM-D	Actinomycin-D
ADP	Adenosindiphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
DES	drug-eluting stent
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBM	Endothel cell Basal Medium
EGM	Endothel cell Growth Medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FITC	Fluoreszinisothiocyanat
GP IIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa
FCS	fetal Calf Serum
HCAEC	human coronary arteries endothelial cells
HCMSMC	human coronary media smooth muscle cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1 (CD 54)
IgG1	Immunglobulin G1
K	Kontrolle
kD	Kilo Dalton
n.s.	nicht signifikant
NF-κB	nuclear factor-kappa B
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PDGF	platelet-derived growth factor
PBS^{+}	Phosphat Buffered Saline with Calcium and Magnesium
PBS^{-}	Phosphat Buffered Saline Dulbecco`s without Calcium and Magnesium
PTCA	Percutane transluminale koronare Angioplastie
RLU	Relative light units
SI/MPL	significant inhibitory effects in vitro/maximal plasma levels in vivo
SmBM	Smooth muscle cell Basal Medium
SmGM	Smooth muscle cell Growth Medium
SMC	smooth muscle cell
sd_{n-1}	Standardabweichung
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha

TNS	Trypsin-Neutralizing-Solution
TVR	target vessel revascularization
V	Migrationsgeschwindigkeit
VCAM-1	vascular adhesion molecule-1
vWF	von Willebrand-Faktor
X_m	Mittelwert

A. Einleitung

Beschichtete Stents (DES = drug-eluting stents) werden mit großem Erfolg zur Verhinderung der Restenosen eingesetzt (36). In einer Studie von Biondi-Zoccai et al. (3) wurden 17 Studien hinsichtlich Restenose- Raten nach Behandlung mit verschiedenen Stents verglichen. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen mit denen die Restenose-Rate gesenkt werden konnte Es gibt jedoch trotz der großen Erfolge noch offene Fragen, die Restenose- Rate ist nicht gleich Null. Ein weiteres großes Problem stellt die hohen Kosten beschichteter Stents dar, v.a. bei koronaren Mehrgefäßerkrankungen. Aus diesem Grund werden solche beschichteten Stents in Zukunft eher nicht routinemäßig bei Koronarangioplastien eingesetzt werden. Deshalb ist die Entwicklung einer systemischen Therapie zur Behandlung von Restenosen unverändert seit Jahren Thema vieler Forschungsarbeiten. Die Eignung von verschiedenen Substanzen für einen lokalen oder systemischen Einsatz muss in experimentellen (38) und in vitro Modellen (47, 48, 49) geprüft werden. Von entscheidender Bedeutung sind die Substanz-Konzentrationen, mit der eine Inhibition erreicht werden kann. Um die signifikanten inhibitorischen Effekte in vitro (significant inhibition: SI) im Vergleich zu den maximalen Plasmaspiegeln in vivo (maximal plasma level: MPL) am besten zu charakterisieren, wird die SI/MPL-Ratio berechnet. Substanzen deren SI/MPL- Ratio unter 1 liegt, kommen theoretisch für eine systemische und lokale Applikation in Frage (50).

1. Grundlagen der Restenoseentstehung

Restenosen sind charakterisiert durch eine Art lokale Entzündungsreaktion, die mit einer Intima-Hyperplasie einhergeht. Durch Endothelläsion bzw. Störung der Endothelfunktion folgt initial eine Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration (Entzündungsreaktion). Es bildet sich zunächst eine thrombotische Schicht aus Thrombozyten und Fibrin, in die sich zusätzlich Leukozyten einlagern (37). Durch Adhäsionsmoleküle werden Zell-zu-Zell-Kontakte vermittelt (12). Über die Aktivierung von verschiedenen Zytokinen, wie z.B. tumor necrosis factor-α (TNF-α), und Wachstumsfaktoren, wie z.B. platelet-derived growth factor (PDGF) wird die Migration und Proliferation von Leukozyten und glatten Muskelzellen (SMC) und die Produktion von extrazellulärer Matrix gefördert.(14,18,55). Eine wichtige Rolle spielt dabei auch der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B (NF-κB), der durch diese Kaskade aktiviert wird und die Transkription verschiedener für die Entzündungsreaktion wichtiger

Gene reguliert (6). Durch Gefäßwandverletzungen ist Migration (2) und Proliferation (13) an humanen koronaren glatten Muskelzellen signifikant erhöht.

In den letzten Jahren gab es verstärkt Bemühungen, die Rolle des Glucoproteinkomplexes (GP) IIb/IIIa in der thrombozyten-vermittelten Thrombusbildung zu verstehen.

Bei einer Endothelläsion kommen prothombotische subendotheliale Gefäßbestandteile wie z.B. Kollagen mit dem Blut in Kontakt. Es kommt zur Thrombozytenadhäsion. Zahlreiche endogene Mediatoren (z.B. Thrombin, Adenosindiphosphat oder ADP und Kollagen) setzen eine Aktivierungskaskade in Gang. Aktivierte und degranulieren Thrombozyten haften aneinander (Thrombozytenaggregation) und bilden einen okkludierenden Thrombus an der Endothelläsion. Der Plättchenrezeptor an den die Liganden Fibrinogen und von Willebrand-Faktor (vWF) binden, ist der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor (34).

2. Testsubstanz Abciximab

Die Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten binden an den GP IIb/IIIa-Rezeptor, verhindern die Bindung von Fibrinogen und hemmen damit unabhängig vom Aktivierungsreiz die Thrombozytenaggregation. Die GP IIb/IIIa Rezeptor Antagonisten vertreten eine Familie der Plättchen-Medikamte, die klinisch zur Verhinderung der pathologischen Thrombose (26) eingesetzt werden. Abciximab, ein Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonist, ist ein genetisch hergestelltes Fab Fragment eines monoklonalen Antikörpers und war das erste genehmigte Medikament in dieser Reihe (11). Die bisherigen GP IIb/IIIa-Antagonisten werden intravenös mit initialem Bolus und anschließender Dauerinfusion verabreicht. Zwei mögliche Mechanismusänsätze schließen anti-entzündliche Effekte mit ICAM-1 auf Leukozyten (32) und antiproliferative Effekte der VCAM-1 Rezeptoren auf Thrombozyten und glatten Muskelzellen (45) ein. Abciximab wird seit Jahren in Kombination mit Heparin und Aspirin bei komplizierten perkutanen Koronarinterventionen (PTCA), Stentimplantation und Atherektomie bei Hochrisiko-Patienten zur Vermeidung ischämischer Komplikationen, sowie bei instabilen Angina pectoris, non-Q-wave-Infarkten verabreicht. Eine günstige Wirkung auf die Restenose wäre von großem Interesse. Diese Wirkung ist umso interessanter, da der positive Effekt von Abciximab bei komplexen Interventionen neuerdings bezweifelt wird (21). Eine neue Indikation von Abciximab als Anti-Restenose Medikament aufgrund signifikanter Reduktion der Restenoserate, wie in den ISAR-SWEET- (30) und CADILLAC-Studien (44) beschrieben, wäre folglich von großem Interesse. Kereiakes zeigte vor kurzem, dass Gefäßwandentzündungen eine entscheidende Rolle im Bereich der Restenose spielen

und folglich die pharmakologische Intervention mit Abciximab (22) das „maßgebliche therapeutische Ziel“ darstellen könnte.

3. Thematik der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit (52-54) wurde der Effekt von Abciximab auf Expression der interzellulären Adhäsionsmoleküle-1 (ICAM-1), die Migration und die Proliferation von humanen koronaren Gefäßzellen untersucht.

In einer anderen Studie unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass die ICAM-1-Expression in humanen koronaren Endothelzellen und glatten Muskelzellen in hohem Maße durch TNF- α reguliert wird (48). Folglich ist die Hemmung von ICAM-1-Expression ein Ansatzpunkt um die Restenose (35) zu verhindern. ICAM-1 ist ein stark glykosyliertes Protein der Zelloberfläche mit 95kD, das in unterschiedlichem Maße auf Endothelzellen, auf glatten Muskelzellen und auf zirkulierenden Leukozyten gebildet wird (41). In entzündlichen Geweben ermöglicht dieses Adhäsionsmolekül die Zellmigration im Blut zirkulierenden Monozyten und stellt damit einen Entzündungsmediator bei der Restenoseentstehung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der ICAM-1-Expression durch Abciximab an HCMSMC, HUVEC und HCAEC nach Stimulation mit TNF-α untersucht. Dazu wurden die Zellen 12 Stunden vor TNF-α-Stimulation (20 ng/ml über 6 Stunden) mit Abciximab (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 µg/ml) inkubiert. Die ICAM-1-Expression wurde im Durchflusszytometer gemessen.

Die Restenose ist durch Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, sowie durch die Produktion von extrazellulärer Matrix charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Gefäßwandverletzungen in hohem Maße die Migration (2) und die Proliferation (13) von glatten Muskelzellen erhöhen.

Deshalb wurde der Einfluss von Abciximab auch bezüglich der Migration und Proliferation an HCMSMC untersucht. Die Migration wurde in einer Modifikation der Methode von Bürk (7) durchgeführt. Nach Durchführung des Schnittes (Cut) wurden durch Zugabe von Abciximab (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 µg/ml) die Zellen nach 48h angefärbt und die Migration ausgewertet.

Der Einfluss von Abciximab auf die Proliferation wurde bei koronaren Endothelzellen und glatten Muskelzellen untersucht. Auch hier wurde Abciximab in den Konzentrationen (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 µg/ml) verabreicht. Die Proliferation wurde mit einem Zellcounter gemessen.

Um über die Wirkung von Abciximab (0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 µg/ml) bezüglich der Vitalität Aussagen treffen zu können, haben wir alle drei Zellarten (HCMSMC, HUVEC und HCAEC) mit Hilfe des CellTiter-Glo^{TM}- Test am Luminometer untersucht.

B. Material

1. Zellkultur

1.1. Zellen

Es wurden 3 verschiedene Zellarten, jeweils mit Passagen < 8 verwendet:

humane glatte Muskelzellen aus der Media koronarer Arterien (HCMSMC)

humane Endothelzellen aus umbilikalen (Nabelschnur-) Venen (HUVEC)

humane Endothelzellen aus koronaren Arterien (HCAEC)

1.1.1. Humane koronare glatte Muskelzellen aus der Media (HCMSMC)

Die HCMSMC wurden von der Firma Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers (Belgien) erworben.

1.1.2. Humane umbilikale venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC)

Die HUVEC wurden aus umbilikalen Venen isoliert und kultiviert, die uns freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik der Universität Ulm (Prof. Dr. R. Kreienberg) zur Verfügung gestellt worden sind.

1.1.3. Humane koronare arterielle Endothelzellen (HCAEC)

Die HCAEC wurden von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers (Belgien) kommerziell erworben.

1.2. Kulturmedien

1.2.1. Kulturmedium für glatte Muskelzellen

Für die HCMSMC wurde als Kulturmedium Smooth muscle cell Growth Medium (SmGM) verwendet:

- Smooth muscle cell Basal Medium (SmBM) (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

Folgende Substanzen wurden zugegeben:

- 5 µg/ml Insulin
- 2 ng/ml Fibroblast growth factor
- 0,5 ng/ml Epidermal growth factor
- 5 % Fetal calf serum (fcs)
- 50 µg/ml Gentamycin

- 50 ng/ml Amphotericin

(alle Substanzen von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

1.2.2. Kulturmedium für Endothelzellen

Für die HUVEC und HCAEC wurde als Kulturmedium Endothel cell Growth Medium (EGM) verwendet:

- Endothel cell Basal Medium (EBM) (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

Folgende Substanzen wurden zugegeben:

- 12 µg/ml Bovine brain extract
- 10 ng/ml Epidermal growth factor
- 5 % Fetal calf serum
- 1 µg/ml Hydrocortisone
- 50 µg/ml Gentamycin
- 50 ng/ml Amphotericin

(alle Substanzen von Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

1.3. Temperatur, Begasung, pH-Wert

Die Zellkulturen wurden im Begasungsinkubator (HERAcell, Heraeus, Kendro, Hanau) bei 37°C in einer wasserdamfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Durch den CO_2-Partialdruck wurde das CO_2/HCO_3^--Puffersystem auf einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 eingestellt und konstant gehalten.

1.4. Pufferlösung

Bei der Kollagenbeschichtung der Kulturschalen und zum Spülen des Zellrasens von dem Abtrypsinieren wurde folgende Pufferlösung verwendet:

- Phosphate Buffered Saline Dulbecco´s without Calcium and Magnesium (PBS^-) (PAA Laboatories, Linz, Österreich)

1.5. Enzymlösung

- Trypsin/EDTA-Solution (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien) diente zum Ablösen der Zellen von ihrer Unterlage.

1.6. Trypsin-Neutralisationslösung

- Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS) (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien), zur Neutralisierung der Trypsin/EDTA-Solution

1.7. Adhäsionsfaktoren

Zur Kollagenbeschichtung der Kulturgefäße für Endothelzellen wurde folgendes verwendet:

- Kollagen Typ I from rat tail (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),1 mg davon gelöst in 1 ml 0.1M Essigsäure (Merck, Darmstadt) und mit 0,2 µm-Filter (VWR, Darmstadt) steril filtriert.

1.8. Zentrifugenröhrchen

- PS-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)

1.9. Kulturgefäße

Für die Routinekultur wurde verwendet:

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

1.10. 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)
- **Pumpen:** 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. Durchflusszytometrie

2.1. Testsubstanz

- Abciximab (ReoPro) (Lilly, Bad Homburg) verdünnt mit destilliertem Aqua, steril; Stammlösung: 2 mg/ml

2.2. Pufferlösung

Die Pufferlösung bei der Durchflusszytometrie bestand aus 500 ml PBS⁻ (Phosphat Buffered Saline Dulbecco´s without Calcium and Magnesium; PAA Laboatories, Linz, Österreich) und 10 ml fcs (fetal calf serum, Chargen-Nr. 40G6721K; Gibco Invitrogem GmbH, Karlsruhe).

2.3. Zytokine

Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), zur Stimulation der Zellen zur ICAM-1-Expression; Stammlösung: 10 µg/ml. Endkonzentration: 20 ng/ml.

2.4. Antikörper

Monoklonaler Antikörper gegen interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-1,CD54): Anti-ICAM-1-Fluoreszinisothiocyanat(FITC)-konjugiert (Immunotech/ Dianova, Hamburg); Verdünnung 1:20 in Puffer.

2.5. Kontrollsubstanzen

Actinomycin-D (AM-D) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen);
Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen);
Stammlösung: 1 mg/ml.

2.6. Isotypenkontrolle

Monoklonaler Antikörper aus der Maus unterschiedlicher Isotypen und gegen Aspergillus niger Glucoseoxidase gerichtet:

- Maus-Immunglobulin1 (Maus-IgG1)-FITC-konjugiert (Immunotech/Dianova, Hamburg); Verdünnung 1:20 in Puffer

2.7. Kulturgefäße

- 6-Lochschale: Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 9,6 cm^2 Wachstumsfläche pro Vertiefung.

2.8. Reaktionsgefäße

Zur Verdünnung der Medikamente und zum Inkubieren der Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden folgende Reaktionsgefäße verwendet:

- Eppendorf-Cups, Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

2.9. Messgefäße

- 5 ml Röhrchen Falcon-2054 (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.10. Geräte

- **Eppendorf-Zentrifuge:** Biofuge pico (Heraeus, Kendro, Hanau),
- **Kühlzentrifuge:** Varifuge 3.0 R (Heraeus, Kendro, Hanau),
- **Durchflusszytometer:** BD FACS Calibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) mit Macintosh-Systemsoftware Mac OS 9.2.1. und dem Programm Cell Quest Pro. Die Histogramme wurden mit dem Programm WinMDI Version 2.7. erstellt.

3. Migrationtest

3.1. Testsubstanz

- Abciximab (ReoPro) (Lilly, Bad Homburg) verdünnt mit destilliertem Aqua, steril; Stammlösung: 2 mg/ml

3.2. Ruhekulturmedium für glatte Muskelzellen

1% Fetal calf serum (fcs) (serumarmes 1%iges Smooth muscle cell Basal Medium) (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

- ohne Insulin
- ohne Fibroblast growth factor
- ohne Epidermal growth factor
- 50 µg/ml Gentamycin
- 50 ng/ml Amphotericin

3.3. Pufferlösung

- Phosphate Buffered Saline Dulbecco´s with Calcium and Magnesium (PBS^{+}) (Bio Whittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien)

3.4. Anfärbung und Fixation

- Hämalaun (Chroma Gesellschaft Köngen)
- Formalin (Fischar GmbH Saarbrücken)

3.5. Kulturgefäße

- 6-Lochschale: Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 9,6 cm^2 Wachstumsfläche pro Vertiefung.

3.6. Reaktionsgefäße

Zur Verdünnung der Medikamente und zum Inkubieren der Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden folgende Reaktionsgefäße verwendet:

- Eppendorf-Cups, Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

3.7. Migrationsbesteck

- Wattestäbchen (Universitätsapotheke Ulm)
- Cut-Messer (Rasierklinge mit Halterung)
  Für unsere Migrationsversuche verwendeten wir speziell angefertigte Cut-Messer aus nicht rostendem Stahl, welche in der Werkstatt der Universität Ulm gefertigt wurden. Die Klingenlänge entsprach dem Durchmesser der Kulturgefäße von 9,6 cm^2. Die Cut-Messer wurden vor gebrauch sterilisiert.

3.8. Kamera

Die Photographische Dokumentation der Migrationstrecke der HCMSMC erfolgte mit der Nikon COOLPIX 990 (Düsseldorf)

4. Prolifertationmessungen

4.1. Testsubstanz

- Abciximab (ReoPro) (Lilly, Bad Homburg) verdünnt mit destilliertem Aqua, steril; Stammlösung: 2 mg/ml

4.2. Reagenzien

- 0,9 % steriles NaCl (B.Braun, Melsungen AG)
- Aqua für Infusionszwecke (GSK, München)

4.3. Kulturgefäße

- 6-Lochschale: Falcon-3046 (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 9,6 cm Wachstumsfläche pro Vertiefung.

4.4. Messgefäße

- Zellcountermessgefäße 22 x 65 PPN (Schärfe, Reutlingen)

4.5. Reaktionsgefäße

Zur Verdünnung der Medikamente wurden verwendet:

- Eppendorf-Cups, Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

4.6. Geräte

- **Zellcounter:** Vor jeder Zellaussaat und zur Bestimmung der Proliferation wurden mit dem Zellcounter CASY TTC. (Schärfe, Reutlingen) die Zellzahl bestimmt.
- **Dyspenser** (VWR, Darmstadt)

5. Zellvitalitätstest

5.1. 96-Loch Schale

weiße 96-Lochschalen (steril) (Nalge Nunc International, VWR International, Darmstadt)

5.2. CellTiter-Glo™ Luminescent Zellvitalitätstest

(Promega GmbH, Mannheim)

5.3. Geräte

5.3.1. Luminator

Centro LB 960 Berthold Technologies, Bad Wildbad

Programm MicroWin 2000

5.3.2. Magnetschüttler

Variomag (H+P Labortechnik, VWR Darmstadt)

6. Statistik

- Statistikprogramm SigmaStat Version 2.0
  paired-t-test

C. Methoden

4. Routinekultivierung

4.1. Glatte Muskelzellen

Die HCMSMC (B 1.1.1) wurden mit 10 ml Kulturmedium in Kulturschalen mit 75cm² Wachstumsfläche kultiviert.
Nach Konfluenz wurden die Kulturen zweimal mit 5 ml PBS⁻ (B 1.4) gespült und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA-Solution (B 1.5) von der Unterlage gelöst und vereinzelt. Danach wurde die Zellsuspension mit 5 ml Trypsin-Neutralizing-Solution (B 1.6) neutralisiert. Von der Zellsuspension wurden dann 100 µl entnommen und durch Zugabe von 9,9 ml NaCl-Lösung auf 10 ml ergänzt, um am Zellcounter (B 4.6) die Zellzahl zu bestimmen. Anschließend wurde die Zellsuspension fünf Minuten lang bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun konnte man die Zellen mit einer Dichte von $5x10^3$ Zellen/cm² Wachstumsfläche in 6-Lochschalen für Versuche oder Kulturschalen passagieren. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

1.2. Endothelzellen

1.2.1. Kollagenbeschichtung der Kulturschalen

Für die HUVEC (B 1.1.2) und HCAEC (B 1.1.3) wurden die Kulturschalen vor der Aussaat mit Rattenkollagen Typ I (B 1.7) beschichtet. Für die HUVEC wurden in einer Kulturschale 100 µl Kollagenlösung in 5 ml PBS⁻ verdünnt, in 6-Lochschalen 20 µl in 1 ml. Für die HCAEC wurde jeweils die doppelte Menge Kollagen verwendet, d.h. 200 µl in 5 ml PBS⁻ in Kulturschalen bzw. 40 µl in 1 ml in 6-Lochschalen. Die Schalen wurden bei 37°C über 30 min. inkubiert.

1.2.2. Kultivierung

Nach der Kollagenbeschichtung wurde bei der Routinekultivierung der Endothelzellen wie bei den glatten Muskelzellen verfahren.

5. Durchflusszytometrie

5.1. Versuchsansätze

Am 5. Tag nach der Aussaat von HCMSMC, HUVEC oder HCAEC wurde folgender Versuch in 6-Loch Schalen durchgeführt. Eine Übersicht über den Versuchsablauf zeigt Tab.1.

Tab.1: Versuchsprotokoll: Zugegeben wurde zuerst Abciximab bzw. Actinomycin-D (AM-D), 12 Stunden später tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) und 6 Stunden später mit Anti-ICAM-1-FITC bzw. IgG1-FITC angefärbt.

Versuchsansätze	Abciximab	TNF-α	Antikörper
1 Eigenfluoreszenz	---	---	---
2 nicht- stimuliert	---	---	Anti-ICAM-1-FITC
3	---	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
4	18 h 20 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
5	18 h 2 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
6	18 h 0,2 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
7	18 h 0,02 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
8	18 h 0,002 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
9	18 h 0,0002 µg/ml Abciximab	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC
10 Kontrolle	---	6 h 20 ng/ml	IgG1-FITC
11 Kontrolle	---	---	IgG1-FITC
12 Kontrolle	18 h 1 µg/ml AM-D	6 h 20 ng/ml	Anti-ICAM-1-FITC

In den 6-Loch Schalen (B 2.7) wurden Zellen ausgesät. Für die Endothelzellen wurden die Schalen zuvor mit Kollagen Typ I beschichtet.

Zunächst wurden Zellen mitgeführt, um jeweils die Eigenfluoreszenz der Zellen (ohne Antikörper) (1), sowie die ICAM-1-Expression ohne vorherige Stimulation zu bestimmen (2). Um die ICAM-1-Expression nach TNF-α - Stimulation bestimmen zu können, wurden Zellen nur mit TNF-α und später mit Anti-ICAM-1-FITC inkubiert(3). Zu weiteren Zellen wurden 6 verschiedene Konzentrationen an Abciximab (B 2.1) zugegeben: 20 µg/ml (4), 2 µg/ml (5), 0,2 µg/ml (6), 0,02 µg/ml (7), 0,002 µg/ml (8) und 0,0002 µg/ml (9), jeweilsüber 18 Stunden inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde mit 1 µg /ml AM-D (12) behandelt.12 Stunden später wurden diese Zellen mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert und weitere 6 Stunden inkubiert, bevor im letzten Schritt die Antikörper hinzugegeben wurden. Als Kontrollen dienten Zellen mit (10) und ohne (11) TNF-α- Stimulation, die später mit IgG1-FITC versetzt wurden.

2.2. ICAM-1-Färbung für die Durchflusszytometrie

Die in den 6-Lochschalen nun vorbehandelten Zellen wurden zweimal mit 2 ml PBS^- gespült. Anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Solution vereinzelt, auf 10 ml mit Pufferlösung aufgefüllt und 5 min. bei 1200 U/min. und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Puffer aufgenommen, in Eppendorf-Cups überführt und 2 min. bei 4000 U/min erneut zentrifugiert. Der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet 20 min. mit 100 µl FITC- konjugierten Anti-ICAM-1-Antikörpern (B 2.4) versetzt. Die Negativkontrolle mit 100 µg/ml FITC- konjugierten IgG1-Antikörpern (B 2.6) einmal mit (10) und ohne TNF-α-Stimulation (11) und einer Probe nur mit 100 µl Puffer ohne TNF-α-Stimulation (1) zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz wurden mitgeführt. Danach wurde mit Puffer auf 1 ml aufgefüllt und nochmals 2 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt, das Pellet in 500 µl Puffer gelöst und in Messgefäße (B 2.9) überführt.

2.3 Versuchsauswertungen

2.3.1. ICAM-1-Fluoreszenzintensität

Die ICAM-1-Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellen wurde mit dem FACS-Calibur-Durchflusszytometer analysiert. Es wurden jeweils ca. 10000 Zellen gemessen und mit dem Programm Cell Quest Pro ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse in Histogrammen und die Bestimmung der Meanwerte wurde mit dem Programm WinMDI 2.7 (B 2.10)

durchgeführt. Die Histogramme zeigen die Verteilung der Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität: über der Abszisse wurde die Fluoreszenzintensität logarithmisch und über der Ordinate die Anzahl der Zellen linear aufgetragen.
Für jede Zellart wurde der Versuch dreimal durchgeführt. Aus den erhaltenen Meanwerten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Dann wurde der Meanwert der maximal mit 20 ng/ml TNF-α stimulierten Zellen gleich 100 % gesetzt und die Meanwerte der mit Abciximab vorbehandelten Zellen in Prozent von diesem angegeben. Mit dem Programm SigmaStat 2.0 (B 6) wurde die statische Signifikanz der erhaltenen Versuchsergebnisse in einem paired-t-test berechnet.

6. Migrationtest

3.1. Zellaussaat

Für die Migrationstests wurde humane glatte Muskelzelle der Media (HCMSMC) verwendet. In 6-Lochschalen wurden 2000-3000 Zellen/cm² ausgesät. Nach dem vollständigen Absetzen und ausbreiten der Zellen erfolgte während der gesamten Kultivierungszeit bis zum Erreichen der Konfluenz in 2-3 tägigem Abstand ein Mediumwechsel.
Für die Durchführung des Migrationstests wurden die Zellkulturen nach erreichen der Konfluenz für 48 Stunden mit Ruhekulturmedium (1% fcs; serumarmes Medium (B 3.2)) inkubiert. Dann wurde der Zellrasen in einer Modifikation der Methode von Bürk mit Hilfe einer sterilen Klinge verletzt und somit ein zellfreier Raum geschaffen (s.u. C 3.2).

3.2. Migrationsschnitt (Cut-Technik)

Zur Durchführung des Migrationsschnitts wurden am Schalenboden konfluenter Kulturschalen pro Loch durch das Cut-Messer (B 3.7) je 2 Cuts gesetzt. Anschließend wurde mit einem sterilen Wattestäbchen (B 3.7) der Zellrasen entlang des Cut-Messers abgestreift und somit ein zellfreier Raum geschaffen. Sofort nach Schnitt wurden die Kulturschalen mit PBS^- gespült und Ruhekulturmedium (1% fcs) zugegeben. Daraufhin wurde Abciximab in den folgenden Konzentrationen 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 µg/ml zugesetzt: Die Kulturen wurden für weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

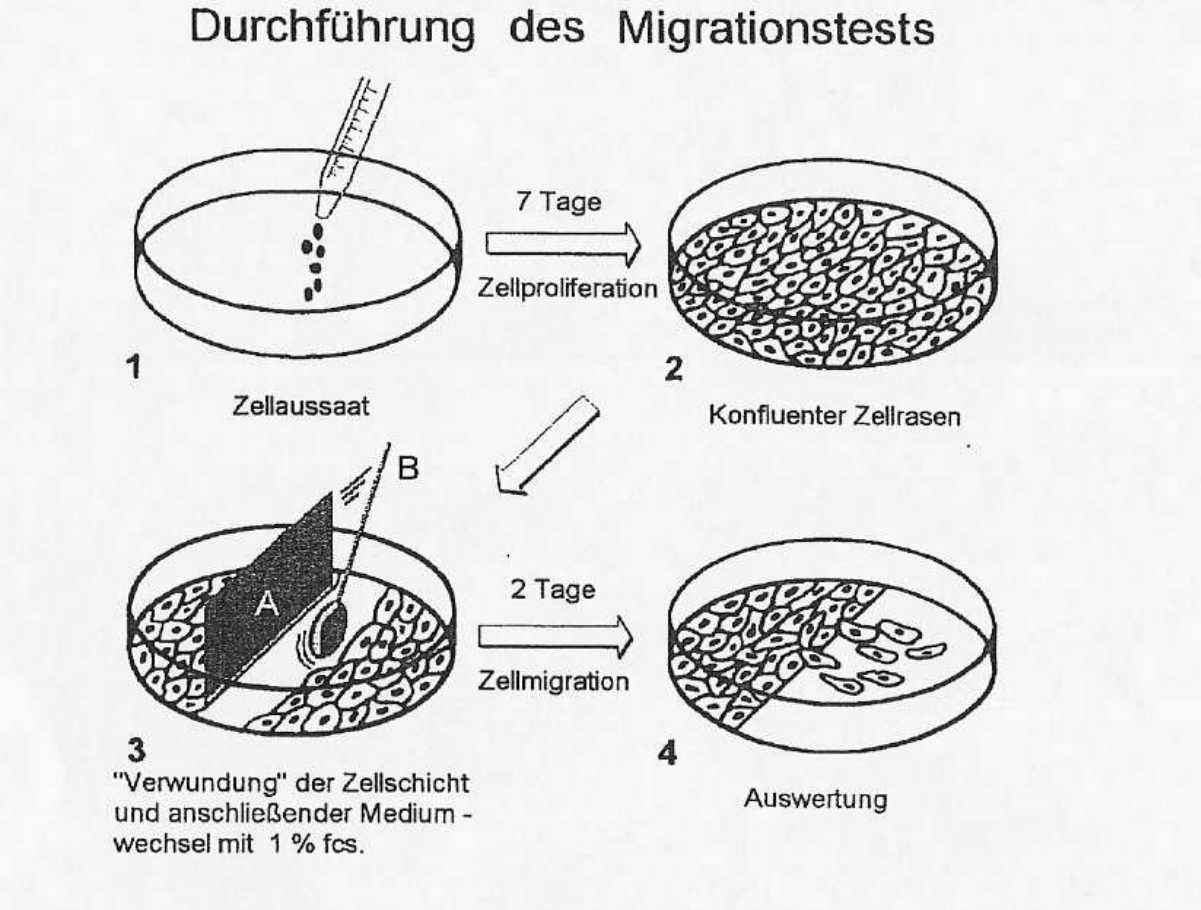


Abb.1: Schematischer Überblick über die Durchführung des Migrationstests (7), A = sterile Klinge; B = steriles Wattestäbchen (16, S.24).

3.3. Auswertung des Migrationstests

48 Stunden nach Migrationsschnitt wurde Ruhekulturmedium abgesaugt und mit 2 ml PBS^{+} gespült. Die Fixation wurde durch Zugabe von 2 ml 3-4%igem Formalin und 2 stündigem Stehen lassen unter Abzug gewährleistet. Nach 20-minütiger Hämalaunfärbung wurden pro Loch 6 Fotos mit der Nikon COOLPIX 990 (B 3.8) fotografiert. Zur Auswertung des Migrationstests wurden die Migrationstrecke (% zur Kontrolle): Messung vom Wundrand bis zur vordersten Zellfront in mm, sowie die Migrationsgeschwindigkeit (V) bestimmt. Für die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit wurde die von der vordersten Zellfront zurückgelegte Strecke auf die Zeit seit Beginn der Migration bezogen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Signifikanz in einem paired-t-test errechnet.

5. PROLIFERATIONSMESSUNGEN

5.1. Zellaussaat

In der Versuchsvorbereitung wurden die HCMSMC, HUVEC bzw. die HCAEC vor der Konfluenz wie bei der Routinekultivierung abtrypsiniert, zentrifugiert und ihre Gesamtzahl im Zellcounter bestimmt. Danach wurden die Zellen in alle sechs Vertiefungen der 6-Loch-Kulturschale (10 cm^2/Vertiefung) (B 4.3) ausgesät, dass in jeder Vertiefung 50.000 HCMSMC (3-5 x 10^3 Zellen/cm^2) in 2 ml Kulturmedium sind. Die Schalen für Endothelzellen wurden vorher beschichtet. Für jede unterschiedliche Medikamentenkonzentration wurden drei Vertiefungen benutzt. Ein Überblick zeigt Abb.2.

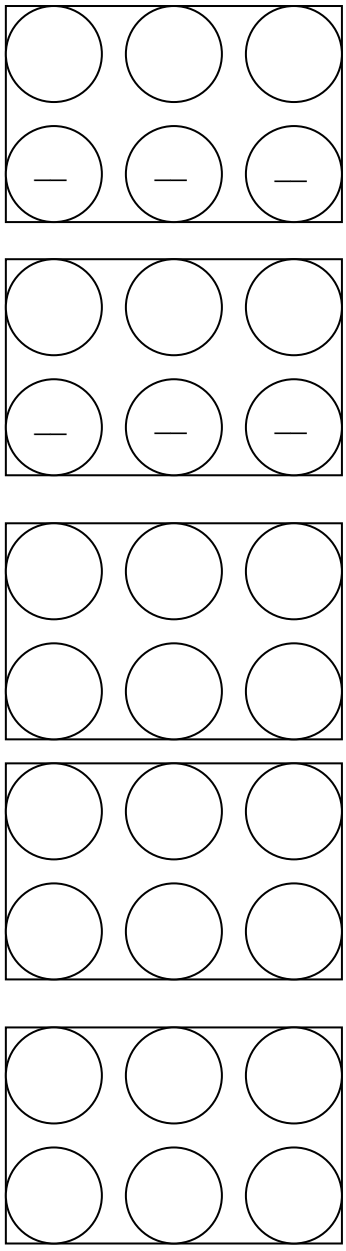


Abb.2: Versuchsprotokoll der Proliferation

4.2. Medikamentenzugabe

Die erste Zugabe des Medikaments, Abciximab (B 4.1) zu den HCMSMC, HUVEC und HCAEC erfolgte 24 Stunden nach der Zellaussaat. Dazu wurde Abciximab in Reaktionsgefäßen (Eppendorfcups) (B 4.5) in einem Verhältnis von 1: 10 verdünnt: 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 µg/ml. Für die Verdünnung von Abciximab wurde steril filtriertes, pyrogenfreies Wasser (B 4.2) verwendet. Nach der Verdünnung wurde das Medikament gleich nach dem ersten Mediumwechsel den HCMSMC, HUVEC und HCAEC entsprechend dem oben aufgeführten Konzentrationen zugegeben. In den Kontrollfeldern wurde ohne Zugabe von Medikamenten nur das Kulturmedium erneuert. Weitere Zugabe der Medikamente zu den HCMSMC, HUVEC und HCAEC erfolgte am dritten Tag nach der Zellaussaat. Dabei wurden wieder das Kulturmedium und Abciximab erneuert. Insgesamt wurde 6 Tage kultiviert, davon die letzte 5 Tage mit Abciximab inkubiert.

4.3. Auswertung der Proliferationstests

Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte anhand der Messwerte am Zellcounter (B 4.6). 24 Stunden nach der Aussaat wurde die Anzahl der adhärierenden Zellen ermittelt. Am sechsten Tag wurde auch die Zellzahl der unbehandelten Kontrollen. Sie erfolgte in dem man jedes Loch mit 2 ml PBS^- zweimal spülte und die Zellen mit 1 ml Trypsin-ETDA-Solution (B 1.5) von der Unterlage löste und vereinzelte. Anschließend 4 ml NaCl per Dyspenser (B 4.6) hinzugefügt und die Zellen in einen Messgefäß überführt. Mit einer 5 ml Pipette wurde mehrmals durchmischt. Da für die Zellzählung die Zellzahl zu hoch war, entnahmen wir aus dem Messbehälter 0,5 ml und versetzten dies mit 9 ml NaCl. So hatten wir insgesamt eine Verdünnung von 1:200. So konnten die Zellen am Zellcounter ausgezählt werden. Damit wurde die Proliferation wie folgt berechnet:

Zellzahl 6 Tage nach Aussaat (Kontrolle) – Zellzahl 24 h nach Aussaat = 100 % ($=K_{100}$)

Bei den Zellen die mit Abciximab inkubiert wurden, wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl 6 Tage nach Aussaat mit Abciximab – Zellzahl 24 h nach Aussaat (= x %)

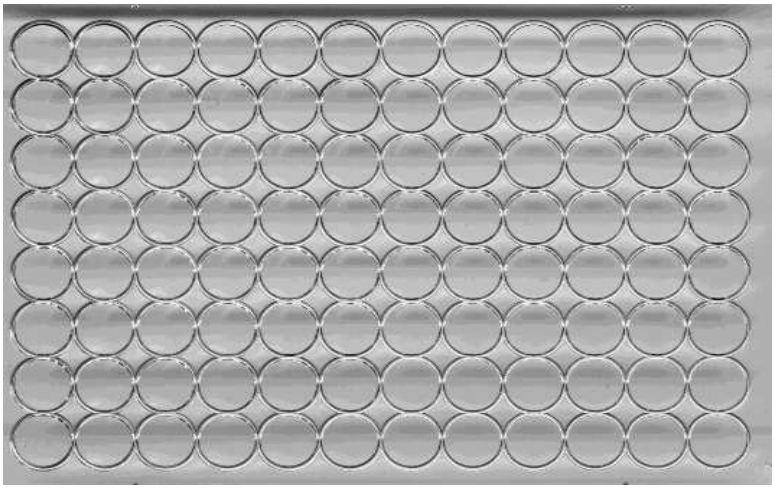
Wir haben die Proliferation bzw. die Proliferationsinhibition der mit Abciximab behandelten HCMSMC, HUVEC und HCAEC prozentual anteilig (x %) zur Proliferation der jeweiligen

unbehandelten Kontrollen (100 %) angeben. Der Versuch wurde pro Zellart dreimal durchgeführt und dann die Mittelwerte und die Signifikanz mit dem paired-t-test errechnet.

5. Vitalitätstest

5.1. Zellaussaat

In weißen 96-Lochschale (B 5.1) mit 0,33 cm²/Loch Fläche wurden die Zellen: HCMSMC, HUVEC und HCAEC für eine Kontrollreihe, eine Leerwertreihe und je Abciximab - konzentration à 12 Löcher ausgesät. Für Endothelzellen wurden die Schalen beschichtet. Es wurden 100 µl Medium mit je 5000 Zellen/cm² ausgesät. Die Leerwertreihe enthielt keine Zellen. Ein Überblick zeigt Abb.3. Es wurde 6 Tage kultiviert, die letzten 5 Tage mit Abciximab der Konzentrationen: 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 µg/ml inkubiert.



Kontrolle
0,0002 µg/ml Abciximab
0,002 µg/ml Abciximab
0,02 µg/ml Abciximab
0,2 µg/ml Abciximab
2 µg/ml Abciximab
20 µg/ml Abciximab
Leerwert

Abb.3: Versuchsprotokoll Vitalitätstest im 96-Loch Schale

5.2. Messung der Zellvitalität

Dem Medium (100 µl / 96 Loch) wurde 100 µl CellTiter-Glo™ Reagent (B 5.2) hinzugegeben und kreisend für 2 min. gemischt (B 5.3.2). Es folgte eine 10-minütige Inkubation. Dabei wird das Luciferin in Anwesenheit von Magnesium, ATP (Adenosintriphosphat) und Sauerstoff durch den Katalysator Luciferase in Oxyluciferase oxygeniert und als Nebenprodukt entstanden AMP + PP (Adenosinmonophophat + biphosphat), Kohlendioxid und Licht. Diese Relative light units (RLU) wurde mit dem Programm MicroWin 2000 des Luminometers (B 5.3.1) für 0,25 – 1sec./well gemessen.

5.3. Auswertung des Zellvitalitätstests

Es wurde die Mittelwerte der jeweils 12 Versuchswerte der Kontrolle, der mit Abciximab behandelten Zellen und der Leerwerten berechnet. Von den Mittelwerten der Kontrollen und der Abciximab wurde der Leerwertmittelwert abgezogen. Der so erhaltene Vitalitätsmittelwert der Kontrolle wurde entsprechend 100 % gesetzt und mit den Vitalitätswerten der Abciximab behandelten Zellen verglichen.

6. Statistik

Die statische Signifikanz der erhaltenen Versuchsergebnisse wurde mit dem paired-t-test berechnet, statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ akzeptiert. Die Berechnung wurde mit dem Programm SigmaStat Version 2.0 (B 6) durchgeführt.

D. Ergebnisse

1. Effekte von Abciximab auf die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression

1.1. HCMSMC

(vgl. Abb.4,5,6 und Tab.2,3)

Bei der Durchflusszytometrie wurden die Meanwerte als Ausdruck der ICAM-1-Expression bestimmt. Im folgenden Text sind die Mittelwerte (X_m) und Standardabweichungen (sd_{n-1}) davon aus jeweils 3 Versuchen angegeben. Dabei wurde der Meanwert der maximal mit TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der verschiedenen mit Abciximab behandelten Zellen in Prozent von diesem berechnet. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die ICAM-1-Expression signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p wiedergegeben.

Der Meanwert der nicht stimulierten HCMSMC betrug 13,68 ± 2,27 (59,69 % ± 3,30 %). Wurden die Zellen 6 h mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert, konnte man eine Zunahme der ICAM-1-Expression gegenüber den nicht-stimulierten Zellen beobachten. Der Meanwert betrug dann 22,92 ± 2,90 (100 %).

Wurden die HCMSMC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit einer Konzentration von 0,0002 µg/ml Abciximab versetzt, sank die ICAM-1-Expression auf einen Meanwert von 22,00 ± 2,20 (95,99 % ± 3,35 %). Im Vergleich mit den TNF-α stimulierten Zellen konnte man zwar eine leichte Verminderung der ICAM-1-Expression feststellen, jedoch ergab sich beim paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.).Die Konzentration von 0,002 µg/ml Abciximab zeigte eine leichte Abnahme der Expression bei einem Meanwert von 21,68 ± 2,50 (94,59 % ± 1,64 %).Dieses Ergebnis war im paired-t-test mit $p < 0,05$ signifikant. Bei einer Konzentration von 0,02 µg/ml zeigte sich eine Verminderung der ICAM-1-Expression mit einem Meanwert von 21,38 ± 3,49 (93,28 % ± 4,20 %). Diese war im paired-t-test nicht signifikant (n.s.). Bei der Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab ergab sich ein Meanwert 21,82 ± 3,62 (95,20 % ± 5,59 %), welches ebenfalls nicht signifikant (n.s.). Bei 2 µg/ml

Abciximab lag der Meanwert bei 21,90 ± 2,75 (95,55 % ± 0,57 %). Das Ergebnis war mit einem $p < 0,01$ signifikant war. Bei 20 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Wert auf 22,52 ± 3,11 (98,25 % ± 2,21 %). Dieser Konzentration zeigte keine signifikante ICAM-1-Expressionsabnahme (n.s.).

Tab.2: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HCMSMC** nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml). Zusätzlich die Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	**Meanwert (%)**
nicht stimuliert	13,68 ± 2,27	59,69 ± 3,30
6 h 20ng/ml TNF-α	22,92 ± 2,90	100 ± 0
18 h **0,0002µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	22,00 ± 2,20	95,99 ± 3,35
18 h **0,002 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	21,68 ± 2,50	94,59 ± 1,64
18 h **0,02 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	21,38 ± 3,49	93,28 ± 4,20
18 h **0,2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	21,82 ± 3,62	95,20 ± 5,59
18 h **2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	21,90 ± 2,75	95,55 ± 0,57
18 h **20 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	22,52 ± 3,11	98,25 ± 2,21

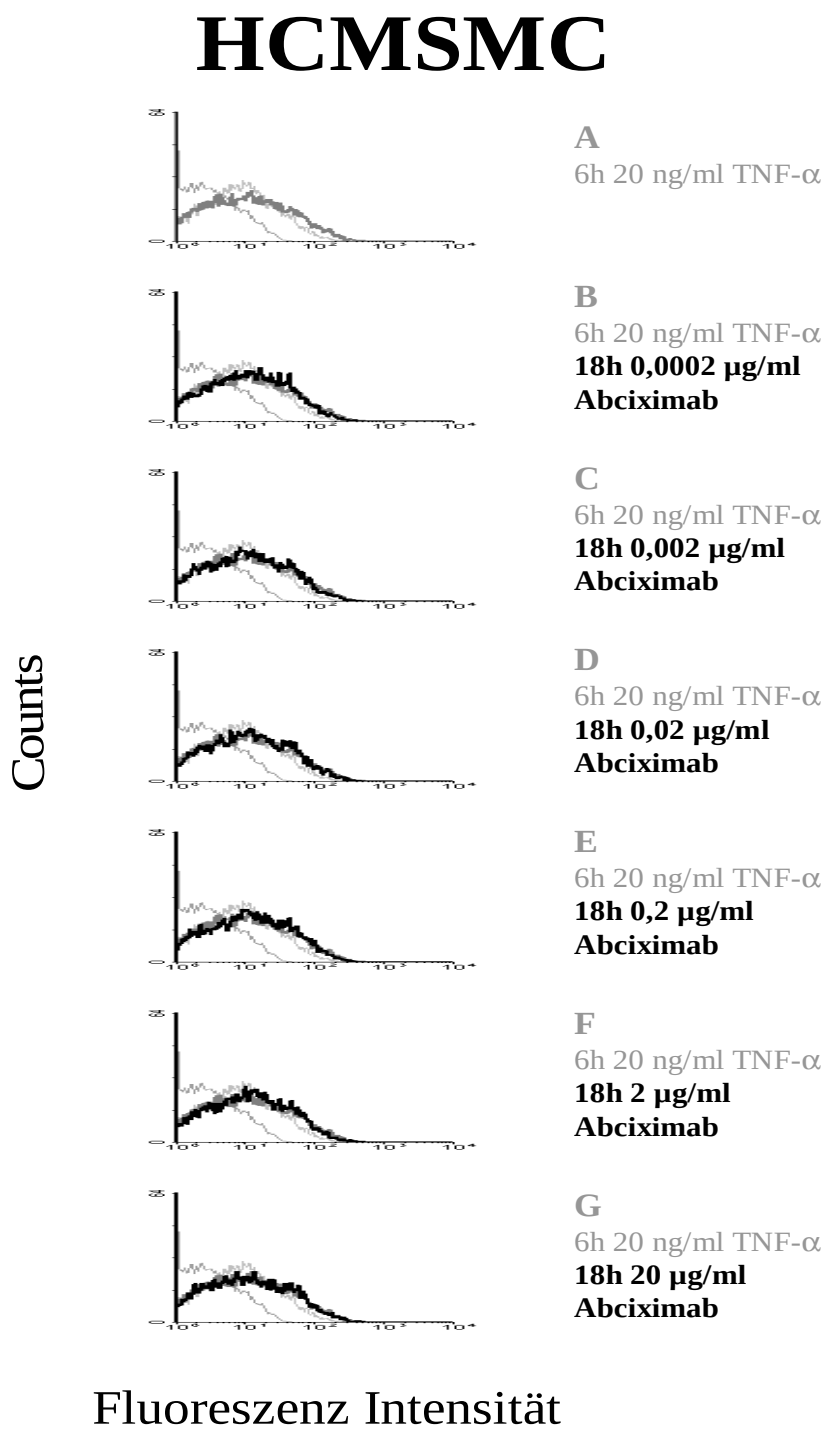


Abb.4: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte **ICAM-1-Expression der HCMSMC** (A) nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml (B), 0,002 µg/ml (C), 0,02 µg/ml (D), 0,2 µg/ml (E), 2 µg/ml (F), 20 µg/ml (G)).

Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: mit Abciximab Inkubation.

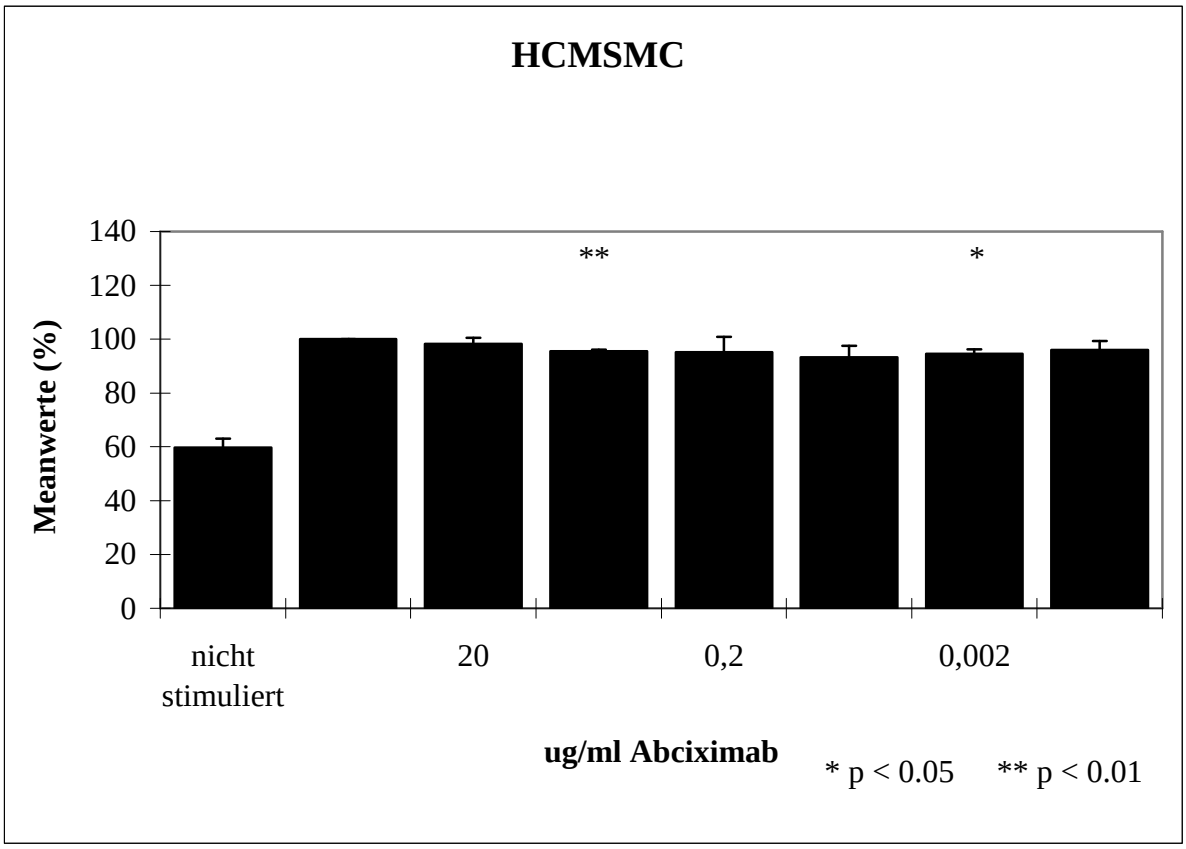


Abb.5: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HCMSMC**, dargestellt in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100%), nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,0002 µg/ml). Es sind jeweils die Irrtumswahrscheinlichkeiten p der einzelnen Versuchsergebnisse angegeben.

Als Kontrollen dienten einmal mit Actinomycin-D behandelte Zellen und mit FITC-konjugierten IgG- Isotypen anstelle von Anti-ICAM-1-FITC inkubierte Zellen. Die dabei erhaltenen Meanwerte sind in Tab.3 in einer Übersicht dargestellt, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen in Abb.6.

Wurden die HCMSMC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit 1 µg/ml Actinomycin-D inkubiert betrug der Meanwert 18,47 ± 4,56 (80,59 % ± 14,80 %), war also nur gering höher als bei den nicht-stimulierten Zellen. Wurden die HCMSMC anstelle von Anti-ICAM-1-FITC mit IgG-Isotyp-FITC inkubiert, zeigte sich folgende Fluoreszenzintensität: mit vorheriger TNF-α-Stimulation lag der Meanwert bei 3,18 ± 0,59 (13,87 % ± 1,99 %), ohne TNF-α-Stimulation bei 3,34 ± 0,83 (14,57 % ± 3,09 %).

Tab.3: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression bei HCMSMC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D und Meanwerte der HCMSMC nach Inkubation mit IgG-Isotyp (mit und ohne TNF-α-Stimulation). Außerdem Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %).
Es sind jeweils die Mittewerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	Meanwert (%)
18 h 1 µg/ml AM-D 6 h 20 ng/ml TNF-α	18,47 ± 4,56	80,59 ± 14,80
IgG-Isotyp 6 h 20 ng/ml TNF-α	3,18 ± 0,59	13,87 ± 1,99
IgG-Isotyp ohne TNF-α	3,34 ± 0,83	14,57 ± 3,09

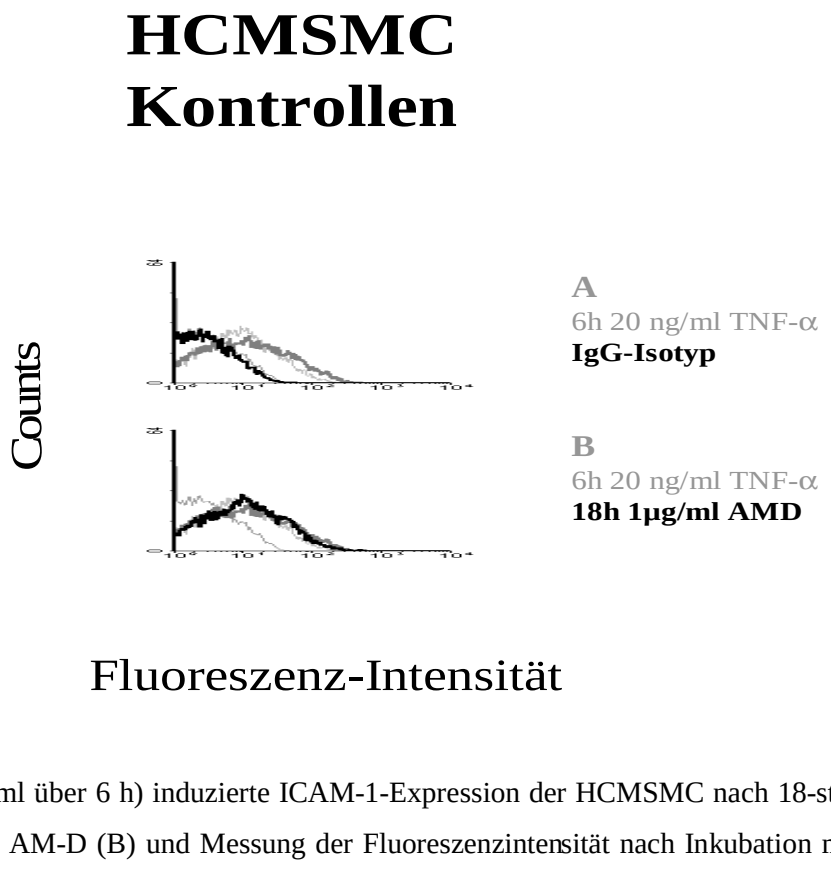


Abb.6: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression der HCMSMC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D (B) und Messung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit IgG-Isotyp (A).
Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: IgG-Isotyp (A), AM-D (B).

1.2. HUVEC

(vgl. Abb.7,8,9 und Tab.4,5)

Bei der Durchflusszytometrie wurden die Meanwerte als Ausdruck der ICAM-1-Expression bestimmt. Im folgenden Text sind nun die Mittelwerte und Standardabweichungen davon aus jeweils 3 Versuchen angegeben. Dabei wurde der Meanwert der maximal mit TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der verschiedenen mit Abciximab behandelten Zellen in Prozent von diesem berechnet. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die ICAM-1-Expression signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p wiedergegeben.

Der Meanwert der nicht stimulierten HUVEC betrug 10,48 ± 0,67 (3,18 % ± 0,20 %). Wurden die Zellen 6 h mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert, konnte man eine Zunahme der ICAM-1-Expression gegenüber den nicht-stimulierten Zellen beobachten. Der Meanwert betrug dann 329,43 ± 8,26 (100 %).

Wurden die HUVEC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit einer Konzentration von 0,0002 µg/ml Abciximab versetzt, sank die ICAM-1-Expression auf einen Meanwert von 320,83 ± 24,00 (97,36 % ± 7,84 %). Im Vergleich mit den TNF-α stimulierten Zellen konnte man zwar eine leichte Verminderung der ICAM-1-Expression feststellen, jedoch ergab sich beim paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Bei 0,002 µg/ml Abciximab ergab sich sogar eine leichte Zunahme der Expression bei einem Meanwert von 332,50 ± 24,24 (100,81 % ± 5,95 %). Auch dieses Ergebnis war im paired-t-test nicht signifikant (n.s.). Bei einer Konzentration von 0,02 µg/ml zeigte sich eine Verminderung der ICAM-1-Expression mit einem Meanwert von 308,12 ± 35,78 (93,46 % ± 12,05 %). Diese war ebenfalls nicht signifikant (n.s.). Bei der Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab ergab sich ein Meanwert von 326,07 ± 26,58 (98,86 % ± 7,12 %), welches erneut kein signifikantes Ergebnis lieferte (n.s.). Bei 2 µg/ml Abciximab lag der Meanwert bei 324,09 ± 29,70 (98,22 % ± 8,14 %). Das Ergebnis war ebenfalls nicht signifikant (n.s.). Bei 20 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Wert zwar auf 308,14 ± 29,45 (93,44 % ± 9,00 %). Es war aber auch in dieser Konzentration keine signifikante ICAM-1-Expressionsabnahme zeigbar (n.s.).

Tab.4: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HUVEC** nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml). Zusätzlich die Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	**Meanwert (%)**
nicht stimuliert	10,48 ± 0,67	3,18 ± 0,20
6 h 20ng/ml TNF-α	329,43 ± 8,26	100 ± 0
18 h **0,0002µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	320,83 ± 24,00	97,36 ± 7,84
18 h **0,002 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	332,50 ± 24,24	100,81 ± 5,95
18 h **0,02 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	308,12 ± 35,78	93,46 ± 12,05
18 h **0,2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	326,07 ± 26,58	98,86 ± 7,12
18 h **2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	324,09 ± 29,70	98,22 ± 8,14
18 h **20 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	308,14 ± 29,45	93,44 ± 9,00

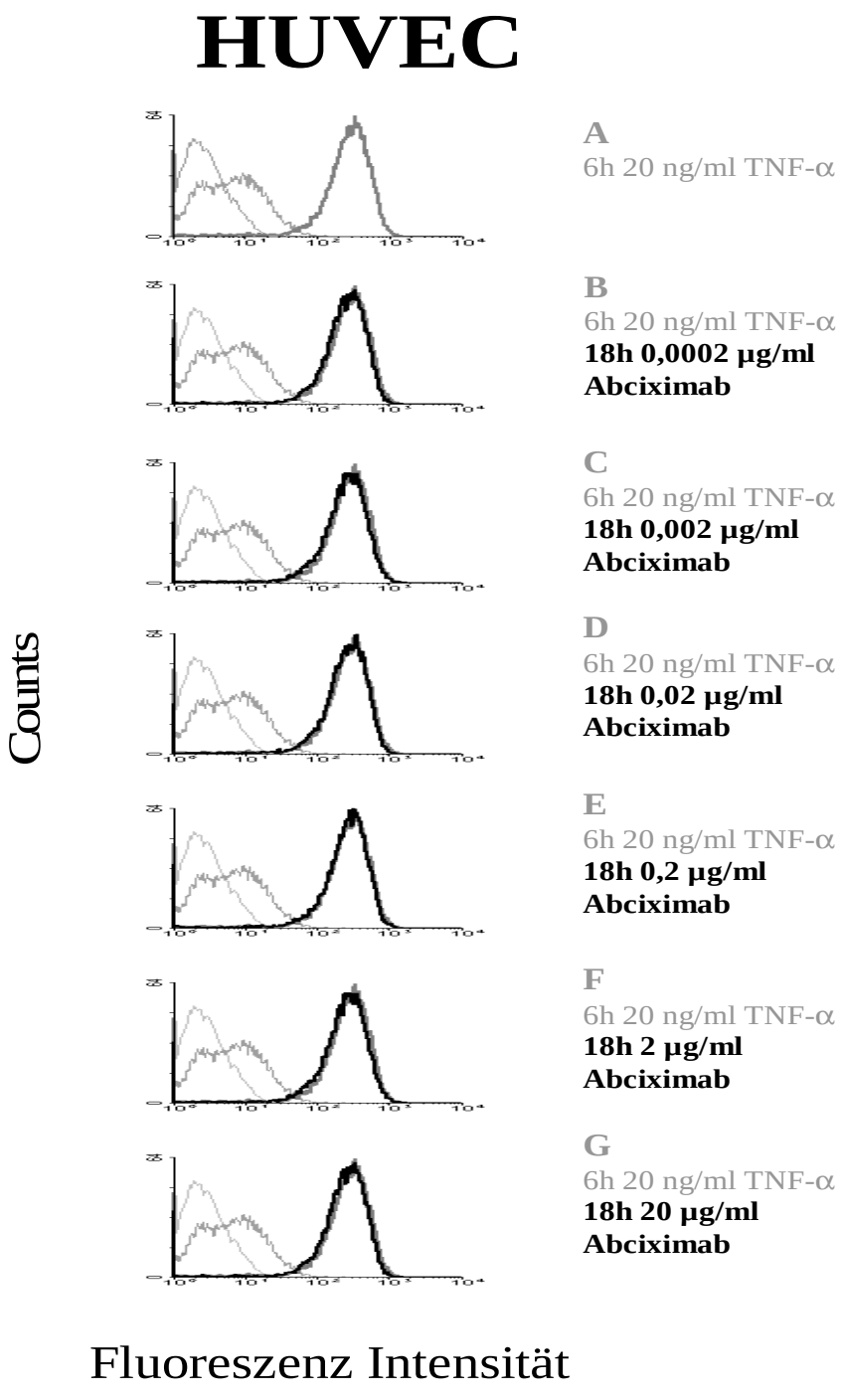


Abb.7: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte **ICAM-1-Expression der HUVEC** (A) nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml (B), 0,002 µg/ml (C), 0,02 µg/ml (D), 0,2 µg/ml (E), 2 µg/ml (F), 20 µg/ml (G)).

Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: mit Abciximab Inkubation.

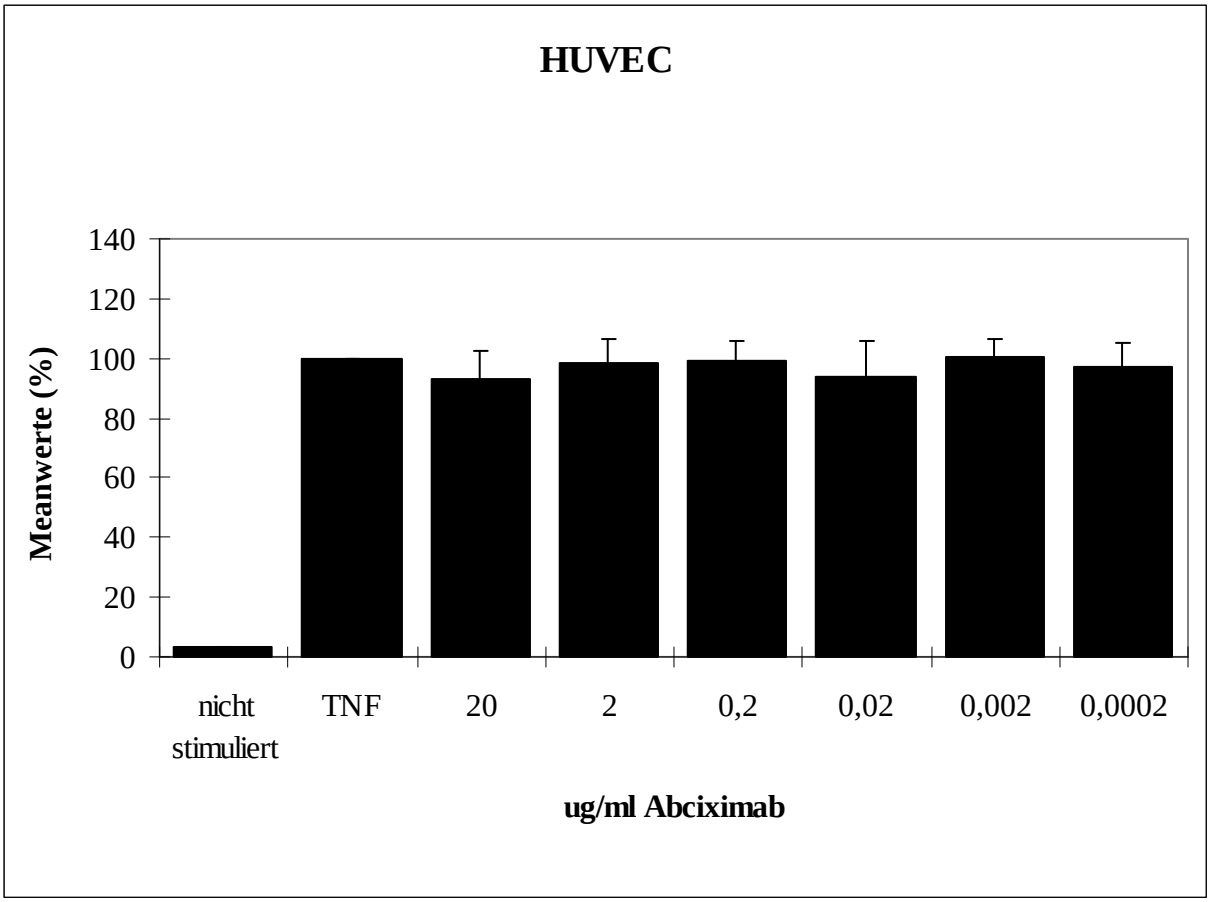


Abb.8: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HUVEC**, dargestellt in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100%), nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,0002 µg/ml).

Als Kontrollen dienten einmal mit Actinomycin-D behandelte Zellen und mit FITC-konjugierten IgG- Isotypen anstelle von Anti-ICAM-1-FITC inkubierte Zellen. Die dabei erhaltenen Meanwerte sind in Tab.5 in einer Übersicht dargestellt, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen in Abb.9.

Wurden die HUVEC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit 1 µg/ml Actinomycin-D inkubiert betrug der Meanwert 10,08 ± 0,13 (3,06 % ± 0,07 %), war also nur gering niedriger als bei den nicht-stimulierten Zellen. Wurden die HUVEC anstelle von Anti-ICAM-1-FITC mit IgG-Isotyp-FITC inkubiert, zeigte sich folgende Fluoreszenzintensität: mit vorheriger TNF-α-Stimulation lag der Meanwert bei 3,54 ± 0,14 (0,93 % ± 0,32 %), ohne TNF-α-Stimulation bei 3,07 ± 0,87 (1,07 % ± 0,62 %).

Tab.5: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression bei HUVEC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D und Meanwerte nach Inkubation mit IgG-Isotyp (mit und ohne TNF-α-Stimulation). Außerdem Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %).
Es sind jeweils die Mittewerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	Meanwert (%)
18 h 1 µg/ml AM-D 6 h 20 ng/ml TNF-α	10,08 ± 0,13	3,06 ± 0,07
IgG-Isotyp 6 h 20 ng/ml TNF-α	3,54 ± 0,14	1,07 ±0,62
IgG-Isotyp ohne TNF-α	3,07 ± 0,87	0.93 ±0,32

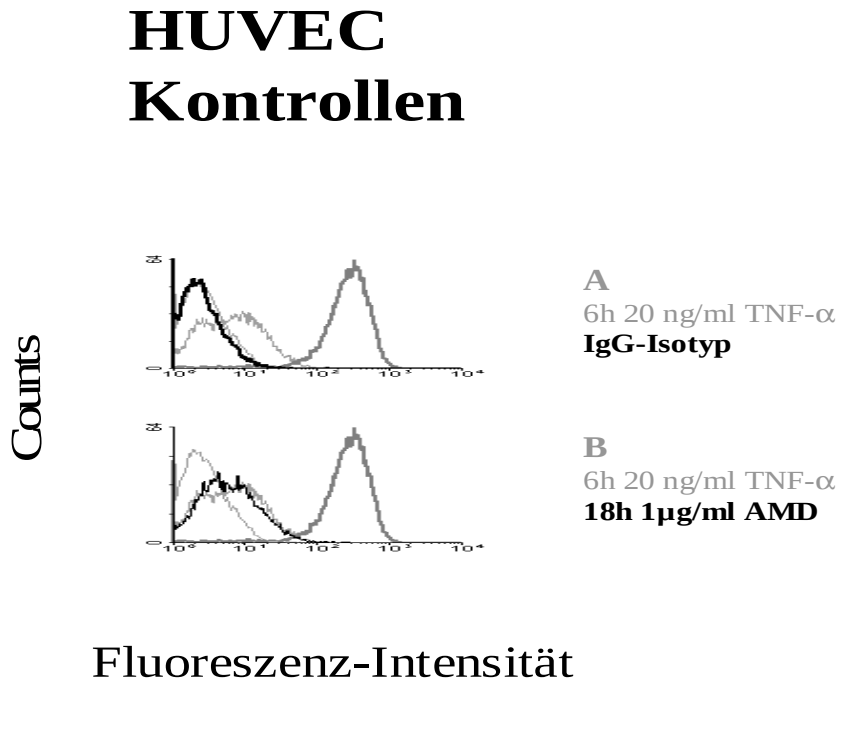


Abb.9: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression der HUVEC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D (B) und Messung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit IgG-Isotyp (A).
Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: IgG-Isotyp (A), AM-D (B).

1.3. HCAEC

(vgl. Abb.10,11,12 und Tab.6,7)

Bei der Durchflusszytometrie wurden die Meanwerte als Ausdruck der ICAM-1-Expression bestimmt. Im folgenden Text sind nun die Mittelwerte und Standardabweichungen davon aus jeweils 3 Versuchen angegeben. Dabei wurde der Meanwert der maximal mit TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der verschiedenen mit Abciximab behandelten Zellen in Prozent von diesem berechnet. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die ICAM-1-Expression signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p wiedergegeben.

Der Meanwert der nicht stimulierten HCAEC betrug 118,57 ± 43,92 (18,04 % ± 6,98 %). Wurden die Zellen 6 h mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert, konnte man eine Zunahme der ICAM-1-Expression gegenüber den nicht-stimulierten Zellen beobachten. Der Meanwert betrug dann 647,15 ± 39,86 (100 %).

Wurden die HCAEC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit einer Konzentration von 0,0002 µg/ml Abciximab versetzt, veränderte sich die ICAM-1-Expression nur minimal auf einen Meanwert von 647,37 ± 44,87 (100,06 % ± 5,32 %).Das Ergebnis war nicht signifikant (n.s.). Im Vergleich mit den TNF-α stimulierten Zellen konnte man zwar eine leichte Verminderung der ICAM-1-Expression bei einer Konzentration von 0,002 µg/ml Abciximab bei einem Meanwert von 634,56 ± 37,86 (98,06 % ± 1,97 %) feststellen, jedoch ergab sich beim paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Bei einer Konzentration von 0,02 µg/ml zeigte sich eine Verminderung der ICAM-1-Expression mit einem Meanwert von 642,53 ± 27,93 (99,36 % ± 3,15 %). Auch dieses Ergebnis war im paired-t-test nicht signifikant (n.s.). Bei der Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab ergab sich ein Meanwert von 621,47 ± 82,92 (95,79 % ± 12,02 %), welches erneut kein signifikantes Ergebnis lieferte (n.s.). Bei 2 µg/ml Abciximab lag der Meanwert bei 632,64 ± 20,95 (97,94 % ± 4,49 %). Das Ergebnis war ebenfalls nicht signifikant (n.s.). Bei 20 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Wert zwar auf 630,81 ± 47,79 (97,42 % ± 4,84 %). Es war aber auch in dieser Konzentration keine signifikante ICAM-1-Expressionsabnahme zeigbar (n.s.).

Tab.6: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HCAEC** nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml). Zusätzlich die Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	**Meanwert (%)**
nicht stimuliert	118,57 ± 43,92	18,04 ± 6,98
6 h 20ng/ml TNF-α	647,15 ± 39,86	100 ± 0
18 h **0,0002µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	647,37 ± 44,87	100,06 ± 5,32
18 h **0,002 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	634,56 ± 37,86	98,06 ± 1,97
18 h **0,02 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	642,53 ± 27,93	99,36 ± 3,15
18 h **0,2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	621,47 ± 82,92	95,79 ± 12,02
18 h **2 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	632,64 ± 20,95	97,94 ± 4,49
18 h **20 µg/ml Abciximab** 6 h 20ng/ml TNF-α	630,81 ± 47,79	97,42 ± 4,84

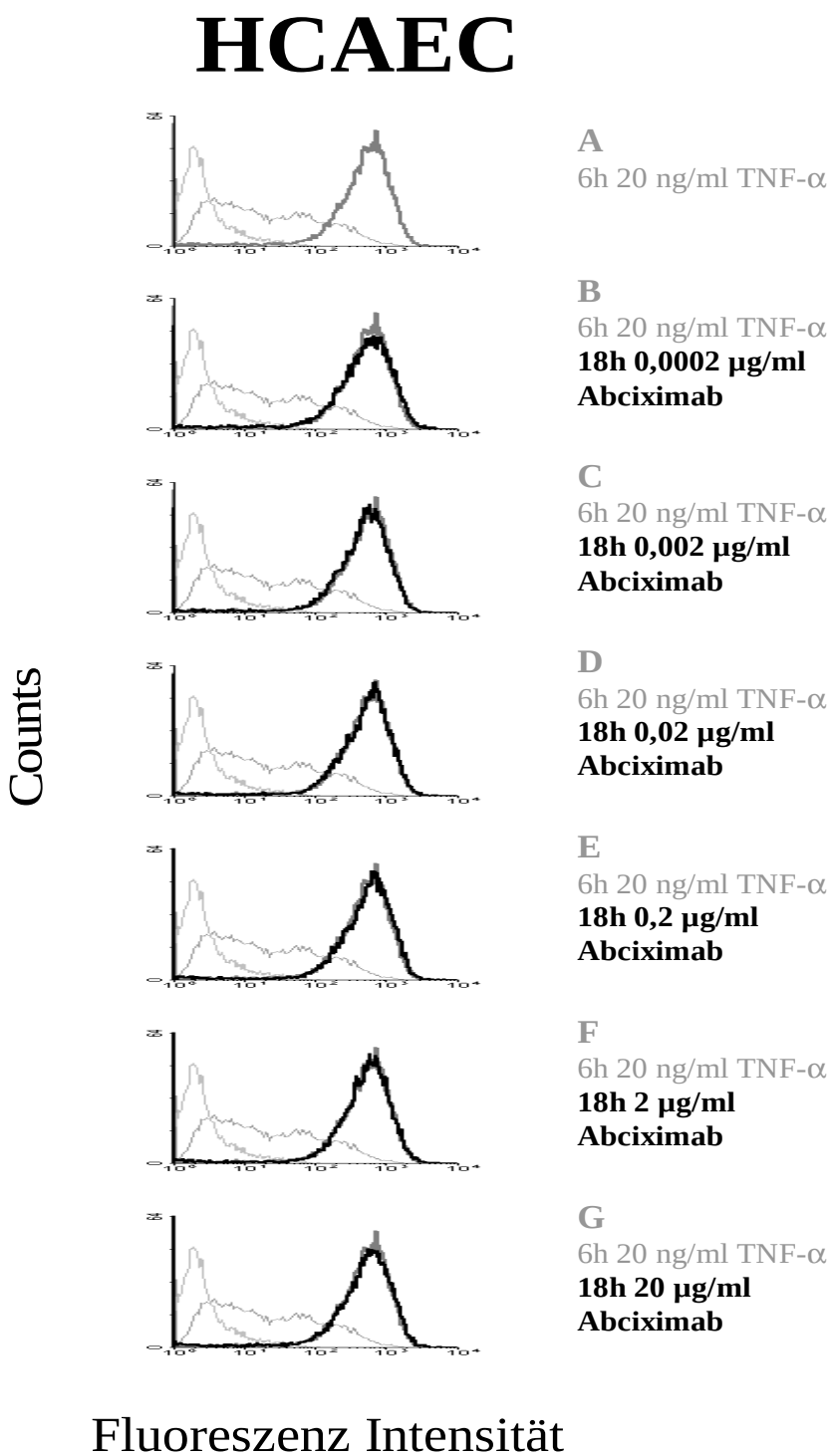


Abb.10: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte **ICAM-1-Expression der HCAEC** (A) nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml (B), 0,002 µg/ml (C), 0,02 µg/ml (D), 0,2 µg/ml (E), 2 µg/ml (F), 20 µg/ml (G)).

Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: mit Abciximab Inkubation.

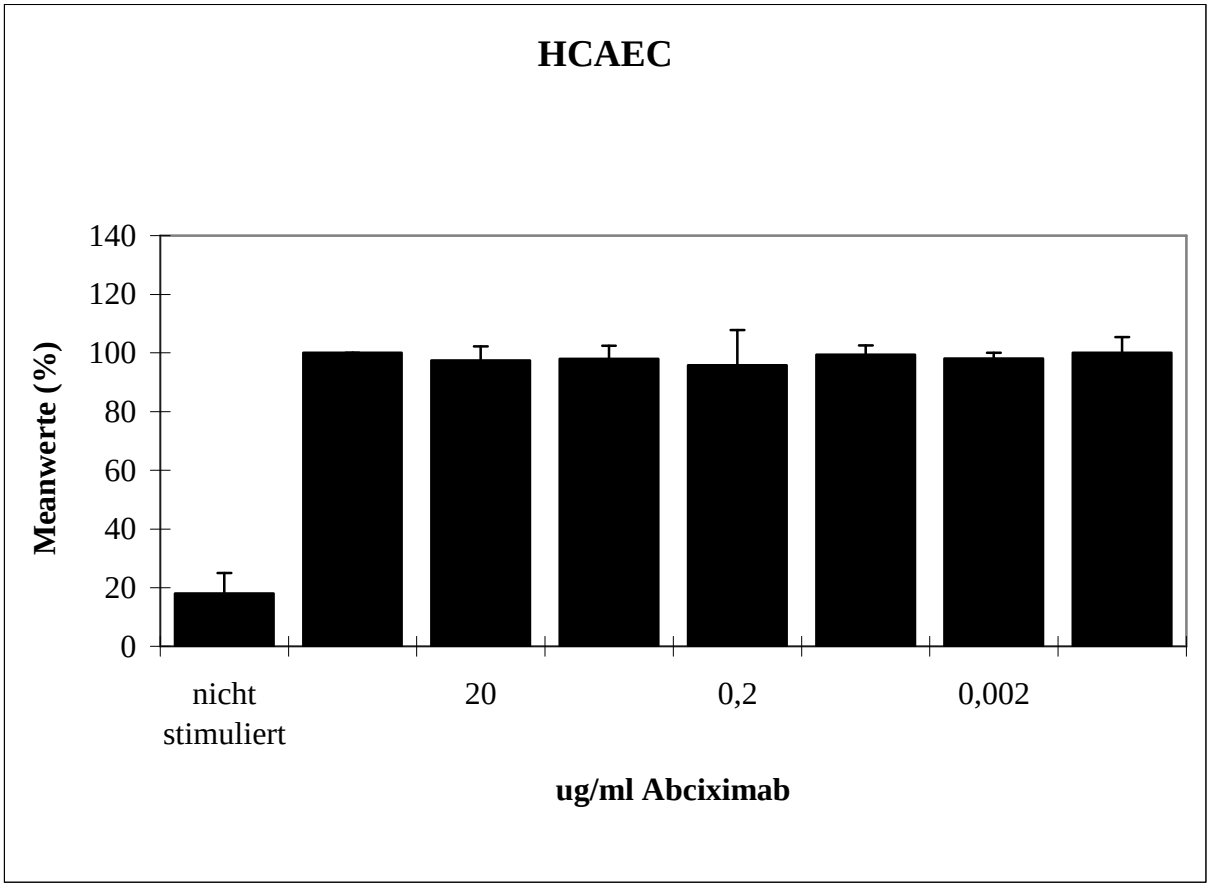


Abb.11: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierten ICAM-1-Expression bei **HCAEC**, dargestellt in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100%), nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,0002 µg/ml).

Als Kontrollen dienten einmal mit Actinomycin-D behandelte Zellen und mit FITC-konjugierten IgG- Isotypen anstelle von Anti-ICAM-1-FITC inkubierte Zellen. Die dabei erhaltenen Meanwerte sind in Tab.7 in einer Übersicht dargestellt, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Histogrammen in Abb.12.

Wurden die HCAEC 12 h vor TNF-α-Stimulation mit 1 µg/ml Actinomycin-D inkubiert betrug der Meanwert 113,53 ± 40,90 (17,39 % ± 6,97 %), war also nur gering niedriger als bei den nicht-stimulierten Zellen. Wurden die HCAEC anstelle von Anti-ICAM-1-FITC mit IgG-Isotyp-FITC inkubiert, zeigte sich folgende Fluoreszenzintensität: mit vorheriger TNF-α Stimulation lag der Meanwert bei 6,01 ± 2,11 (0,94 % ± 0,43 %), ohne TNF-α-Stimulation bei 5,67 ± 1,70 (0,87 % ± 0,31 %).

Tab.7: Meanwerte als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression bei HCAEC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D und Meanwerte nach Inkubation mit IgG-Isotyp (mit und ohne TNF-α-Stimulation). Außerdem Meanwerte in Prozent von der maximal durch TNF-α stimulierten ICAM-1-Expression (100 %).

Es sind jeweils die Mittewerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Meanwert	Meanwert (%)
18 h 1 µg/ml AM-D 6 h 20 ng/ml TNF-α	113,53 ± 40,90	17,39 ± 6,97
IgG-Isotyp 6 h 20 ng/ml TNF-α	6,01 ± 2,11	0,94 ±0,43
IgG-Isotyp ohne TNF-α	5,67 ± 1,70	0.87 ±0,31

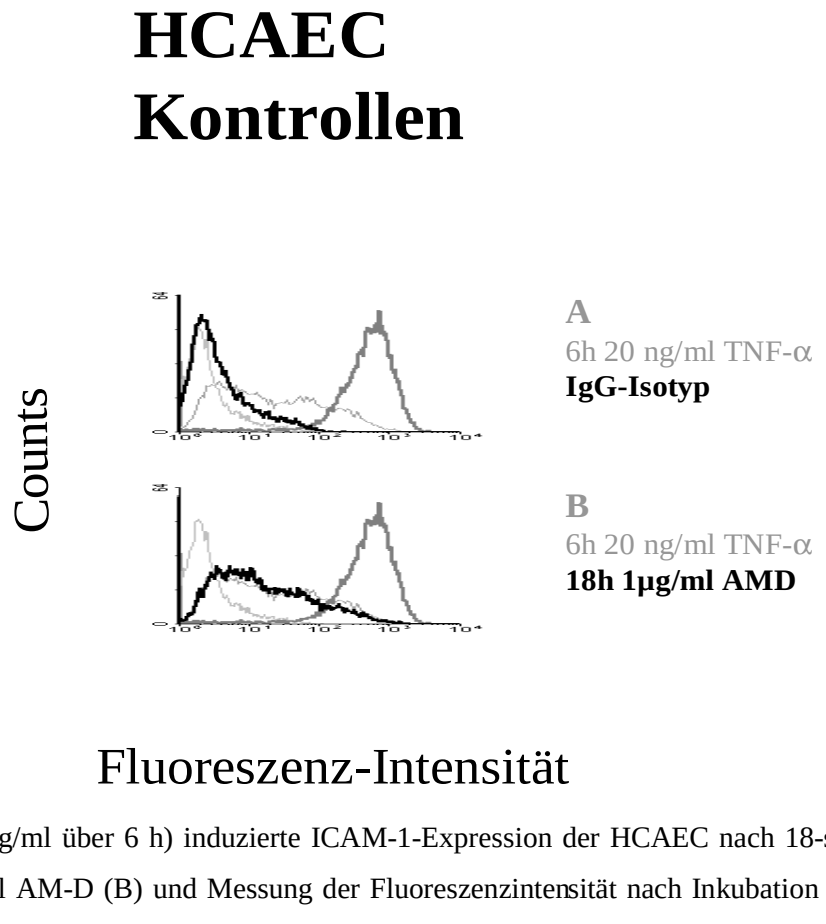


Abb.12: TNF-α (20 ng/ml über 6 h) induzierte ICAM-1-Expression der HCAEC nach 18-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml AM-D (B) und Messung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit IgG-Isotyp (A).

Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht-stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: IgG-Isotyp (A), AM-D (B).

1.4. TNF-α induzierte ICAM-1-Expression der HCMSMC, HUVEC und HCAEC nach Inkubation mit Abciximab im Vergleich

(vgl. Abb.13,14 und Tab.8)

Bei allen 3 Zellarten ließ sich keine signifikante Hemmung der ICAM-1-Expression nach TNF-α- Stimulation (20 ng/ml über 6 h) durch 18-stündige Inkubation mit Abciximab nachweisen. Bei den HCMSMC konnte man zwar eine statistisch signifikante Abnahme in den Konzentrationen 2 µg/ml ($p < 0,01$) und 0,002 µg/ml ($p < 0,05$) erfassen, jedoch war die Hemmung der ICAM-1-Expression mit weniger als 5 %.

Tab.8: Meanwerte in Prozent als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h)induzierten ICAM-1-Expression bei **HCMSMC, HUVEC** und **HCAEC** nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml)im Vergleich. Es sind jeweils die Mittelwerte von 3 Versuchen angegeben. Außerdem die Irrtumswahrscheinlichkeit p als Signifikanz der Ergebnisse (n.s = nicht signifikant).

	Nicht stimuliert	TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,0002 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,002 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,02 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,2 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 2 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 20 µg/ml** TNF-α 20ng/ml
HCMSMC Mean-wert(%)	59,69 ± 3,30	100	95,99 ± 3,35	94,59 ± 1,64	93,28 ± 4,20	95,20 ± 5,59	95,55 ± 0,57	98,25 ± 2,21
p			n.s.	< 0,05	n.s.	n.s.	< 0,01	n.s.
HUVEC Mean-wert(%)	3,18 ± 0,20	100	97,36 ± 7,84	100,81 ± 5,95	93,46 ± 12,05	98,86 ± 7,12	98,22 ± 8,12	93,44 ± 9,00
p			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s
HCAEC Mean-wert(%)	18,04 ± 6,98	100	100,06 ± 5,32	98,06 ± 1,97	99,36 ± 3,15	95,79 ± 12,02	97,94 ± 4,49	97,42 ± 4,84
p			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

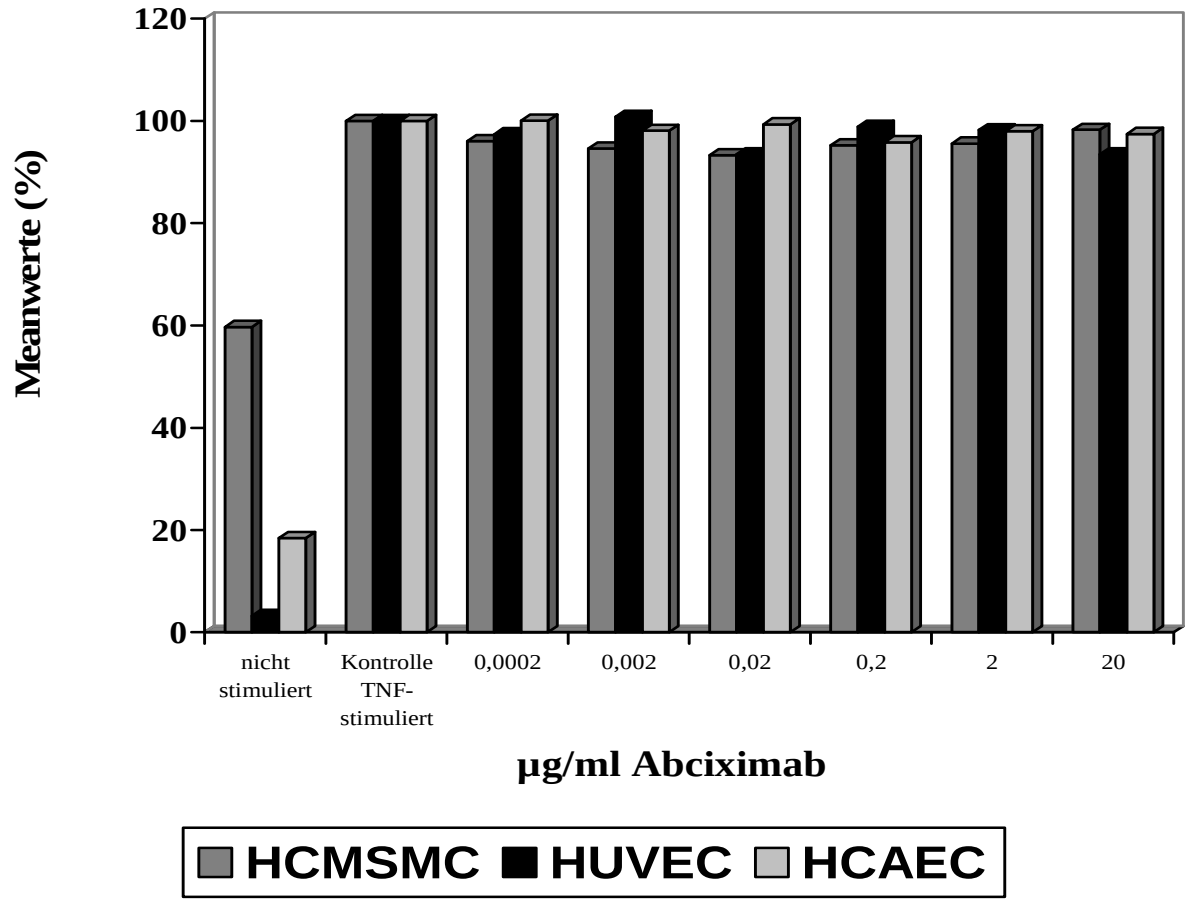


Abb.13: Meanwerte in Prozent als Ausdruck der TNF-α (20 ng/ml über 6 h)induzierten ICAM-1-Expression bei **HCMSMC, HUVEC** und **HCAEC** nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml)im Vergleich.
Dunkelgrau: HCMSMC, schwarz: HUVEC, hellgrau: HCAEC.

Die Kontrollen aller 3 Zellarten lieferten ungefähr die gleichen Resultate. Bei einer Inkubation mit 1 µg/ml AM-D 12 h vor TNF-α- Stimulation lagen die Meanwerte der Endothelzellen HUVEC und HCAEC nur knapp unter denen der nicht stimulierten Zellen. Während bei den HCMSMC mit 80,59 % über den nicht stimulierten Meanwert von 59,69 % lag. Die Meanwerte bei Inkubation mit IgG-Isotyp (mit und ohne TNF-α- Stimulation) lagen bei HUVEC erwartungsgemäß bei 0,93 % und 1,07%, bei den HCAEC ein wenig niedriger bei 0,87 % und 0,94 % und bei den HCMSMC entsprechend höher bei 14,57 % und 13,87 % der Fluoreszenzintensität der maximal mit TNF-α-stimulierten Zellen.

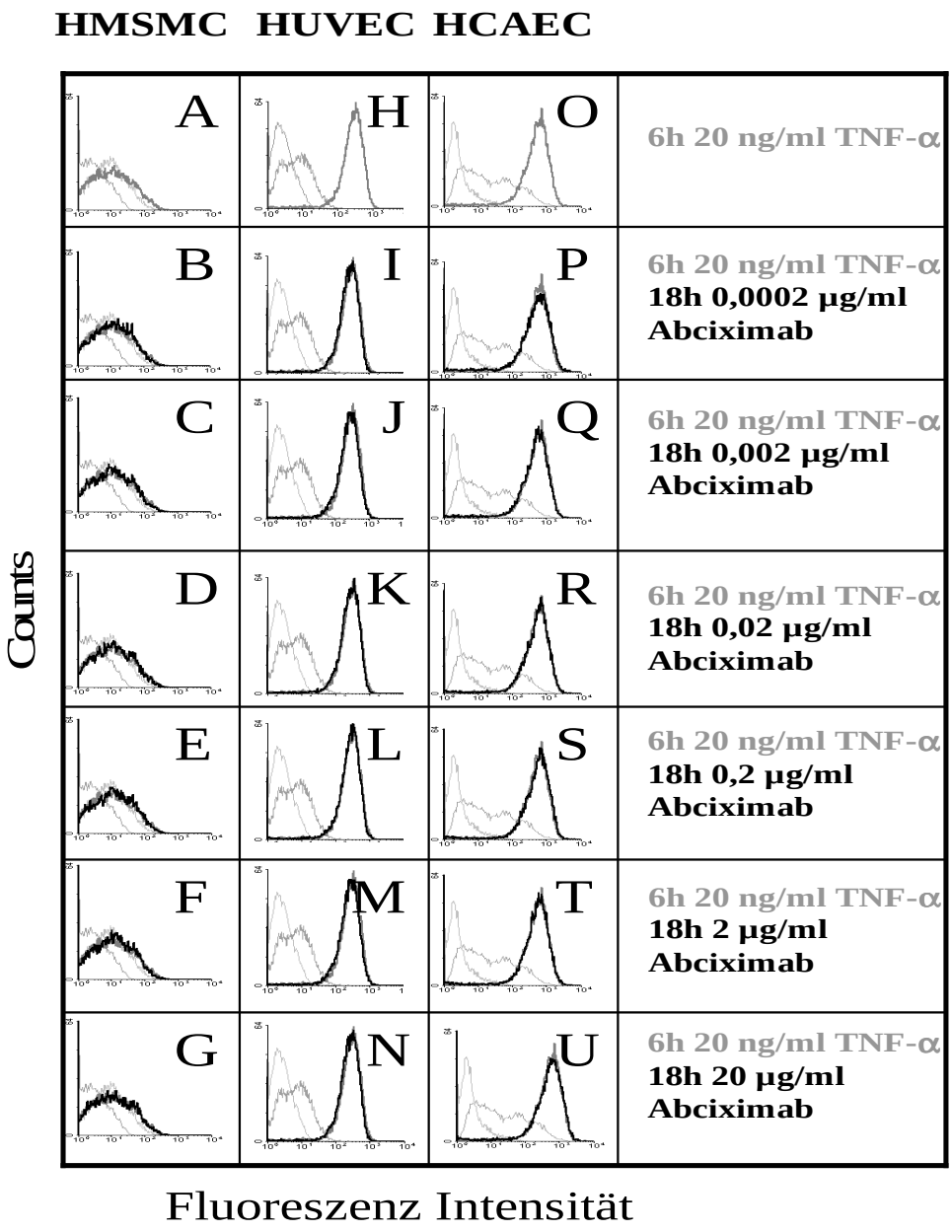


Abb.14: TNF-α (20 ng/ml über 6 h)induzierte ICAM-1-Expression bei **HCMSMC** (A-G)**, HUVEC** (H-N) und **HCAEC** (O-U) nach 18-stündiger Inkubation mit Abciximab (0,0002 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml)im Vergleich.

Grau dünn: Eigenfluoreszenz (heller) und nicht stimuliert (dunkler); grau dick: TNF-α-Stimulation; schwarz: mit Abciximab inkubiert (B-G, I-N, P-U).

2. Migration

2.1. Effekte von Abciximab auf die Migration der HCMSMC

(vgl. Abb.15,16 und Tab.9)

Zur Auswertung des Migrationstests der HCMSMC wurden Mittelwerte für die Migrationstrecke sowie die Migrationsgeschwingkeit (V) berechnet. Die Ermittlung der Migrationstrecke erfolgte durch Messung vom Wundrand bis zur vordersten Zellfront in mm. Für die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit wurde die von der vordersten Zellfront zurückgelegte Strecke auf die Zeit seit Beginn der Migration bezogen.
In der Kontrolle erhielten wir als Mittelwert der Migrationstrecke 7,88 mm, welches eine Migrationsgeschwindigkeit (V) von 0,164 mm/h entsprach. Diese Werte setzten wir als 100 % fest mit einer Standardabweichung (sd_{n-1}) von 25,55 %. Die Zugabe von 0,0002 µg/ml Abciximab zeigte eine Hemmung der Migrationstrecke auf 7,55 mm, also eine Migrationgeschwindigkeit (V) von 0,157 mm/h. Dies entsprach einer Migration von 95,81 % ± 23,79 % war diese leichte Inhibition aber nicht signifikant (n.s.). Bei einer Konzentration von 0,002 µg/ml sanken die Mittelwerte weiter auf 7,49 mm Migrationstrecke, 0,156 mm/h Migrationsgeschwindigkeit (V) und 95,05 % ± 25,54 % Migration. Das Ergebnis ebenfalls nicht signifikant (n.s.). Bei 0,02 µg/ml Abciximab stiegen die Mittelwerte sogar leicht an. So betrug die Strecke 8,01 mm, die Geschwindigkeit (V) auf 0,167 mm/h und einer Migration von 101.65 % ± 22,46 %. Das Ergebnis erneut nicht signifikant (n.s.). Bei 0,2 µg/ml Abciximab fielen die Mittelwerte jedoch wieder ab. Hier betrug die Migrationstrecke 7,31 mm, bei einer Migrationsgeschwindigkeit (V) von 0,152 mm/h und einer Migration von 92,77 % ± 28,79 % erwies sich diese erneut als nicht signifikant (n.s.). Die Zugabe von 2 µg/ml Abciximab erbrachte 7,59 mm Migrationstrecke, 0,158 mm/h Migrationsgeschwindigkeit (V). Dies entsprach einer Migration von 96,32 % ± 22,79 % erwies sich das Ergebnis als nicht signifikant (n.s.). Auch die Konzentration 20 µg/ml Abciximab lieferte mit Migrationstrecke 7,62 mm, Migrationsgeschwindigkeit (V) 0,159 mm/h, Migration 96,57 % ± 30,59 % kein signifikantes Ergebnis (n.s.).

Eine Übersicht zeigt über die verschieden erhaltenem Mittelwerte zeigen Tab.9 und das Diagramm in Abb.15. Eine Darstellung der migrierten Zellen ist in Abb.16 dargestellt.

Tab.9: Mittelwerte der Migrationstrecke in mm, der Migrationsgeschwindigkeit (V) in mm/h, der Migration bei in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle. Zusätzlich angegeben die Standardabweichungen (sd n-1) in Prozent. Migrationstrecke; V = Migrationsgeschwindigkeit

Kontrolle Migration	**Abciximab 0,0002µg/ml** Migration	**Abciximab 0,002µg/ml** Migration	**Abciximab 0,02µg/ml** Migration	**Abciximab 0,2µg/ml** Migration	**Abciximab 2µg/ml** Migration	**Abciximab 20µg/ml** Migration
Migrations-strecke (mm): 7.88	7,55	7,49	8,01	7,31	7,59	7,62
V(mm/h): 0.164	0,157	0,156	0,167	0,152	0,158	0,159
Migrations-strecke (%): 100	95,81	95,05	101,65	92,77	96,32	96,57
sd_{n-1}(%) 25.55	23,79	25,54	22,46	28,79	22,79	30,59

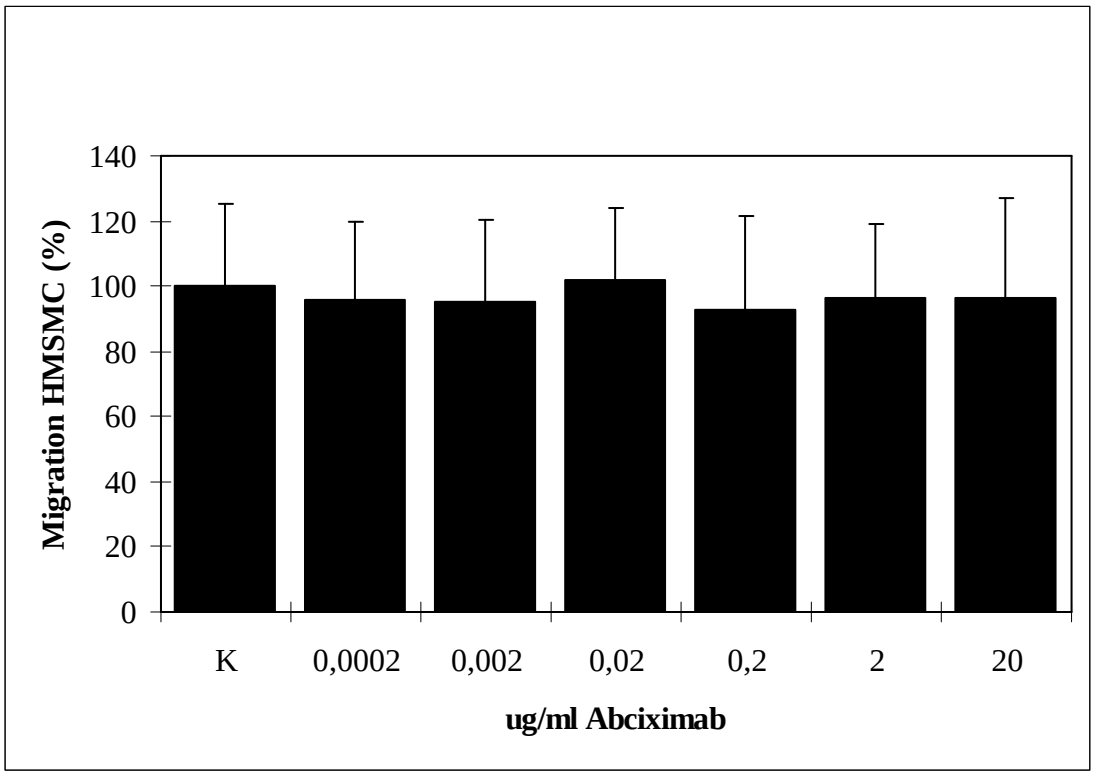


Abb.15: Mittelwerte der Migrationstrecke der **HCMSMC** in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle.

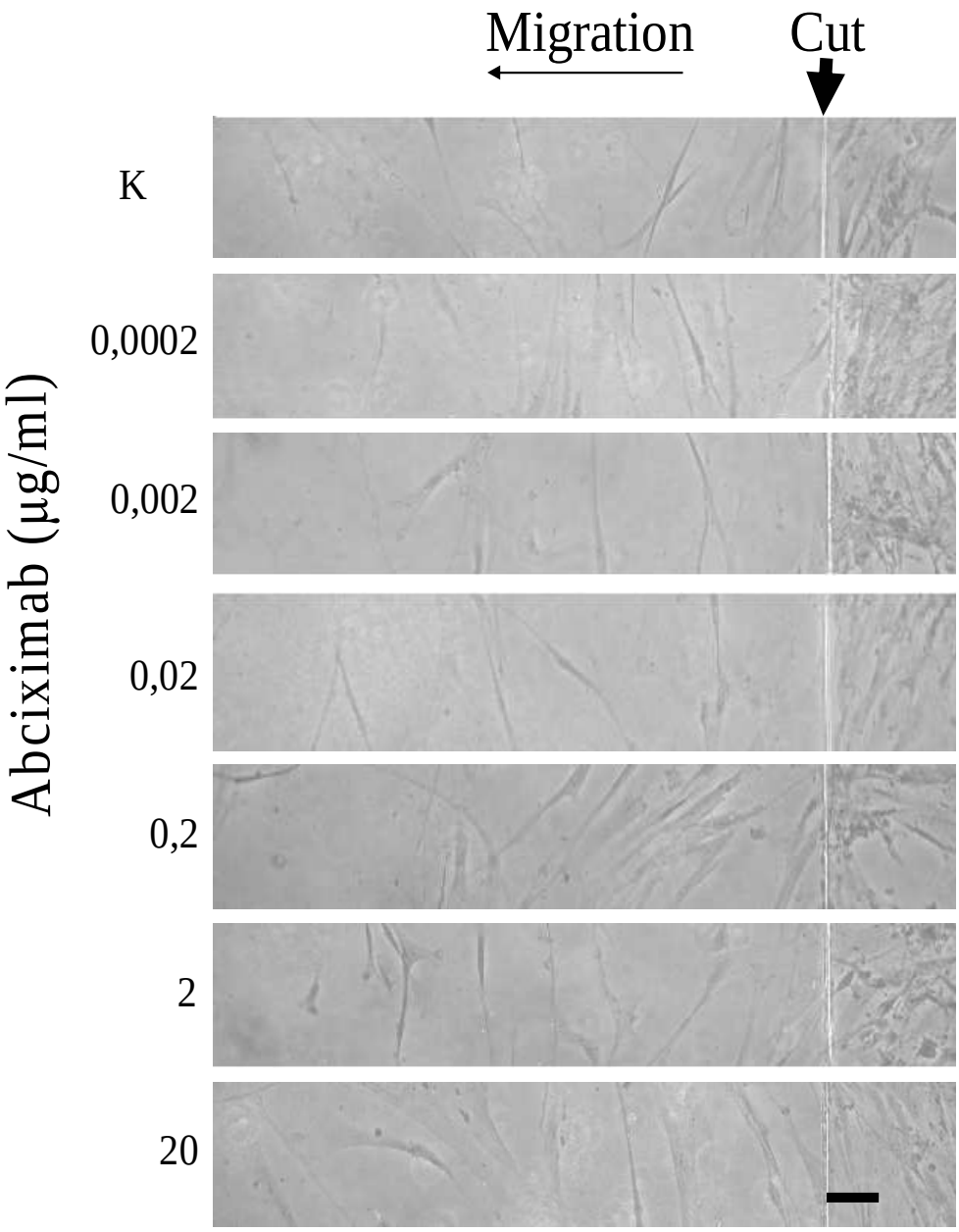


Abb.16: Darstellung der migrierten HCMSMC nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zur Kontrole (K). Balken : 100 µm

3. Effekte von Abciximab auf die Proliferation

3.1. HCMSMC

(vgl. Abb.17 und Tab.10)

Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte am Zellcounter. Wir konnten die Proliferation bzw. die Proliferationsinhibition der mit Abciximab behandelten HCMSMC prozentual anteilig (x %) zur Proliferation der unbehandelten Kontrollen (100 %) aus den 3 Versuchen die Mittelwerte berechnen. Im folgenden Text sind nun die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die Proliferation signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p jeweils wiedergegeben.

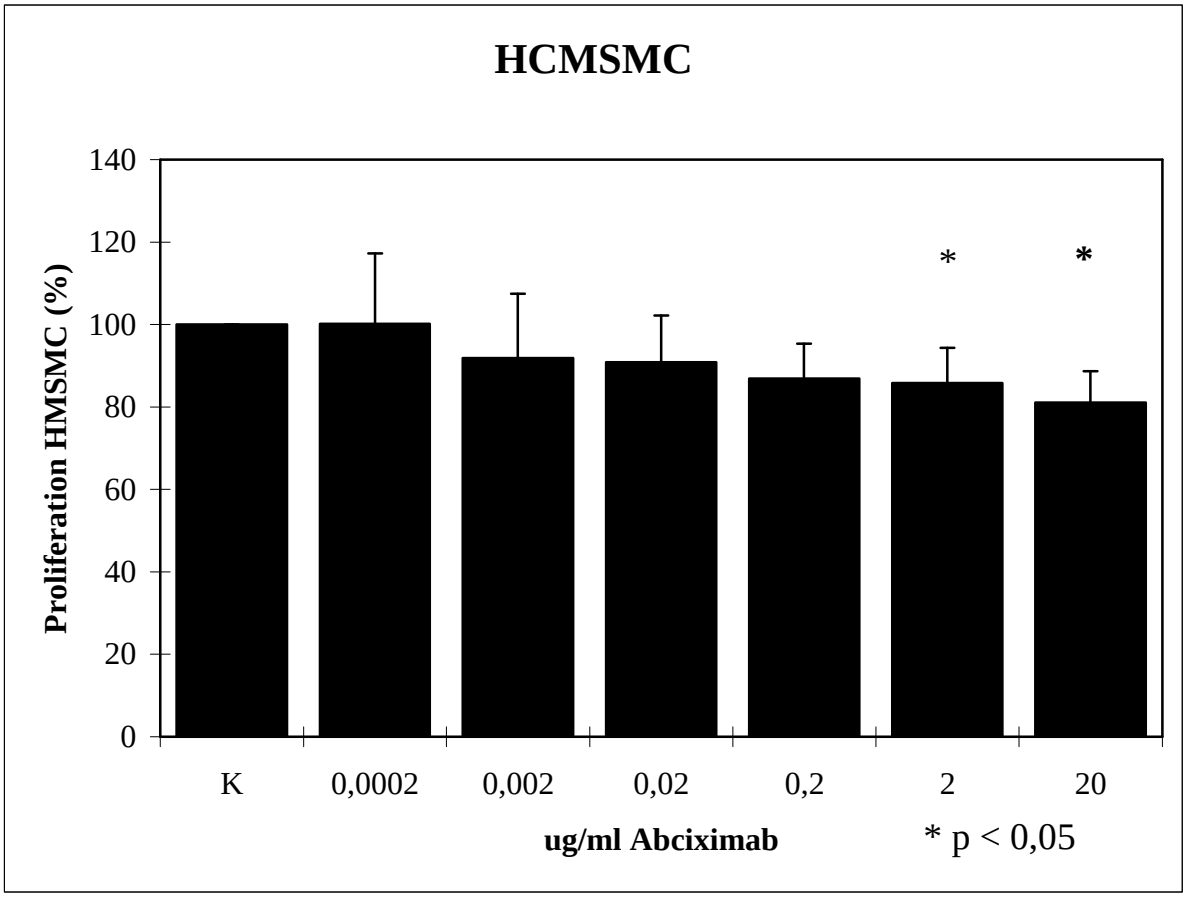


Abb.17: Proliferation bei **HCMSMC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle (K). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

Die Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Bei einer Konzentration von 0,0002 µg/ml Abciximab betrug der Meanwert 100,18 % ± 17,10 %. Diese leichte Zunahme der Proliferation ergab im paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Wurden die HCMSMC mit 0,002 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Mittelwert auf 91,86 % ± 15,64 % (n.s.). In der nächst höheren Konzentration, also 0,02 µg/ml Abciximab lag der Mittelwert bei 90,85 % ± 11,33 % (n.s.). Bei 0,2 µg/ml Abciximab sank der Mittelwert weiter auf 86,90 % ± 8,43 % (n.s.). Die letzten beiden Konzentrationen ergaben jedoch signifikante Ergebnisse im Bezug auf die Proliferationshemmung durch Abciximab. So betrug der Mittelwert bei 2 µg/ml Abciximab 85,79 %± 8,56 % mit einem Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ und bei 20 µg/ml Abciximab sank der Mittelwert sogar auf 81,09 % ± 7,59 %. Irrtumswahrscheinlichkeit p war ebenfalls < 0,05.

Tab.10: Proliferation bei **HCMSMC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle (K). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Proliferation (%)	p
K	100 ± 0	----------
0,0002 µg/ml Abciximab	100,18 ± 17,10	nicht signifikant
0,002 µg/ml Abciximab	91,86 ± 15,64	nicht signifikant
0,02 µg/ml Abciximab	90,85 ± 11,33	nicht signifikant
0,2 µg/ml Abciximab	86,90 ± 8,43	nicht signifikant
2 µg/ml Abciximab	85,79 ± 8,56	< 0.05
20 µg/ml Abciximab	81,09 ± 7,59	< 0.05

3.2. HUVEC

(vgl. Abb.18 und Tab.11)

Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte am Zellcounter. Die Proliferation bzw. die Proliferationsinhibition der mit Abciximab behandelten Zellen prozentual anteilig (x %) zur Proliferation der unbehandelten Kontrollen (100 %) konnten aus 3 Versuchen die Mittelwerte berechnet werden. Im folgenden Text sind nun die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die Proliferation signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p jeweils wiedergegeben.

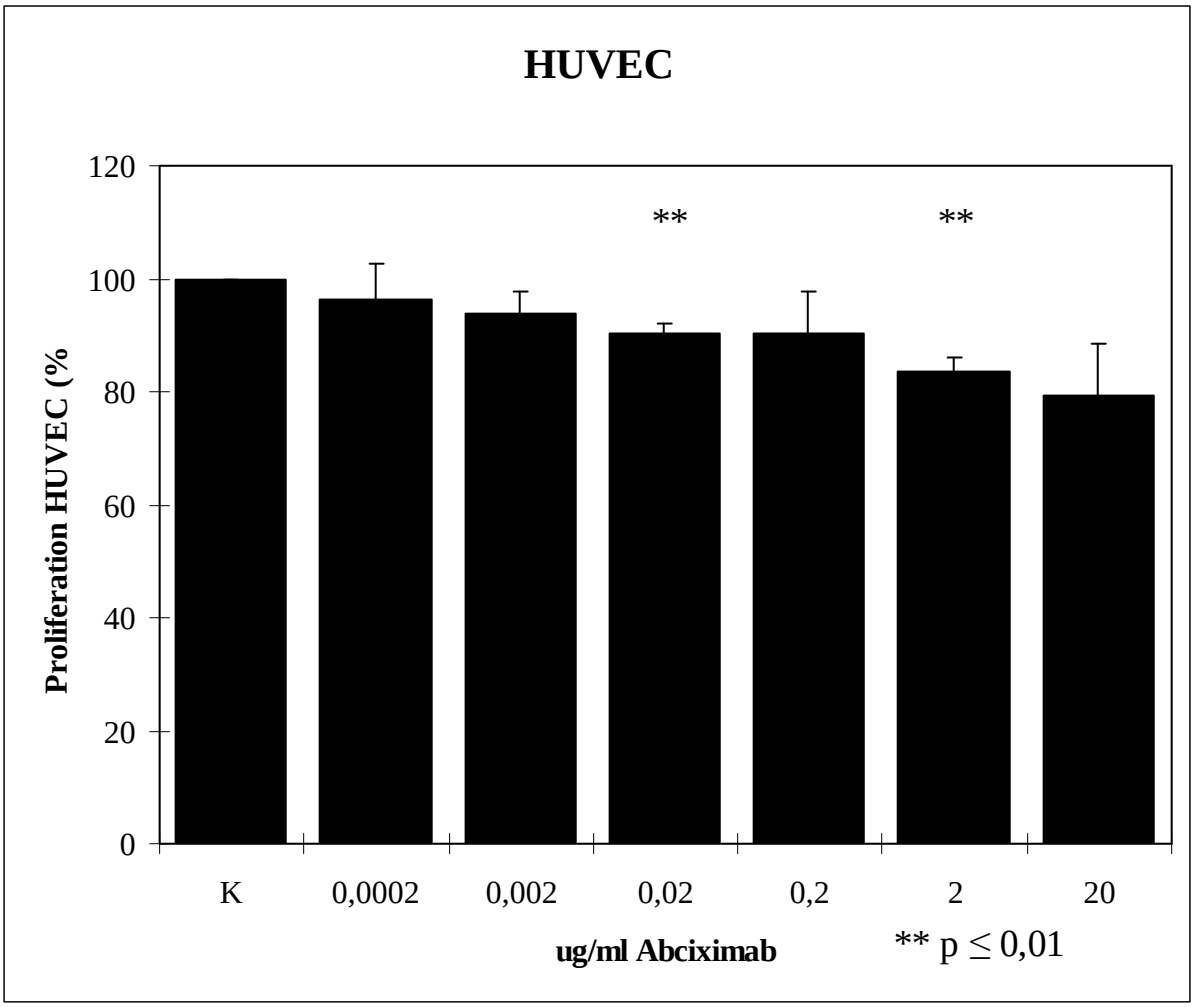


Abb.18: Proliferation bei **HUVEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zurKontrolle. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

Gegenüber der Kontrolle sank bei Inkubation von 0,0002 µg/ml Abciximab der Mittelwert auf 96,41 % ± 6,16 %. Diese leichte Abnahme der Proliferation ergab im paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Wurden die HCMSMC mit 0,002 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Mittelwert weiter auf 93,77 % ± 3,88 % (n.s.). In der nächst höheren Konzentration, also 0,02 µg/ml Abciximab lag der Mittelwert bei 90,19 % ± 1,77 % p = 0.01. Bei 0,2 µg/ml Abciximab lag der Mittelwert bei 90,37 % ± 7,38 % (n.s.). Der Mittelwert bei 2 µg/ml Abciximab betrug 83,47 % ± 2,51 %. Mit einem Irrtumswahrscheinlichkeit p < 0,01 lag ein signifikantes Ergebnis vor. Bei der Konzentration 20 µg/ml Abciximab sank der Mittelwert sogar auf 79,34 % ± 9,16 % (n.s.).

Tab.11: Proliferation bei **HUVEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zurKontrolle. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Proliferation (%)	p
K	100 ± 0	----------
0,0002 µg/ml Abciximab	96,41 ± 6,16	nicht signifikant
0,002 µg/ml Abciximab	93,77 ± 3,88	nicht signifikant
0,02 µg/ml Abciximab	90,19 ± 1,77	= 0.01
0,2 µg/ml Abciximab	90,37 ± 7,38	nicht signifikant
2 µg/ml Abciximab	83,47 ± 2,51	< 0.01
20 µg/ml Abciximab	79,34 ± 9,16	nicht signifikant

3.3. HCAEC

(vgl. Abb.19 und Tab.12)

Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte am Zellcounter. Aus den 3 Versuchen konnten wir die Proliferation bzw. die Proliferationsinhibition der mit Abciximab behandelten Zellen prozentual anteilig (x %) zur Proliferation der unbehandelten Kontrollen (100 %) die Mittelwerte berechnen. Im folgenden Text sind nun die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Mit einem paired-t-test wurde die statistische Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse untersucht. Ob Abciximab die Proliferation signifikant hemmt, wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p jeweils wiedergegeben.

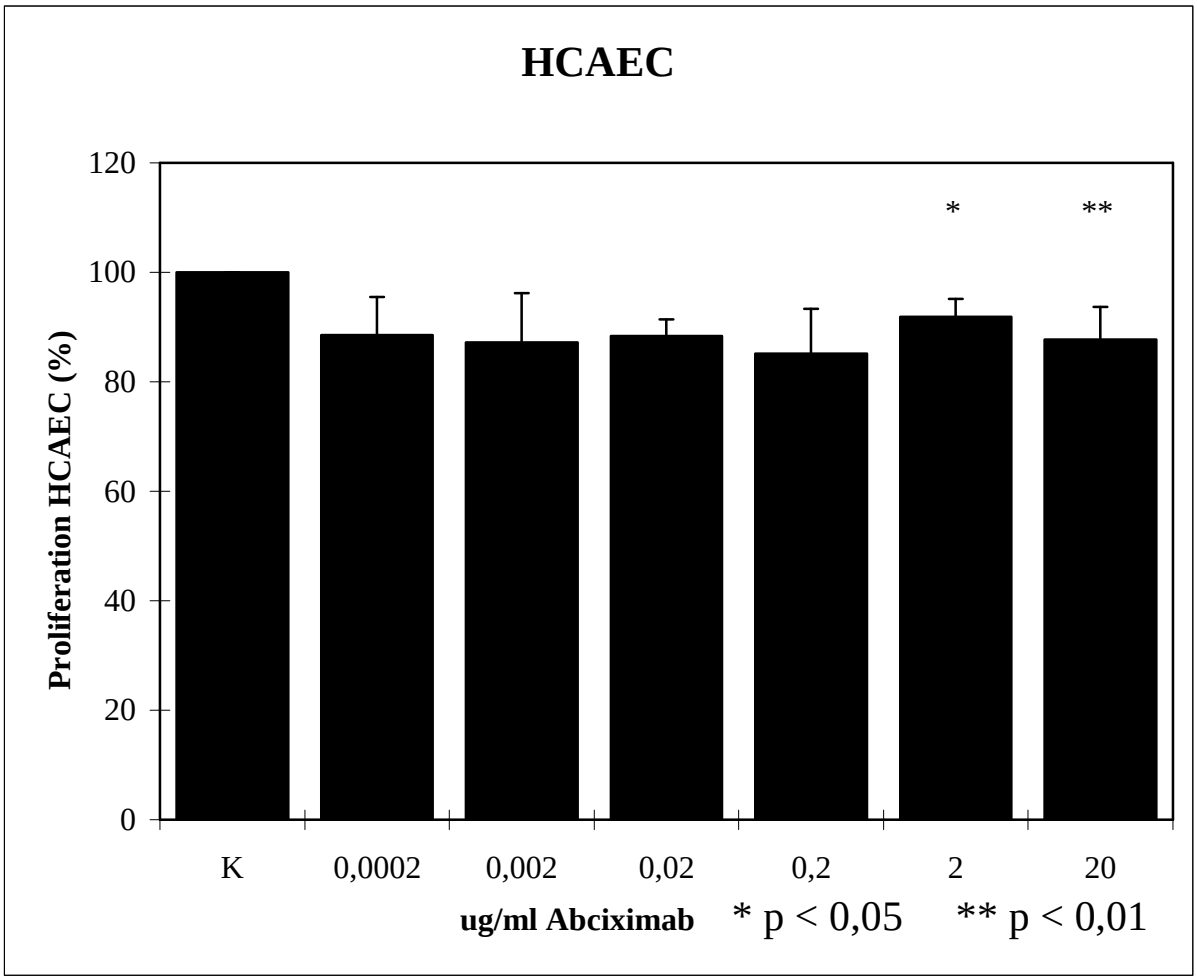


Abb.19: Proliferation bei **HCAEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zurKontrolle. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

Gegenüber der Kontrolle sank bei einer Konzentration von 0,0002 µg/ml Abciximab der Mittelwert 88,5 % ± 7,20 %. Diese Proliferationabnahme ergab im paired-t-test ein nicht signifikantes Ergebnis (n.s.). Wurden die HCAEC mit 0,002 µg/ml Abciximab inkubiert, sank der Mittelwert auf 87,17 % ± 9,02 % (n.s.). In der nächst höheren Konzentration, also 0,02 µg/ml Abciximab lag der Mittelwert bei 88,35 % ± 3,04 % (n.s.). Bei 0,2 µg/ml Abciximab sank der Mittelwert weiter auf 85,09 % ± 8,27 % (n.s.). Die letzten beiden Konzentrationen ergaben jedoch signifikante Ergebnisse im Bezug auf die Proliferationshemmung durch Abciximab. So betrug der Mittelwert bei 2 µg/ml Abciximab 91,87 % ± 3,25 % mit einem Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ und bei 20 µg/ml Abciximab sank der Mittelwert auf 87,70 % ± 6,01 % und einem Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$.

Tab.12: Proliferation bei **HCAEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich zurKontrolle. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen angegeben.

	Proliferation (%)	p
K	100 ± 0	----------
0,0002 µg/ml Abciximab	88,5 ± 7,2	nicht signifikant
0,002 µg/ml Abciximab	87,17 ± 9,02	nicht signifikant
0,02 µg/ml Abciximab	88,35 ± 3,04	nicht signifikant
0,2 µg/ml Abciximab	85,09 ± 8,27	nicht signifikant
2 µg/ml Abciximab	91,87 ± 3,25	< 0.05
20 µg/ml Abciximab	87,70 ± 6,01	< 0.01

3.4. Proliferation der HCMSMC, HUVEC und HCAEC nach Inkubation mit Abciximab im Vergleich

(vgl. Abb.20 und Tab.13)

Bei allen 3 Zellarten ließ sich eine signifikante Hemmung der Proliferation nach Inkubation mit Abciximab nachweisen. Bei den HCMSMC konnte man eine statistisch signifikante Proliferationsinhibition mit knapp unter 15 % in der Konzentration 2 µg/ml ($p < 0,05$) und eine Inhibition von etwa 19 % bei 20 µg/ml Abciximab ($p < 0,05$) erreichen. Bei den HUVEC ergab sich eine signifikante Hemmung von knapp 10 % in der Konzentration 0,02 µg/ml Abciximab mit $p = 0,01$. Eine Inhibition von knapp über 16 % stellte man in der Konzentration 2 µg/ml Abciximab mit einem $p < 0,01$ fest. Die Konzentration 20 µg/ml erreichte zwar eine Proliferationsinhibition von über 20 %, war aber nicht signifikant. Die HCAEC reagierten zwar in den niedrigeren Konzentrationen höhere Inhibitionsraten im Vergleich zu den HCMSMC und HUVEC, aber die signifikanten Ergebnisse lieferten erst höhere Applikationen des Abciximab. Sie zeigten eine geringere Hemmung als die beiden anderen Zellarten. So betrug bei 2 µg/ml die Inhibition nur knapp 8% ($p < 0,05$) und bei 20 µg/ml nur knapp über 12 % ($p < 0,01$).

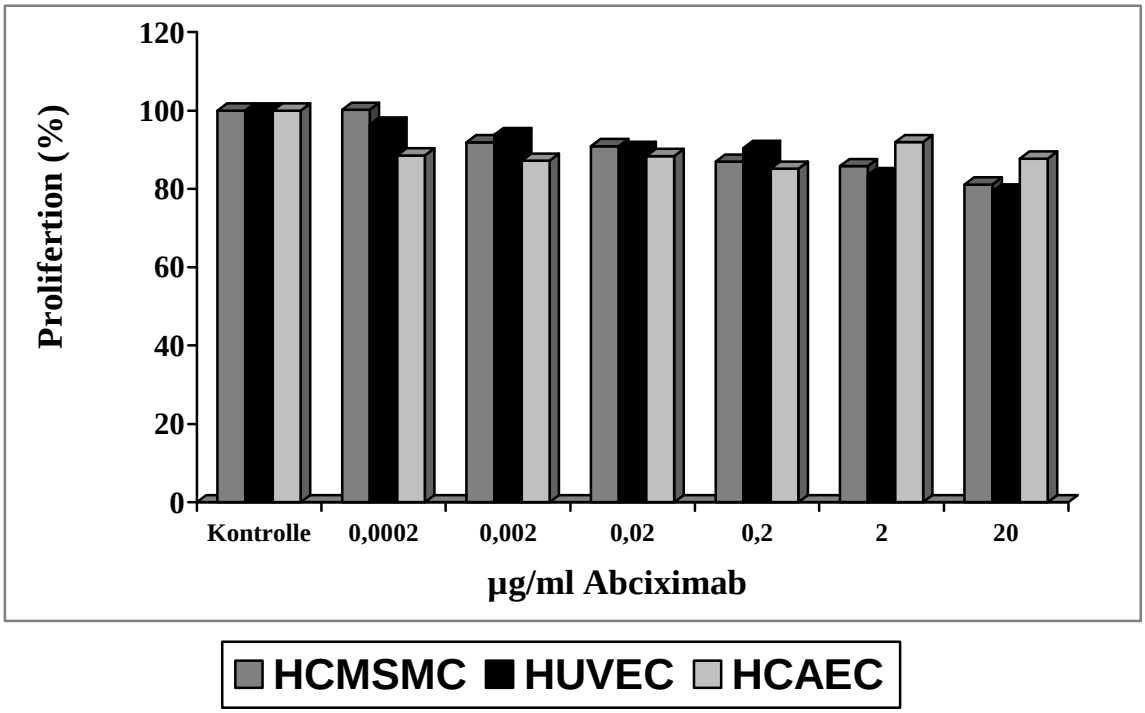


Abb.20: Proliferation von **HCMSMC, HUVEC** und **HCAEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich. Dunkelgrau: HCMSMC, schwarz: HUVEC, hellgrau: HCAEC.

Tab.13: Proliferation von **HCMSMC, HUVEC** und **HCAEC** dargestellt in Prozent nach Inkubation mit Abciximab (20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml) im Vergleich. Es sind jeweils die Mittelwerte von 3 Versuchen angegeben. Außerdem angegeben die Irrtumswahrscheinlichkeit p als Signifikanz der Ergebnisse (n.s. = nicht signifikant).

	Kontrolle	**Abciximab 0,0002 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,002 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,02 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 0,2 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 2 µg/ml** TNF-α 20ng/ml	**Abciximab 20 µg/ml** TNF-α 20ng/ml
HCMSMC Mittel-wert(%)	100	100,18 ± 17,10	91,86 ± 15,64	90,85 ± 11,33	86,90 ± 8,43	85,79 ± 8,56	81,09 ± 7,59
p		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	< 0,05	< 0,05
HUVEC Mittel-wert(%)	100	96,41 ± 6,16	93,77 ± 3,88	90,19 ± 1,77	90,37 ± 7,38	83,47 ± 2,51	79,34 ± 9,16
p		n.s.	n.s.	= 0,01	n.s.	< 0,01	n.s.
HCAEC Mittel-wert(%)	100	88,5 ± 7,20	87,17 ± 9,02	88,35 ± 3,04	85,09 ± 8,27	91,87 ± 3,25	87,70 ± 6,01
p		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	< 0,05	< 0,01

4. Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Abciximab

4.1. HCMSMC

(vgl. Abb.21 und Tab.14)

Mit Hilfe des CellTiter-Glo^{TM} wurde die Relative light units (RLU) gemessen und so konnte die Vitalität der HCMSMC bestimmt werden. In Tab.14 sind in einer Übersicht, die Vitalitäten in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Abciximab und in Abb.21 in einem Diagramm dargestellt.

Die Kontrolle ohne Abciximab wurde als Vitalität = 100 % gesetzt. Gab man Abciximab der Konzentration 0,0002 µg/ml dazu, sank der Wert auf 86,94 % ± 10,53 %, bei 0,002 µg/ml Abciximab auf 86,51 % ± 15,4 %, bei 0,02 µg/ml Abciximab auf 96,64 % ± 12,85 %, bei 0,2 µg/ml auf 82,5 % ± 12,87 %, bei 2 µg/ml Abciximab auf 97,49 % ± 6,37 % und bei 20 µg/ml Abciximab auf 89,82 % ± 8,57 %.

Tab.14: Vitalität der **HCMSMC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

	Kontrolle	**Abciximab 0,0002 µg/ml**	**Abciximab 0,002 µg/ml**	**Abciximab 0,02 µg/ml**	**Abciximab 0,2 µg/ml**	**Abciximab 2 µg/ml**	**Abciximab 20 µg/ml**
Vitalität (%)	100	86,94 ± 10,53	86,51 ± 15,4	96,64 ± 12,85	82,5 ±12,87	97,49 ± 6,37	89,82 ±8,57

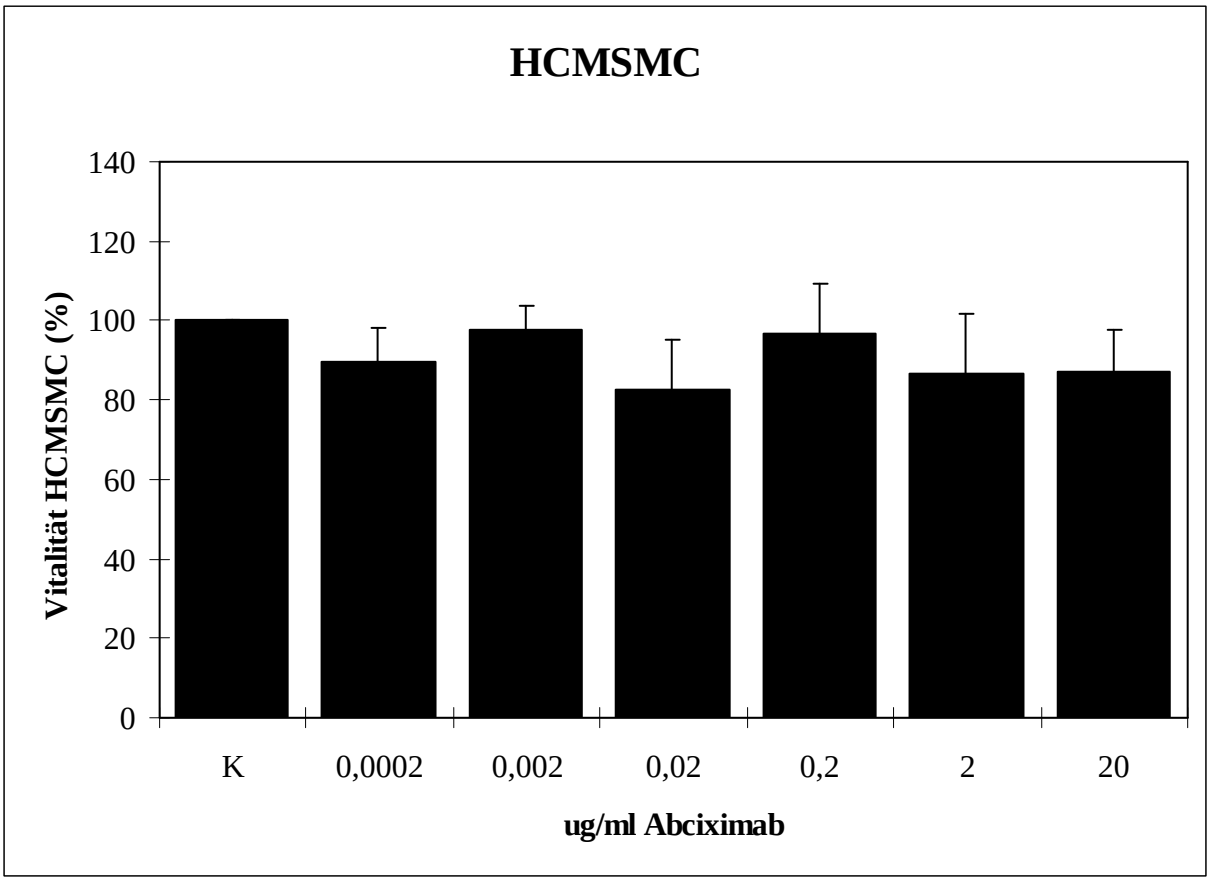


Abb.21: Vitalität der **HCMSMC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

4.2. HUVEC

(vgl. Abb.22 und Tab.15)

Mit Hilfe des CellTiter-Glo^{TM} wurde die Relative light units (RLU) gemessen und so konnte die Vitalität der HUVEC bestimmt werden. In Tab.15 sind in einer Übersicht, die Vitalitäten in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Abciximab und in Abb.22 in einem Diagramm dargestellt.

Bei allen Versuchen lag die Vitalität der HUVEC über 100 %. Die Kontrolle ohne Abciximab wurde als Vitalität = 100 % gesetzt. Gab man Abciximab der Konzentration 0,0002 µg/ml dazu, stieg der Wert auf 106,83 % ± 10,93 %, bei 0,002 µg/ml Abciximab auf 117,57 % ± 6,93 %, bei 0,02 µg/ml Abciximab auf 112,3 % ± 4,99 %, bei 0,2 µg/ml auf 108,43 % ± 6,38 %, bei 2 µg/ml Abciximab auf 111,31 % ± 3,6 % und bei 20 µg/ml Abciximab auf 111,36 % ± 15,46 %.

Tab.15: Vitalität der **HUVEC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

	Kontrolle	**Abciximab 0,0002 µg/ml**	**Abciximab 0,002 µg/ml**	**Abciximab 0,02 µg/ml**	**Abciximab 0,2 µg/ml**	**Abciximab 2 µg/ml**	**Abciximab 20 µg/ml**
Vitalität (%)	100	106,83 ± 10,93	117,57 ± 6,93	112,3 ± 4,99	108,43 ± 6,38	111,31 ± 3,6	111,36 ± 15,46

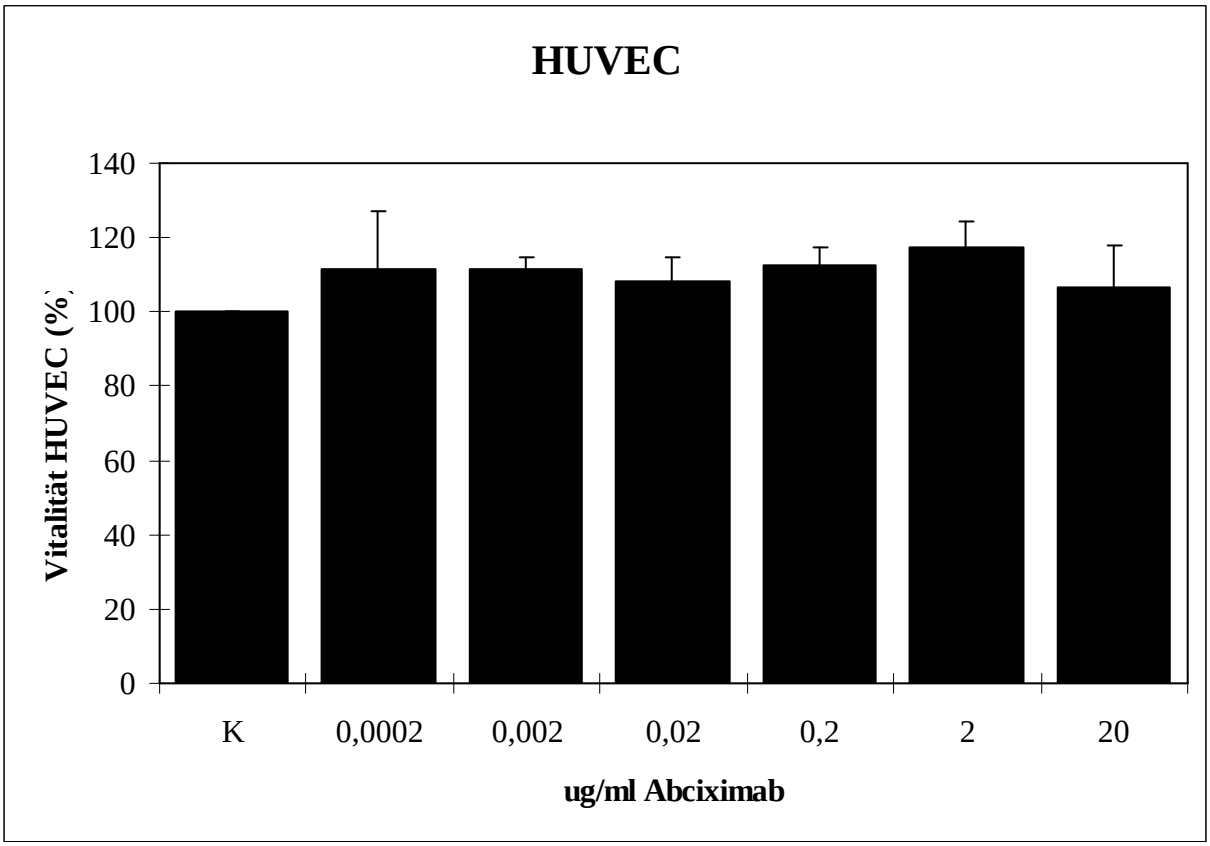


Abb.22: Vitalität der **HUVEC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

4.3. HCAEC

(vgl. Abb.23 und Tab.16)

Mit Hilfe des CellTiter-Glo™ wurde die Relative light units (RLU) gemessen und so konnte die Vitalität der HCAEC bestimmt werden. In Tab.16 sind in einer Übersicht, die Vitalitäten in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Abciximab und in Abb.23 in einem Diagramm dargestellt.

Bei allen Versuchen lag die Vitalität der HCAEC ebenfalls über 100 %. Die Kontrolle ohne Abciximab wurde als Vitalität = 100 % gesetzt. Gab man Abciximab der Konzentration 0,0002 µg/ml dazu, stieg der Wert auf 113,38 % ± 4,67 %, bei 0,002 µg/ml Abciximab auf 117,24 % ± 16,99 %, bei 0,02 µg/ml Abciximab auf 105,99 % ± 7,36 %, bei 0,2 µg/ml auf 112,68 % ± 12,12 %, bei 2 µg/ml Abciximab auf 109,15 % ± 5,2 % und bei 20 µg/ml Abciximab auf 106,7 % ± 4,82 %.

Tab.16: Vitalität der **HCAEC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

	Kontrolle	**Abciximab 0,0002 µg/ml**	**Abciximab 0,002 µg/ml**	**Abciximab 0,02 µg/ml**	**Abciximab 0,2 µg/ml**	**Abciximab 2 µg/ml**	**Abciximab 20 µg/ml**
Vitalität (%)	100	113,38 ± 4,67	117,24 ± 16,99	105,99 ± 7,36	112,68 ± 12,12	109,15 ± 5,2	106,7 ± 4,82

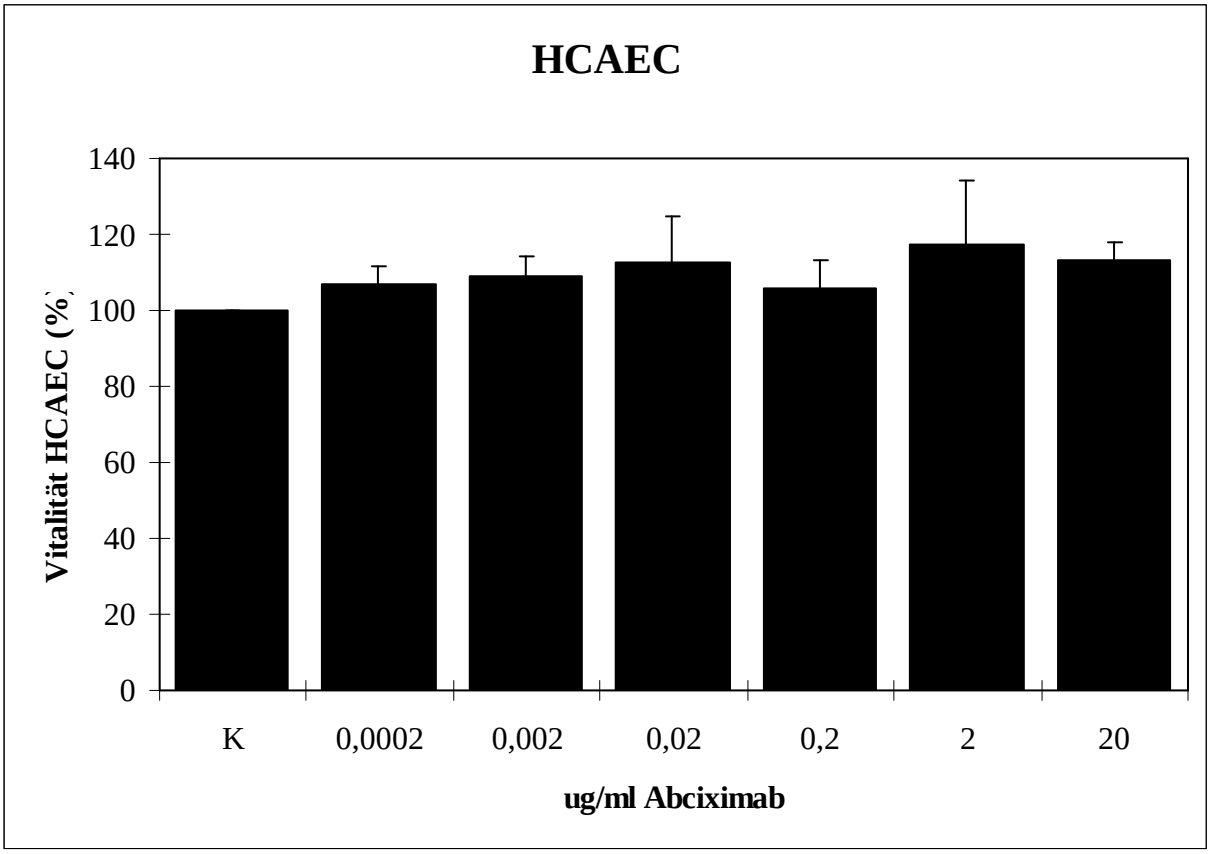


Abb.23: Vitalität der **HCAEC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

4.4. Vitalität der HCMSMC, HUVEC und HCAEC im Vergleich

(vgl. Abb.24)

Während die Vitalität der HUVEC und der HCAEC stets über 100 % lag und sich kein Zusammenhang zwischen zugegebener Menge an Abciximab und Zunahme des Anteils toter Zellen feststellen ließ, zeigte sich bei den HCMSMC eine Abnahme des Anteils lebendiger Zellen, welche sich aber auch nicht konzentrationsabhängig beschreiben ließ. So lag die geringste Vitalität mit nur 82,5 % bei der Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab. Die höchste Vitalität der HCMSMC lag bei der Konzentration 2 µg/ml mit einem Prozentsatz von 97,49 % vor.

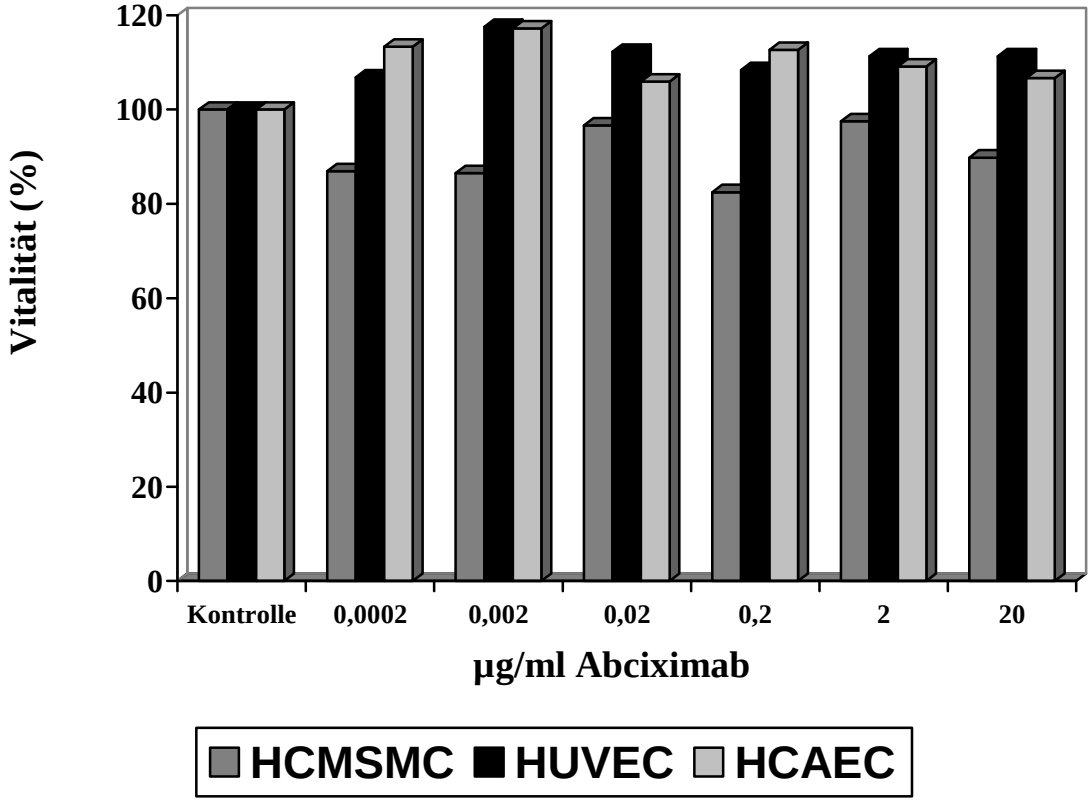


Abb.24: Vitalität der **HCMSMC, HUVEC** und **HCAEC** in Prozent (Kontrolle, 0,0002 µg/ml Abciximab, 0,002 µg/ml Abciximab, 0,02 µg/ml Abciximab, 0,2 µg/ml Abciximab, 2 µg/ml Abciximab und 20 µg/ml Abciximab)im Vergleich.
Dunkelgrau: HCMSMC, schwarz: HUVEC, hellgrau: HCAEC.

E. Diskussion

Die aktuelle Arbeit (52-54) soll der Erforschung der Effekte von Abciximab auf Kernprozesse der Restenose dienen. Überraschenderweise zeigten die Studien ISAR-SWEET- (30) und CADILLAC (44), dass Abciximab zu einer Verringerung der Restenoserate nach Koronarangioplastien führte. In früheren Placebo-Kontrollierten Versuchen von Abciximab der Koronarintervention konnte gezeigt werden, dass die GP IIb/IIIa-Blockade im EPIC Versuch (24) zu einer Verringerung der „target vessel revascularization“ (TVR) nach Ballon-Angioplastien bei Patienten ohne Diabetes führte. Weiterhin zeigte die Studie EPILOG (23), dass die GP IIb/IIIa-Blockade keinen Einfluss auf die TVR bei Patienten ohne Diabetes nach Ballon-Angioplasten hat. In den Studien EPISTENT (25, 27) und ADMIRAL (31) dagegen konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der TVR und Restenose bei Patienten mit Diabetes nur nach den Stents auftrat. Darüber hinaus wurde in den ISAR-SMART-2 Versuchen (17) deutlich, dass es keinen Unterschied in der Restenose nach Angioplastie und Stenteinlage bei den Patienten gab, die mit Abciximab oder Placebo behandelt wurden.

8. Effekt von Abciximab bei der Restenoseentstehung

Die Idee, Abciximab als Medikament bei Restenosen nach Koronarangioplastien einzusetzen, beruht auf der Tatsache, dass durch Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten neben einer Hemmung der Thrombozytenaggregation, ein Effekt auf Entzündungsprozesse der Restenose auftreten könnte. Obwohl seit einem Jahrzehnt bekannt ist, dass Abciximab akuten ischämischen Komplikationen bei perkutaner transluminaler koronar Angioplastie (PTCA) und Atherektomie (15) vorbeugt, zeigten Kastrati et al. (21) in der ISAR-REACT-Studie keine klinisch messbare Veränderung durch Abciximab. In der ISAR-REACT-Studie zeigte sich bei Patienten, die während den ersten 30 Tage bei einer perkutanen koronaren Intervention mit einer hohen Dosis von Clopidogrel und zusätzlich Abciximab vorbehandelt wurden, kein Unterschied im Vergleich zu Clopidogrel allein. Deswegen ist ein zusätzlicher Nutzen von Abciximab bei hohen Dosen von Clopidogrel in den akuten koronaren Interventionen bei Patienten mit niedrigem und mittelgradigem Risiko äußerst fraglich. Die signifikante Verringerung der angiographischen Restenose in ISAR-SWEET (30) und in CADILLAC- Studie (44) wirft die Frage auf, ob Abciximab unabhängig von Clopidogrel Intima-Hyperplasie unterdrückt. Zwei mögliche Mechanismusänsätze schließen anti-entzündliche Effekte mit ICAM-1 auf Leukozyten (32) und antiproliferative Effekte der VCAM-1 Rezeptoren auf Thrombozyten und glatten Muskelzellen (45) ein. Zahlreiche

Zytokine, wie z.B. TNF-α spielen dabei eine Rolle (14). Charo et al. (8) waren die ersten, die Adhäsionsproteine spezifizierten.

In Kulturen von humanen koronaren Endothelzellen und glatten Muskelzellen konnte beobachtet werden, dass die Expression von ICAM-1 in hohem Maße durch TNF- α reguliert wird (48). Inoue et al. (20) zeigten, dass direkt im Anschluss an Angioplastien der Serumspiegel von ICAM-1 und P-Selektin in den koronaren Blutproben signifikant erhöht waren. Restenose ist im Wesentlichen durch Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und die Produktion von extrazellulärer Matrix charakterisiert. Voisard et al. (49) zeigte in einem humanen Transfilter Co-Kultur Modell mit HCAEC und HCMSMC, dass nach TNF-α stimulierter Expression von Adhäsionmolekülen und Zugabe von Monozyten und $CD4^+$-Lymphozyten die reaktive HCMSMC- Proliferation deutlich gesteigert wurde.

9. Grundlagen über Abciximab

Die GP IIb/IIIa Rezeptor Antagonisten vertreten eine Familie der Plättchen-Medikamte, die klinisch zur Verhinderung der pathologischen Thrombose (26) eingesetzt werden. Abciximab, gehört in dieser Reihe der Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten zu den ersten genehmigten Medikamt (11), welche ein genetisch hergestelltes Fab Fragment eines monoklonalen Antikörpers besitzt. Durch die Bindung der Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten an den GP IIb/IIIa-Rezeptor wird verhindert, dass Fibrinogen sich an diesen Rezeptor binden kann. Somit wird unabhängig vom Aktivierungsreiz der Thrombozyten die Thrombozytenaggregation gehemmt. Die bisherigen GP IIb/IIIa-Antagonisten werden intravenös mit initialem Bolus und anschließender Dauerinfusion verabreicht. Seit Jahren wird bei perkutaner Koronarintervention (PTCA), Stentimplantation und Atherektomie bei Hochrisiko-Patienten zur Vermeidung ischämischer Komplikationen, sowie bei instabilen Angina pectoris, non-Q-wave-Infarkten Abciximab in Kombination mit Heparin und Aspirin eingesetzt. Aufgrund der überraschenden Ergebnisse in den ISAR-SWEET- (30) und CADILLAC- Studien (44), die von einer signifikanten Reduktion der Restenoserate durch Abciximab berichten, sind von großem Interesse. Die Gefäßwandentzündungen spielen eine entscheidende Rolle im Bereich der Restenose. Vor kurzem Kereiakes zeigte, dass die pharmakologische Intervention mit Abciximab ein „maßgebliche therapeutische Ziel“ darstellen könnte (22).

10. Effekt von Abciximab auf die TNF-α induzierte ICAM-1-Expression von HCMSMC, HUVEC und HCAEC

Die gegenwärtige Studie zeigt, dass Abciximab in den Konzentrationen von 0.0002 µg/ml - 20 µg/ml keinen Effekt auf die ICAM-1-Expression von HUVEC, HCAEC und HCMSMC hat. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Massberg et al. (28), die in ihrer Studie mit 20 Patienten mit Stenteinlage zeigten, dass thrombozyten-vermittelte ICAM-1 Expression von Endothelzellen durch Abciximab nicht signifikant beeinflusst werden konnte. Allerdings berichten Schwarz et al. (39), dass Abciximab in vitro die Adhäsion von Monozyten an ICAM-1 signifikant hemmt. Obwohl in der vorliegenden Studie ein Effekt von Abciximab auf die ICAM-1-Expression an HUVEC, HCAEC und HCMSMC ausgeschlossen wurde, ist gleichzeitig ein Effekt von Abciximab auf Monozyten nicht auszuschließen und sollte in weiteren Studien bestätigt werden.

11. Effekt von Abciximab auf die Migration von HCMSMC

In dem von uns verwendeten Modell der Migration können nur direkte Effekte aufgezeigt werden. Indirekte Effekte wie die Migrationshemmung durch Thrombin können aufgrund der Abwesenheit von Thrombin im System (51), nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Tatsache, dass für Abciximab nach systemischer Applikation (1) der maximale Plasmaspiegel mit 0.175 µg/ml angegeben wird, ergibt sich kein hemmender Effekt von Abciximab auf die Migration, wie sie in den Experimenten (10, 11, 29, 33, 40, 42, 46) und klinischen Studien (25, 27, 30, 31, 44) beschrieben werden. Unsere Ergebnisse sind widersprüchlich zu denen von Blindt et al. (4, 5), die eine signifikante Hemmung der Migration nach Verabreichen von Abciximab in einer Konzentration von 0.33 µg/ml beschreiben. Zellspezifische Unterschiede können ausgeschlossen werden, da die Gruppe von Blindt et al. ebenfalls humane koronare glatte Muskelzellen benutzte. Die gegensätzlichen Resultate können teilweise durch die Tatsache erklärt werden, dass Blindt et al. Abciximab 24 h vor und während der Migration verabreichten. In der gegenwärtigen Studie wurde Abciximab nur während des Migrationsprozesses verabreicht, wie es auch bei Applikation beim Patienten der Fall ist. Auf eine Verabreichung vor dem Migrationsprozess wurde verzichtet.

12. Effekt von Abciximab auf die Proliferation von HCMSMC, HUVEC und HCAEC

Systemische Behandlung mit GP IIb/IIIa-Antagonisten wie Abciximab verringern die Intima-Hyperplasie nach Verletzung der Karotiden bei Ratten (40), der Karotiden bei Kaninchen (9),

der Karotiden bei Hamstern (29), der Koronargefäße von Schweinen (42), der Karotiden und Femoral- (33) und Iliakal – Arterien von Kaninchen (46, 10). Es ist schwierig, die den Anti-Restenose-Effekten zugrundeliegenden Mechanismen in diesen Studien zu ergründen. Stouffer et al. zeigten. (43), dass die β3 Integrin- Expression in Gefäßwandzellen nach Verletzung erhöht ist und dass Abciximab an kultivierten SMCs mit hoher Affinität bindet. Außerdem konnte die Gruppe von Stouffer et al. (43) beobachten, dass die β3- Aktivierung für die Alphathrombin induzierte Zellproliferation wichtig ist. In der vorliegenden Studie zeigte Abciximab in den Konzentrationen 0.0002 µg/ml - 20 µg/ml keine Hemmung der Proliferation. Darüberhinaus wurde ein kleiner aber signifikanter antiproliferativer Effekt in den Konzentrationen von 2 µg/ml und von 20 µg/ml Abciximab beobachtet. Dieser Effekt zeigt sich jedoch erst bei einer SI/MPL-Ratio > 1. Ein antiproliferativer Effekt von Abciximab auf humane koronare Gefäßwandzellen ist bereits von der Gruppe von Blindt et al. beschrieben worden. (4, 5). Den geringen aber signifikanten antiproliferativen Effekt in vitro von Abciximab erreichte man nur mit SI/MPL-Ratio- Werten von 11.4 und von 114, welche 11.4 und 114-fach über der maximalen Konzentration in vivo liegt (MPL 0.175 µg/ml). Wie schon für die direkten Effekte der Migrationshemmung beschrieben, kann der direkte antiproliferative Effekt von Abciximab in den Experimenten (10, 11, 29, 33, 40, 42, 46) und klinischen Studien (25, 27, 30, 31, 44) nicht bestätigt werden. Der geringe aber signifikante antiproliferative Effekt von Abciximab könnte jedoch mittels lokaler Hochdosis-Applikation, z.B. durch beschichtete Stents ausgenutzt werden.

13. Effekt von Abciximab auf die Vitalität von HCMSMC, HUVEC und HCAEC

Gleichzeitig mit der Untersuchung zur Zellproliferation wurde in dieser Arbeit die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit Abciximab bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde mittels der Luciferase- Reaktion untersucht. In der Literatur wurde bisher noch nichts über die Wirkung von Abciximab auf die Überlebensrate einzelner Zellen berichtet. Während die Vitalität der HUVEC und der HCAEC stets über 100 % lag und sich kein Zusammenhang zwischen zugegebener Menge an Abciximab und Zunahme des Anteils toter Zellen feststellen ließ, zeigte sich bei den HCMSMC eine Abnahme des Anteils lebendiger Zellen, welche sich aber nicht konzentrationsabhängig beschreiben ließ. So lag die geringste Vitalität mit nur 82,5 % bei der Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab. Die höchste Vitalität der HCMSMC lag bei der Konzentration 2 µg/ml mit einem Prozentsatz von 97,49 % vor. Insgesamt war die Vitalität unverändert im Vergleich zu den Kontrollen.

14. Bedeutung von Abciximab bei der Verhinderung von Restenosen

Die klinische Bedeutung der Daten wird durch die sogenannte SI/MPL-Ratio (50) gekennzeichnet, welche die Korrelation zwischen einem signifikanten hemmenden in-vitro Effekt (SI) und dem maximalen Plasmaspiegel (MPL) von Abciximab in vivo angibt. In humanen venösen und koronaren Endothelzellen (HUVEC und HCAEC) und humanen koronaren glatten Muskelzellen (HCMSMC) konnte die Expression von ICAM-1 und die Migration der HCMSMC durch Abciximab in den Konzentration von 0.0002 µg/ml - 20 µg/ml nicht beeinflusst werden. Ein geringer aber signifikanter antiproliferativer Effekt konnte durch die Inkubation der Zellen mit Abciximab in Konzentrationen, die das Zehnfache der MPL-Konzentrationen betrugen, erreicht werden. Allerdings lässt sich aus der SI/MPL-Ratio mit einem Wert über 1 darauf schließen, dass dieser Effekt nur mittels lokaler Hochdosis-Applikation z.B. bei beschichteten Stents und nicht nach systemischer Applikation in vivo reproduziert werden kann. Hong et al. (19) zeigten neulich, dass eine Beschichtung von Stents mit Abciximab möglich ist. Ob der geringe antiproliferative Effekt von Abciximab an die hervorragenden Ergebnisse der anderen DES anschließen kann, ist sehr fraglich.

F. Zusammenfassung

Aufgrund der überraschenden Ergebnisse der **I**ntracoronary **S**tenting and **A**ntithrombotic **R**egimen - **S**uperior **W**ay to **E**liminate **E**levated **T**hrombotic Risk (ISAR-SWEET) - und **C**ontrolled **A**bciximab and **D**evice **I**nvestigation to **L**ower **L**ate **A**ngioplasty **C**omplications (CADILLAC) - Studien, stellte sich die Frage, ob Abciximab Effekte auf Kernprozesse der Restenose ausüben kann. In der Frühphase der Restenosen- Entstehung spielt die Expression des interzellulären Adhäsions- Moleküls-1 (ICAM-1) eine wichtige Rolle. Die vorliegende Studie untersucht die ICAM-1-Expression nach Abciximab-Inkubation (0.0002 µg/ml - 20 µg/ml) und anschließender tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)-Stimulation (20 ng/ml) an kultivierten an humanen glatten Muskelzellen der koronaren Media-Gefäßwand (HCMSMC), humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) sowie an humanen koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) im Durchflusszytometer. Es konnte kein Effekt von Abciximab auf die Expression von ICAM-1 an HCMSMC, HUVEC und HCAEC gezeigt werden. Obwohl in der vorliegenden Studie ein Effekt von Abciximab auf die ICAM-1-Expression an HUVEC, HCAEC und HCMSMC ausgeschlossen wurde, ist gleichzeitig ein Effekt von Abciximab auf Monozyten nicht auszuschließen und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen stellt den Kernprozeß der Restenose- Entwicklung dar. In dem von uns verwendeten Modell der Migration nach Bürk können nur direkte anti- migratorische Effekte aufgezeigt werden. Indirekte Effekte wie die Migrationshemmung durch Thrombin können aufgrund der Abwesenheit von Thrombin im System nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass für Abciximab nach systemischer Applikation der maximale Plasmaspiegel mit 0.175 µg/ml angegeben wird, ergibt sich kein hemmender Effekt von Abciximab (0.0002 µg/ml - 20 µg/ml) auf die Migration von glatten Muskelzellen. Unsere Ergebnisse sind im Widerspruch zu Bericht von Blindt et al., die über eine signifikante Hemmung der Migration nach Verabreichen von Abciximab in einer Konzentration von 0.33 µg/ml berichten. Zellspezifische Unterschiede können ausgeschlossen werden, da die Gruppe von Blindt et al. ebenfalls humane koronare glatte Muskelzellen benutzte. Die gegensätzlichen Resultate können teilweise durch die Tatsache erklärt werden, dass Blindt et al. Abciximab 24 h vor und während der Migration verabreichten. In der gegenwärtigen

Studie wurde Abciximab nur während des Migrationsprozesses verabreicht, wie es auch bei Applikation beim Patienten der Fall ist.

Für die Proliferationstests wurden die Zellen 6 Tage kultiviert und 5 Tage mit Abciximab in den Konzentrationen 0,0002 µg/ml - 20 µg/ml inkubiert. Die Proliferation der HCMSMC, HUVEC und HCAEC wurde mit dem Zellcounter gemessen. In dieser Arbeit zeigte sich eine geringe aber signifikante Inhibition der Proliferation von HCMSMC, HUVEC und HCAEC. Diese erfolgt jedoch erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml, welche 10-fach über der maximalen Konzentration in vivo liegt. Somit errechnet sich eine **s**ignificant **i**nhibitory effects in vitro/**m**aximal **p**lasma **l**evels in vivo (SI/MPL-Ratio = 10). Eine Ausnutzung des antiproliferativen Effektes von Abciximab kann somit nur mittels lokaler Hochdosis-Applikation, z.B. durch beschichtete Stents, erfolgen.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Vitalität der Zellen bestimmt, die mit (0,0002 µg/ml – 20 µg/ml) Abciximab behandelt wurden. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Luciferase Reaktion untersucht. Während bei den HUVEC und HCAEC die Vitalität stets über 100 % lag, zeigte sich bei den HCMSMC eine Abnahme des Anteils lebendiger Zellen, welche jedoch nicht konzentrationsabhängig war. So trat die geringste Vitalität (82,5 %) bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml Abciximab auf. Die höchste Vitalität der HCMSMC lag bei einer Konzentration von 2 µg/ml mit einem Prozentsatz von 97,49 % vor. Insgesamt war die Vitalität unverändert im Vergleich zu den Kontrollen.

Inwieweit sich der geringe, aber signifikante antiproliferative Effekt von Abciximab, günstig auf die Restenose- Rate auswirkt, muss noch weiter untersucht werden. Die SI/MPL-Ratio mit einem Wert über 1 läßt jedoch darauf schließen, dass dieser Effekt nur mittels lokaler Hochdosis-Applikation z.B. bei beschichteten Stents und nicht nach systemischer Applikation in vivo reproduziert werden kann. Ob der geringe antiproliferative Effekt von Abciximab an die hervorragenden Ergebnisse der anderen **d**rug-**e**luting **s**tents (DES) anschließen kann, ist fraglich.

G. Literaturverzeichnis

1. Abernety DR, Pezullo J, Mascelli MA, Frederick B, Kleiman NS, Freedman J. Pharmacodynamics of abciximab during angioplasty: comparison to healthy subjects. Clin Pharmcol Ther 71:186-195 (2002)

2. 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 85:554-564 (1992)

3. Biondi-Zoccai GG, Agostoni P, Abbate A, Testa L, Burzotta F, Lotrionte M, Crea F, Biasucci LM, Vetrovec GW, Colombo A. Adjusted indirect comparison of intercoronary drug-eluting stents: evidence from a metaanalysis of randomized bare-metal-stent-cotrolled trials. Int J Cardiol 100:119-123 (2005)

4. Blindt R, Bosserhoff AK, Zeiffer U, Krott N, Hanrath P, vom Dahl J. Abciximab inhibits the migration and invasion potential of human artery smooth muscle cells. J Mol Cell Cardiol 32:2195-2206 (2000)

5. Blindt R, Bosserhoff AK, Krott N, Vogt F, Hanrath P, Demircan L, vom Dahl J. Decrease of vascular smooth muscle cell locomotion by abciximab, but not tirofiban: a possible role of different affinity to alpha v beta 3 integrins. Coron Artery Dis 13:357-364 (2002)

6. Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, Xu Z, Koshelnick Y, Lipp J, De Martin R, Losert U, Lammer J, Binder BR. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. Circulation 105:633-638 (2002)

7. Bürk RR. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. Proc Natl Acad Sci USA 70:369-372 (1973)

8. Charo IF, Bekeart LS,Phillips DR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa-like proteins mediate endothelial cell attachment to adhesive proteins and the extracellular matrix. J Biol Chem 262:9935-9938 (1987)

9. Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, Ryan US. Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking αvβ3 integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA. J Vasc Surg 19:125-134 (1994)

10. Coleman KR, Braden GA, Willingham MC, Sane DC. Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (αvβ3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesteremic rabbits. Circ Res 84:1268-1276 (1999)

11. Coller BS. Platelet GP IIb/IIIa antagonists: first-integrin receptor therapeutics. J Clin Investig 100:S57-S60 (1997)

12. Conde ID, Kleiman NS. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics. Catheter Cardiovasc Interv 60:236-246 (2003)

13. Dartsch PC, Voisard R, Betz E. In vitro growth characteristics of human atherosclerotic plaque cells: comparison of cells from primary stenosing and restenosing lesions of peripheral and coronary arteries. Res Exp Med 190:77-87 (1990)

14. Donners MM, Daemen MJ, Cleutjens KB, Heeneman S. Inflammation and restenosis: Implications for therapy. Ann Med 35:523-531 (2003)

15. EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high risc coronary angioplasty. N Engl J Med 330:956-961 (1994)

16. Hamm HM. Ein Prescreening - Modell für potentiell antimigratorisch wirksame Substanzen: Anwendungen für lokale Behandlungsstrategien zur Inhibition der

Restenoseentwicklung nach koronarer Angioplastie. Dissertation aus der medizinischen Fakultät der Universität Ulm (1996)

17. Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Pache J, Dotzer F, Glatthor C, Siebert S, Dirschinger J, Schömig A, ISAR-SMART-2 Investigators. A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries. J Intern Med 256:388-397 (2004)

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

19. Hong YJ, Jeong MH, Kim W, Lim SY, Lee SH, Hong SN, Kim JH, Ahn YK, Cho JG, Park JC, Cho DL, Kim H, Kang JC. Am J Cardiol 94:1050-1054 (2004)

20. Inoue T, Hoshis K, Yaguchi I, Iwasaki Y, Takayanagi K, Morooka S. Serum levels of circulating adhesion molecules after coronary angioplasty. Cardiology 91:236-242 (1999)

21. Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dirschinger J, Dotzer F, ten Berg JM, Neumann FJ, Bollwein H, Volmer C, Gawaz M, Berger PB, Schömig A; Intracoronary stenting and antithrombotic regimen-rapid early action for coronary treatment study investigators. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidrogrel. N Engl J Med 350:277-280 (2004)

22. Kereiakes DJ. Inflammation as a therapeutic target. a unique role of abciximab. Am Heart J 146:1-4 (2003)

23. Kleiman NS, Lincoff AM, Kereiakes DJ, Miller DP, Aquirre FV, Anderson KM, Weisman HF, Califf RM, Topol EJ. Diabetes mellitus, glycoprotein IIb/IIIa blockade, and heparin evidence for a complex interaction in a multicenter trial. EPILOG investigators. Circulation 97:1912-1920 (1998)

24. Lincoff AM, Califf RM, Anderson KM, Weisman HF, Aguirre FV, Kleiman NS, Harrington RA, Topol EJ. Evidence for prevention of death and myocardial infarction with platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab (c7E3 Fab) among patients with unstable angina undergoing percutaneous coronary revascularization. EPIC Investigators. Evaluation of 7E3 in preventing ischemic complications. J Am Coll Cardiol 30:149-156 (1997)

25. Lincoff AM, Califf RM, Moliterno DJ, Ellis SG, Ducas J, Kramer JH, Kleiman NS, Cohen EA, Booth JE, Sapp SK, Cabot CF, Topol EJ. Complementary clinical benefits of coronary-artery stenting and blockade of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. Evaluation of platelet IIb/IIIa inhibition in stenting investigators. N Engl J Med 341:319-327 (1999)

26. Majerus PW and Tollefsen DM. Anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet drugs. In: Goodman & Gilman`s The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG eds), McGraw-Hill Book Company, New York, 1519-1538 (2001)

27. Marso SP, Lincoff AM, Ellis SG, Bhatt DL, Tanguay JF, Kleiman NS, Hammoud T, Booth JE, Sapp SK, Topol EJ. Optimizing the percutaneous interventional outcomes for patients with diabetes mellitus: results of EPISTENT (Evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting trial) diabetes substudy. Circulation 100:2477-2484 (1999)

28. Massberg S, Mueller I, Besta F, Thomas P, Gawaz M, Effects of 2 different antiplatelet regimes with abciximab or tirofiban on platelet function in patients undergoing coronary stenting. Am Heart J 146:E19 (2003)

29. Matsuno H, Stassen JM, Vermylen J, Deckmyn H. Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing paptide prevents neointimal formation. Circulation 90:2203-2206 (1994)

30. Mehilli J, Kastrati A, Schuhlen H, Dibra A, Dotzer F, von Beckerath N, Bollwein H, Pache J, Dirschinger J, Berger PP, Schömig A; Intracoronary stenting and

antithrombotic regimen: Is abciximab a superior way to elimunate elevated thrombotic risk in diabetes (ISAR-SWEET) study Investigators. Circulation 14:3627-3635 (2004)

31. Montalescot G, Barragan P, Wittenberg O, Ecollan P, Elhadad S, Villain P, Boulenc JM, Morice MC, Maillard L, Pansieri M, Coussat R, Pinton P; ADMIRAL investigators. Abciximab before direct angioplasty and stenting in myocardial infarction regarding acute and long-term follow up. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction. N Engl J Med 344:1895-1903 (2001)

32. Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leucocyte interaction and surface expression of leucocyte integrin MAC-1 in acute myocardial infarcation. J Am Coll Cardiol 34:1420-1426 (1999)

33. Nichols TC, du Laney T, Zheng B, Bellinger DA, Nickols GA, Engleman W, Clemmons DR. Reduction in atherosclerotic lesion size in pigs by αvβ3 inhibtors is associated with inhibition of insulin-like growth factor-1-mediated signaling. Circ Res 85:1040-1045 (1999)

34. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GP IIb/IIIa: the responsive integrin. Cell 65:359-362 (1991)

35. Plow EF, D´Souza SE. A role for intercellular adhesion molecule-1 in resteosis. Circulation 95:1355-1356 (1997)

36. Schofer J, Schluter M. Coronary restenosis after implantation of drug-eluting stents. Minerva Cardioangiol 53:43-48 (2005)

37. Schwartz RS, Holmes DR Jr, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. J Am Coll Cardiol 20:1284-1293 (1992)

38. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. J Am Coll Cardiol 44:1373-1385 (2004)

39. Schwarz M, Nordt T, Bode C, Peter K. The GP IIb/IIIa inhibitor abciximab (c7E3) inhibits the binding of various ligands to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, alphaMbeta2). Throm Res 107:121-128 (2002)

40. Slepian MJ, Massia SP, Dehdashti B, Fritz A, Whitesell L. β3-integrin rather than β1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. Circulation 97:1818-1827 (1998)

41. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. Nature 346:425-434 (1990)

42. Srivatsa SS, Fitzpatrick LA, Tsao PW, Reilly TM, Holmes DR Jr, Schwartz RS, Mousa SA. Selective αvβ3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin αvβ3 and osteopontin expression during neointimal formation. Cardiovasc Res 36:408-428 (1997)

43. Stouffer GA, Zhaoyong Hu, Sajid M, Husong Li, Guifang J, Nakada MT, Hanson SR, Runge MS. β3 Integrins are upregulated after vascular injury and modelate thrombosponding- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. Circulation 97:907-915 (1998)

44. Stuckey TD, Stone GW, Cox DA, Tcheng JE, Garcia E, Carroll J, Guagliumi G, Rutherford BD, Griffin JJ, Turco M, Lansky AJ, Mehran R, Fahy M, Brodie BR, Grines CL; CADILLAC investigators. Impact of stenting and abciximab in patients with diabetes mellitus undergoing primary angioplasty in acute myocardial infarction (the CADILLAC trial). Am J Cardiol 95:1-7 (2005)

45. Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT. Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinty and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. Circulation 98:1085-1091 (1998)

46. Van der Zee R, Murohara T, Passeri J, Kearney M, Cheresh DA,Isner JM. Reduced intimal tickening following αvβ3 blockade is associated with smooth muscle cell apoptosis. Cell Adhes Commun 6:371-379 (1998)

47. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues H, Höher M, Hombach V. A prescreening system for potential antiproliferative agents: implications for local treatment strategies of postangioplasty restenosis. Int J Cardiol 51:15-28 (1995)

48. Voisard R, Oßwald M, Baur R, Jakob U, Susa M, Mattfeldt, Hemmer W, Hannekum A, Koenig W, Hombach V. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in human coronary endothelial and smooth muscle cells after stimulation with tumar necrosis factor-α. Coron Artery Dis 9:737-745 (1998)

49. Voisard R, Voglic S, Baur R, Susa M, Koenig W, Hombach V. Leukocyte attack in a 3D human coronary in-vitro model. Coron Artery Dis 12:401-411 (2001)

50. Voisard R, Baur R, Herter T, Hombach V. Two decades failing systemic restenosis trials: Impact of the SI/MPL-ratio to characterize the clinical relevance of positive in vitro data. Perfusion 17:186-197 (2004)

51. 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 vivo approach for characterizing the antiproliferative potential of each individual compound. Int J Cardiol: in press, available on 25 September 2004

52. Voisard R, Alan M, von Müller L, Baur R, Hombach V. Der Effekt von Abciximab auf Kernprozesse der Restenoseentstehung. (Abstract) Z. Kardiol 94 (Suppl 1) V 1479 (2005)

53. Voisard R, Alan M, von Müller L, Baur R, Hombach V. Der Effekt von Abciximab auf Kernprozesse der Restenoseentstehung. Perfusion 18:69 (2005)

54. Voisard R, Alan M, von Müller L, Baur R, Hombach V. Effects of abciximab on key pattern of human coronary restenosis in vitro: Impact of the SI/MPL-ratio. Manuskript eingereicht.

55. Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, Rogers C. Leukocyte recruitment and expression of chemkines following different forms of vascular injury. Vasc Med 8:1-7 (2003)

H. Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Rainer Voisard für die freundliche Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung während meiner Zeit als Doktorand in der Abteilung Innere II.
Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Vinzenz Hombach für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herzlichen Dank Frau Regine Baur für die Hilfsbereitschaft und Geduld in Bezug auf labortechnische Fragen, sowie die tatkräftige Unterstützung, die den reibungslosen Ablauf der Arbeit ermöglichte.
Großer Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Labors Voisard.

Vielen Dank Herrn Dr. Lutz von Müller für die große Hilfe und Geduld bei der Zytoflow-Auswertung meiner Ergebnisse.

Vielen Dank meiner Familie für die große Unterstützung.
Vielen Dank an meine Verlobte Sonnur Yilmaz, die mir beratend und motivierend zur Seite gestanden ist.
Und vielen Dank auch an meine Freunde.

I. Lebenslauf

Name:	Mustafa Alan
Geburtsdatum:	01.02.1979
Geburtsort:	Ulm
Eltern:	Ali Alan, Reifenmonteur
	Halise Alan, geb. Büyükpolat
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung	
1984-1988	Grundschule Hans-Multscher-Schule (Ulm)
1989-1998	Schubart-Gymnasium-Ulm
1998	Abitur

1999	Freiwilliges Soziales Jahr beim Internationalen Bund Ulm

Studium:	
April 2000- 2002	Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
seit April 2002	an der Universität Ulm

April 2002	Ärztliche Vorprüfung
April 2003	Erstes Staatsexamen
April 2005	Zweites Staatsexamen
04/05 –03/06	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Ulm
	mit Wahlfach Psychiatrie
April 2006	Drittes Staatsexamen

Famulaturen:	Kardiologie Universitätsklinikum Ulm
	Sonographie Universitätsklinikum Ulm
	Notfallambulanz Universitätsklinikum Ulm
	Infektiologie Universitätsklinikum Ulm
	Radiologie Universitätsklinikum Ulm