

Abteilung Innere Medizin II  
( Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. V.Hombach )

**MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK**  
**der**  
**UNIVERSITÄT ULM**

**Der Effekt von  $\gamma$ -Bestrahlung auf die ICAM-1 Expression bei  
humanen koronaren Gefäßwandzellen**

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

vorgelegt von

**Dirk Wiegmann**  
aus Ludwigshafen am Rhein

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andrik Aschoff

Tag der Promotion: 20.Juli 2006

*Meinen Eltern*

---

## Inhaltverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.0	Grundlagen der interventionellen Kardiologie	1
1.1	Grundlagen der Brachytherapie zur Verringerung der Restenoserate	1
1.2	Grundlagen der Restenoseentwicklung und des Kanteneffekt Phänomens	2
1.3	Grundlagen der Pathophysiologie des Restenosemechanismus	3
1.4	Ziele dieser Arbeit	4
<b>B</b>	<b>Material</b>	<b>5</b>
1.1	Zellkultur	5
1.2	Zellmedien	5
1.3	Zellkulturreagenzien	6
2.0	Applikation der $\gamma$ -Strahlung	7
3.0	Zellstimulierung	7
4.0	RNA Isolierung	7
5.0	RNA Konzentrationsbestimmung	8
6.0	Agarose-Gel	8
7.0	Northern Blot	9
8.0	DNA Labeling	10
9.0	Hybridisieren	10
10.0	Entwicklung	11
11.0	Geräte	11
12.0	Gefäße und Glaswaren	13
<b>C</b>	<b>Methoden</b>	<b>15</b>
1.0	Zellkultivierung	15
2.0	Applikation der $\gamma$ - Strahlung	16
3.0	Zellstimulierung	16
4.0	RNA Isolierung	16
5.0	RNA Konzentrationsbestimmung	17
6.0	Agarose-Gel	17
7.0	Northern Blot	18
8.0	DNA Labeling	19
9.0	Hybridisierung	19

---

10.0	Entwicklung	19
11.0	Quantitative Auswertung	20
12.0	Statistische Auswertung	20
<b>D</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
1.0	Northernblot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei glatte Muskelzellen der humanen koronaren Media (HCMSMC)	21
2.0	Northernblot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei glatte Muskelzellen der humanen koronaren Media (HUVEC)	24
3.0	Northernblot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei glatte Muskelzellen der humanen koronaren Media (HCAEC)	27
<b>E</b>	<b>Diskussion</b>	<b>30</b>
1.0	Anwendung der Brachytherapie im klinischen Modell	30
2.0	Mögliche Ursachen des Kanteneffektes	30
3.0	In vitro Modell zur Aufdeckung der Ursachen des Kanteneffektes	31
4.0	Auswirkungen der Brachytherapie im Tiermodell	31
5.0	Funktion und Bedeutung von Endothelzellen bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen	33
6.0	Funktion und Bedeutung von ICAM-1 bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen	34
7.0	Funktion und Bedeutung von glatten Muskelzellen bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen	35
8.0	Beobachtung der Expression von Oberflächenmolekülen nach Bestrahlung und Stimulierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten	36
9.0	Zusammenfassende Beurteilung der ICAM-1 Expression nach Radiatio als Ursache einer Atherosklerose- und Kantenstenosen- Bildung	38
<b>F</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>42</b>
<b>H</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>54</b>
<b>I</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>55</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
EC	Endothelzellen
ECL	Enhanced chemoluminescence
EBM	Endothelial Basal Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM	Endothelial Growth Medium
EtBr	Ethidiumbromid
fcs	Fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HCAEC	Human coronary artery endothelial cell
HCMSMC	Human coronary media smooth muscle cell
hEGF	Human Endothelial Growth factor
hFGF	Human fibroblast Growth Factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
MOPS	(3-(N-Morpholio)propanesulfonic acid)
n.s.	Nicht signifikant
NSB	Northern sample buffer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS <sup>-</sup>	Phosphat buffer saline
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangiographie
R <sup>3</sup> -IGF	Recombinant analog of insulin-like growth factor-1
RNA	Ribonucleinsäure
sd	Standardabweichung
SDS	Natriumdodylsulfat
SmBM	Smooth muscle cell Basal Medium
SmGM	Smooth muscle cell Growth Medium
SSC	Sodium salt citrate

---

TNF- $\alpha$	Tumor Necrose Factor- $\alpha$
TNS	Trypsin Neutralizing solution
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
x	Mittelwert

---

## A. Einleitung

### 1.0 Grundlagen der interventionellen Kardiologie

Herz-Kreislaufkrankungen zählen in der Bundesrepublik Deutschland und anderen westlichen Industrienationen zu den häufigsten Erkrankungen. Ein überwiegender Anteil dieser Erkrankungen wird durch die Atherosklerose der Gefäße verursacht, welche typische Langzeitfolgeerscheinungen wie Apoplexie und Myokardinfarkt nach sich ziehen können. Mit der perkutanen transluminalen Koronarangiographie (PTCA) steht eine elegante Methode zur Verfügung, koronare Erkrankungen zu diagnostizieren und gegebenenfalls zu therapieren. Seit der ersten erfolgreichen Ballonkatheterdilatation einer koronaren Stenose durch Grüntzig et al. (35) im Jahre 1977 erfreut sich diese Methode einer stetig steigenden Beliebtheit und einer kontinuierlichen Verfeinerung der angewandten Technik. So wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2001 laut Angabe der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 611 882 diagnostische Herzkatheter durchgeführt und dabei insgesamt 195 280 Koronarinterventionen vorgenommen (48).

Dieses Behandlungsverfahren zur Dilatation koronarer Verschlüsse oder koronarer Engstellen ist jedoch durch das häufige Auftreten von klinisch und angiographisch bedeutsamen Rezidivstenosen nach primär erfolgreicher Intervention limitiert. So wird nach durchgeführter PTCA mit Ballondilatation eine Restenoserate zwischen 30 % und 50 % beobachtet (63). Eine effektive Methode zur Verringerung dieser hohen Wiederverschlussrate konnte durch den Einsatz von Stents erzielt werden. Durch den Gebrauch von Stents konnte die Reokklusionrate im Vergleich zur einfachen Ballondilatation bedeutend gesenkt werden (29, 71). Diverse pharmakologische Ansätze (31) oder Verfahren wie die Excimer-Laser Angioplastie oder auch die directionale Atherektomie konnten den gewünschten Erfolg einer weiteren Reduktion der Restenoserate nicht aufweisen (93). Vielversprechender war dabei das Konzept und die Technik der Brachytherapie.

### 1.1 Grundlagen der Brachytherapie zur Verringerung der Restenoserate

Nach erfolgreicher Erprobung im Tiermodell konnte die Wirksamkeit der Brachytherapie zur Senkung der Restenoserate (88, 90) sowohl durch die Anwendung von  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Strahlung bewiesen werden (43, 89). Beide Strahlenarten haben den Nachweis der Reduktion von



---

Rezidivstenosen erbracht und stellen derzeit ein Verfahren der interventionellen Kardiologie dar, mit welchem die Restenoserate gesenkt werden kann. Über die optimale Strahlendosis wird derzeit kontrovers diskutiert, wobei diese Studie dabei helfen soll, den Effekt von unterschiedlich hohen Strahlendosen auf Endothel- und glatte Muskelzellen zu untersuchen. In einer Dosisfindungsstudie konnte bei relativ hohen Strahlendosen (18 Gy) eine niedrigere Restenoserate im Vergleich zu relativ niedrigen Strahlendosen (8 Gy) gefunden werden (85). Dabei sollten für die äußere Gefäßwand 8 Gy und für die innere Gefäßwand 30 Gy angewandt werden. Es existieren verschiedene Arten der Strahlenapplikation. Eine Möglichkeit stellt die Applikation der Strahlendosis extrakorporal über einen Linearbeschleuniger dar. Andere Techniken bestehen darin die Strahlung endovaskulär zu applizieren oder einen radioaktiven Stent im Gefäßlumen zu platzieren. Crocker et al. haben diese verschiedenen Optionen der Strahlenapplikation in einer Übersichtsarbeit dargestellt (21).

## **1.2 Grundlagen der Restenoseentwicklung und des Kanteneffekt Phänomens**

Obwohl sich die vaskuläre Brachytherapie in einigen Zentren zum Standard für die Behandlung von Patienten mit In-Stent Restenosen entwickelt hat (43, 81, 86, 89), wird diese Technik durch das Auftreten von Kantenstenosen limitiert. Nach Bestrahlung traten neue Läsionen an den proximalen und distalen Enden der bestrahlten Fläche auf (45, 47). Als Ursache dieser Restenoseentwicklung wird eine Kombination aus Verletzung der Gefäßwand und Strahlendosisabfall vermutet. Um das Auftreten des Kanteneffektes zu umgehen wird von mehreren Autoren die Ausdehnung der bestrahlten Fläche gefordert (18, 72). Durch die Ausweitung der bestrahlten Fläche kommt es jedoch zwangsläufig zu einer Bestrahlung von normalem unverletztem Gewebe. Über die Auswirkungen einer Bestrahlung von unverletzten Koronarien ist noch sehr wenig bekannt. Ein Teilaspekt der Folgen soll im vorliegenden in vitro Modell aufgeklärt werden, welches ein vereinfachtes Modell der in vivo Situation von unverletztem Gewebe darstellt. In einem Fallbericht beschreiben Baweja et al. die Entwicklung einer neuen und signifikanten Stenose weit proximal, in zuvor völlig unauffällig erschienenem koronarem Gefäßsegment, nachdem sehr weit distal eine In-Stent Stenose bestrahlt wurde (6). Dieser neue Fallbericht zeigt die zwingende Notwendigkeit die Folgen einer Bestrahlung von unverletzten Gefäßwandzellen weiter aufzuklären.

### 1.3 Grundlagen der Pathophysiologie des Restenosemechanismus

Trotz intensiver Forschung konnte der komplexe Mechanismus und die Pathophysiologie der Restenoseentwicklung noch nicht völlig aufgeklärt werden. Neben anderen Faktoren werden Restenosen hauptsächlich durch neointimale Hyperplasie und negatives vaskuläres Remodeling ausgelöst. Apisarnthanarax et al. haben diese Mechanismen in einer Übersichtarbeit detailliert dargestellt (4).

Die neointimale Hyperplasie erfolgt innerhalb weniger Tage und dauert mehrere Wochen und Monate an. Sie stellt eine Antwort auf eine vaskuläre Verletzung dar und ist durch drei wesentliche Schritte gekennzeichnet. Zum ersten einer Thrombusformation, welche durch eine Aktivierung und Migration von glatten Muskelzellen und einer Synthese von extrazellulärer Matrix gefolgt wird (41, 54, 91). Durch die Verletzung der Endothelschicht kommt es zu einer verminderten Produktion von Glykosaminoglykanen, welche bei einer intakten Endothelschicht dafür verantwortlich sind, das Wachstum der darunterliegenden glatten Muskelschicht zu unterbinden (13, 60). Zusätzlich kommt es noch durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu einer Stimulierung der glatten Muskelzellen mit konsekutiver Proliferation (46, 50, 80). Die darauf folgende Entzündungsreaktion wird durch komplexe Prozesse gesteuert. Diese beinhalten eine Leukozyten-Endothelzellbindung gefolgt von einer Migration der Leukozyten ins Gewebe. Für verschiedene Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen konnte eine Beteiligung an der Leukozytenrekrutierung nachgewiesen werden. Sowohl das Interzelluläre Adhäsionsmolekül -1 (ICAM-1) als auch für das Vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) werden am Endothel exprimiert und gehören zur Immunglobulin Familie, welche die Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel in akuten und chronischen Entzündungen vermitteln (57, 64). Diverse Studien konnten zeigen, dass ICAM-1 und zu einem geringeren Maße auch VCAM-1 durchgehend an der Endotheloberfläche exprimiert wird (39, 55). Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle läßt sich durch eine Vielzahl an Zytokinen induzieren (77, 78, 87). Das Ausmaß der Induktion scheint jedoch in einer Organ- und Stimulus-abhängigen Weise abzulaufen (38, 59). Es konnte gezeigt werden, dass sich die ICAM-1 Expression in verschiedenen Organen als Reaktion auf Bestrahlung erhöhen lässt. Eine Blockade dieser Adhäsionsrezeptoren verhindert die Leukozytenadhäsion und somit die Entzündungsreaktion (36, 52).

---

Für den in dieser Studie verwendete Tumor Necrose Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wurde zuerst seine antitumoröse Eigenschaft beschrieben. Dazu kommt noch seine wichtige Funktion in immunologischen und entzündlichen Abläufen (58). TNF- $\alpha$  Aktivität führt zu phänotypischen Veränderungen des Endothels, welche durch eine erhöhte Permeabilität (69) und Induktion von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen, wie E-Selection (8), VCAM-1 (15) oder auch dem in dieser Studie beobachteten ICAM-1 (62) gekennzeichnet ist.

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von ICAM-1 bei humanen Gefäßwandzellen nach Bestrahlung und zusätzlicher Stimulation mit TNF- $\alpha$  untersucht. Dazu wurden glatte Muskelzellen aus der humanen koronaren Media, Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen und Endothelzellen aus humanen Koronararterien kultiviert, mit unterschiedlich hohen klinisch relevanten Dosen bestrahlt und anschließend mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten Rückschlüsse darauf geben, in wie weit die applizierte Strahlung die Expression des proinflammatorischen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 beeinflusst. Daraus können wichtige Erkenntnisse zur Entwicklung von Restenosen oder Kantenstenosen in unverletzten Koronarien pathophysiologisch zu klären ist.

---

## B. Material

### 1.1 Zellkultur

- **Glatte Muskelzellen aus der humanen koronaren Media (HCMSMC)**  
HCMSMC wurden von BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien bezogen
- **Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)**  
HUVEC wurden in der Universitätsfrauenklinik (Prof. Dr. R. Kreienberg) der Universität Ulm aus Umbilikalvenen gewonnen. Die Isolierung und Identifizierung der Endothelzellen erfolgte im Labor Voisard, Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm.
- **Endothelzellen aus humanen Koronararterien (HCAEC)**  
HCAEC wurden von BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien bezogen.

### 1.2 Zellmedien

- **HCMSMC**  
Die Kultivierung von HCMSMC erfolgte in Smooth muscle Growth Medium (SmGM) (BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien). Smooth muscle Basal Medium (SmBM) wird ergänzt mit:
  - Insulin 5 µg/ml
  - Fibroblast growth factor (FGF) 2 ng/ml
  - Epidermal growth factor (EGF) 0,5 ng/ml
  - 5% fetal calf Serum (fcS)
  - Gentamycin 50 µg/ml
  - Amphotericin 50 ng/mlDie hinzugefügten Substanzen wurden ebenfalls bei BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien erworben.
- **HUVEC**  
Die Kultivierung von HUVEC erfolgte in 500ml Endothelial Growth Medium (EGM) (BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien). Endothelial Basal Medium (EBM) wird ergänzt mit:

- 
- fetal calf Serum 25 ml
  - Hydrocortison 0,2 ml
  - human Fibroblast growth factor (hFGF-B) 2 ml
  - Vascular endothelial growth factor (VEGF) 0,5 ml
  - Recombinant analog of insulin-like growth factor-1 (R<sup>3</sup>-IGF-1) 0,5 ml
  - Ascorbic acid 0,5 ml
  - Human endothelial Growth factor (hEGF) 0,5 ml
  - Gentamycin 0,5 ml
  - Amphotericin 0,5ml

Die hinzugefügten Substanzen wurden ebenfalls bei BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien erworben.

#### ➤ HCAEC

Die Kultivierung von HCAEC erfolgte in 500 ml Endothelial Basal Medium (EBM). Endothelial Basal Medium wird ergänzt mit:

- 25ml fetal calf serum
- Hydrocortison 0,2 ml
- hFGF-B 2 ml
- Vascular endothelial growth factor (VEGF) 0,5 ml
- R<sup>3</sup>-IGF-1 0,5 ml
- Ascorbic acid 0,5 ml
- hEGF 0,5 ml
- Gentamycin 0,5 ml
- Amphotericin 0,5ml

Die hinzugefügten Substanzen wurden ebenfalls bei BioWhittaker Europe, Cambrex Company, Verviers, Belgien erworben.

### 1.3 Zellkulturreagenzien

#### ➤ Zellkulturreagenzien

- Phosphat Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium, sterilfiltriert, Endotoxin geprüft (PBS<sup>-</sup>) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)

- Trypsin/ Ethylenediaminetetraacetic (EDTA) (Clonetics Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
  - Trypsin Neutralisationslösung (TNS) (Clonetics Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
  - Kollagen Typ I from rat tail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 1 mg Kollagen verdünnt mit 1 ml 0,1 M Essigsäure (Merck KgaA, Darmstadt) anschließend filtriert mit einem 0,2 µm-Filter (VWR, Darmstadt)
- **Kultivierungsbedingungen**
- HUVECs, HCAECs und HCSMCs wurden in einem Inkubator vom Typ HERA cell (Kendro Laboratory Products GmbH, Fellbach) bei 37°C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## 2.0 Applikation der $\gamma$ -Strahlung

Zur Applikation der  $\gamma$ - Strahlen wurde ein Linearbeschleuniger der Marke LINAC PHILIPS FL 75/20 in der Abteilung für Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Ulm unter Leitung von Prof. Dr. E. Röttinger verwendet.

## 3.0 Zellstimulierung

- **Zytokine**
  - Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim. Die Aufbewahrung des TNF- $\alpha$  erfolgte bei – 80°C.

## 4.0 RNA Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden folgende Materialien verwendet:

- Phosphat Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium, sterilfiltriert, Endotoxin geprüft (PBS<sup>-</sup>) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
- QIAshredder (50 Tests) (Qiagen GmbH, Hilden)
- Rneasy Mini Kit (50 Test) (Qiagen GmbH, Hilden)

- 70% Ethanol (Merck, Darmstadt)

## 5.0 RNA Konzentrationsbestimmung

Zur RNA Konzentrationsbestimmung wurde folgendes Reagenz verwendet:

- Diethyl Pyrocarbonate-H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O): 200 µl DEPC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 1000 ml Aqua B. Braun (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) über Nacht bei 37°C geschüttelt anschließend autoklaviert.

## 6.0 Agarose-Gel

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Materialien benötigt:

- DEPC-H<sub>2</sub>O: 200 µl DEPC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 1000 ml Aqua B. Braun (siehe oben) über Nacht geschüttelt bei 37 °C anschließend autoklaviert.
- 10 x running buffer (1000 ml): 41,2 g 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
+ 3,28 g NaAcetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
+ 10 ml 0,5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8,0 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und mit 1 N HCL-Lösung ( ) auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert und in Alu gepackt.
- 1,8 g Agarose (Invitrogen life technologies Ltd, Paisley, Schottland)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
- Aqua B. Braun (siehe oben)

### ➤ Probenherstellung

Zur Probenherstellung wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 5 x running buffer :50 ml 10 x running buffer (siehe oben) ad 50 ml Aqua B. Braun (siehe oben)
- DEPC-H<sub>2</sub>O (siehe oben)
- deionisiertes Formamid 1000 ml: 50 g mixed bedresin (BioRad Laboratories GmbH, München) ad 1000 ml

- 
- Formamide (Merck, Darmstadt), über Nacht bei 4°C gerührt dann filtriert und portioniert eingefroren.
  - Northern sample-buffer (NSB): (immer frisch angesetzt)
    - 40 µl 5 x running buffer
    - + 200 µl deionisiertes Formamid
    - + 70 µl 37% Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)
  - 0,25% Bromphenolblau (1 ml):
    - 0,0025 g Bromphenolblau (BPB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
    - + 500 µl Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
    - + 5 µl 0,2 M EDTA (siehe oben)
    - + 495 µl DEPC-Wasser (siehe oben)anschließend in Alufolie verpackt.
  - Ethidiumbromid (EtBr) (10mg/ml):
    - 0,2 g EtBr (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 20 ml Aqua B. Braun (siehe oben).

### ➤ **Elektrophorese**

Zur Elektrophorese wurde folgendes Reagenz verwendet:

- 1 x running buffer (1000 ml):
  - 100 ml 10 x running buffer (siehe oben) ad 900 ml Aqua B. Braun (siehe oben)

## **7.0 Northern Blot**

Zum Blotten wurden folgende Materialien verwendet:

- 20 x SSC (1000 ml):
  - + 175,3 g NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
  - + 88,2 g NaCitrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)ad 800 ml Aqua B. Braun (siehe oben), gerührt, mit HCl auf pH 7,0 eingestellt und mit Aqua B. Braun (siehe oben) ad 1000 ml aufgefüllt.
- Hybond-N Nylonmembran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)



- 
- MM Whatman Chromatographiepapier 46 cm x 57 cm (Whatman)
  - Pehazell (Paul Hartmann AG, Heidenheim)

## 8.0 DNA Labeling

Für das DNA Labeling wurden folgende Materialien verwendet:

- Genes Images random prime labelling module (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg)
- GAPDH – Sonde: (Labor Voisard, Innere Medizin II, Universität Ulm) 1,0 µl  
+ 19 µl Tris/EDTA – Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- ICAM 1 – Sonde: (Labor Voisard, Innere Medizin II, Universität Ulm) 1,5 µl  
+ 18,5 µl Tris/EDTA – Puffer (siehe oben)

## 9.0 Hybridisieren

### ➤ Prähybridisieren

Zum Prähybridisieren wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Hybridisierungspuffer 100 ml:  
25 ml 20 x SSC (siehe oben)  
+ 1 ml 10% SDS  
+ 5 g Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
+ 5 ml Liquidblock (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) ad 100 ml Aqua B. Braun (siehe oben)

### ➤ Hybridisierung

Zum Waschen des Blottes wurden 2 verschieden konzentrierte Waschlösungen genutzt:

- Waschlösung I:  
25 ml 20 x SSC (siehe oben)

+ 2,5 ml 20 % SDS (ICN, Eschwege)  
ad 500 ml Aqua B. Braun (siehe oben)

- Waschlösung II:  
2,5 ml 20 x SSC (siehe oben)  
+ 2,5 ml 20 % SDS (siehe oben)  
ad 500 ml Aqua B. Braun (siehe oben)

## 10.0 Entwicklung

Zur Entwicklung diente das Gen Image CPD Star Detection Set (Amersham Biosciences, Freiburg):

- Puffer A 1000 ml:  
100 ml 1 M Tris (siehe unten)  
+ 60 ml 5 M NaCl (siehe unten)  
ad 1000 ml Aqua B. Braun (siehe oben)  
pH 9,5 mit NaOH einstellen
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- (Tris)-Hydroxymethyl Aminomethan (Tris) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 1 M Tris 100 ml :  
12,1 g Trizma Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 100 ml Aqua B. Braun (siehe oben)
- 5 M NaCl 100 ml :  
5,844 g NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
ad 100 ml Aqua B. Braun (siehe oben)
- CDP – Star Detektions Reagenz (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
- Agfa Cronex 5 100 NIF 18 x 18 cm (Röntgen Bender)

## 11.0 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

- 
- Laminar Flow (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
  - Schüttelwasserbad: - Julabo SW-20C (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Inkubator HERA cell (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
  - Pipetboy plus (Integra Bioscience GmbH, Fernwald)
  - Fireboy eco (Integra Biosciences GmbH, Fernwald)
  - Vakuumpumpe KNF (VWR International GmbH Darmstadt)
  - Mikroskop Nikon TMS ( Nikon GmbH, Düsseldorf)
  - Varifuge 3.0R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
  - Biofuge pico (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
  - Universal 2S Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)
  - Einweg Zell-Schaber Falcon (Becton Dickinson Labware, Heidelberg)
  - Eppendorf Reference Pipetten in den Größen 0,5µl – 10µl, 10µl - 100µl und 100µl - 1000µl. (Eppendorf AG, Hamburg)
  - Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg)
  - Drucker DPU – 414 Thermal Printer (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Mikrowelle Bosch (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - SpeedVac Concentrator und Refrigerated Condensation Trap (VWR International GmbH, Darmstadt )
  - Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg)
  - Magnetrührer IKAMAG RCT (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Vortex-Genie 2 (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Blue Marine 200 Gelkammer (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

- 
- Blue Power Supply 500 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
  - Polaroid Gelcam (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
  - Polaroid Filme ISO 3000/36° 30 sec. 8,5cm x 10,8cm 20 Photos (Universitätsfotozentrale, Ulm)
  - UV-Transluminator (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg)
  - Hybridisierungssofen (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
  - Schüttler Heidolph Duomax 1030 (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Waage Precisa 400 M (VWR International GmbH, Darmstadt)
  - Röntgenfilmentwicklungsgerät: Optimax (MS Laborgeräte GbR, Wiesloch)
  - Luminescent Image Analysis 1000 (Raytest Straubenhardt, Fujifilm I&I)
  - Computerprogramm zur grafischen Darstellung der Ergebnisse Microsoft Excel und Microsoft Word
  - Computerprogramm zur statistischen Auswertung SigmaStat Ver. 2.0

## 12.0 Gefäße und Glaswaren

Es wurden folgende Geräte und Glaswaren verwendet:

- Zentrifugenröhrchen: Falcon 50 ml und 15 ml (Becton Dickinson Labware Europe, Heidelberg)
- Kulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>, 250 ml, mit Filter (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Serologische Pipetten 10ml, 25 ml und 50 ml (Becton Dickinson Labware Europe, Heidelberg)
- Glaspipetten in den Größen 2 ml, 5 ml und 10ml (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Eppendorf Pipettenspitzen in den Größen 10µl, 200µl und 1000µl (Eppendorf AG, Hamburg)

- Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- Uvette 220 – 1600 nm (Eppendorf AG, Hamburg)
- Gelkammer (Qiagen GmbH, Hilden)
- Erlenmeyerkolben (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Plastikschalen (VWR International GmbH, Darmstadt)  
Glasplatten (Universitätswerkstatt, Ulm)

---

## C. Methoden

### 1.0 Zellkultivierung

#### ➤ Kultivierung der glatten Muskelzellen

Die in 75 cm<sup>2</sup> großen Kulturschalen ausgesäten Zellen wurden alle 2 –3 Tage mit SmGM – Nährmedium (B 1.2) versorgt. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank unter gleichbleibenden Bedingungen (37 °C bei 5% CO<sub>2</sub> Sättigung). Bedeckten die Zellen konfluent den Boden der Kulturschalen erfolgte die Umsetzung in 2 – 3 weitere Kulturschalen. Zur Reduktion des enthaltenen Kalziums und der damit verbundenen Zelladhäsion wurde zweimalig mit PBS<sup>-</sup> (B 1.3) gespült. Zur weiteren Lösung der Zelladhäsionen wurden 2 ml Trypsin/EDTA (B 1.3) hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde nach 3 min durch die Gabe von 5ml TNS (B 1.3) unterbunden. Die nun verbliebenden 7 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen bzw. 50 ml Falconröhrchen (bei Umsetzung mehrerer Schalen) pipettiert und anschließend bei 21 °C 5min lang mit 1200 U/s in der Universal 2S Zentrifuge bzw. Varifuge 3.0R zentrifugiert (B 11.0). Der entstandenen Überstand wurde abgesaugt und die in frischem SmGM - Nährmedium gelösten Zellen gleichmäßig auf neue Schalen verteilt.

#### ➤ Kultivierung der Endothelzellen

Die Kultivierung und Umsetzung der Endothelzellen erfolgte gleich der Behandlung der glatten Muskelzellen. Als Nährmedium wurde bei diesen Zellen EGM (B 1.2) verwendet. Für die Kultivierung von HCAEC und HUVEC wurden mit Kollagen beschichtete Schalen verwendet.

#### ➤ Beschichtung der Kulturschalen mit Kollagen

In die neu verwendeten Kulturschalen wurden jeweils 5ml PBS<sup>-</sup> hinein pipettiert. In dieses PBS<sup>-</sup> (B 1.3) erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl Kollagen 1 (B 1.3). Die Kulturschalen wurden nun geschwenkt, um den Boden gleichmäßig mit dem PBS<sup>-</sup>/Kollagengemisch zu bedecken. Anschließend wurden die Kulturschalen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank aufbewahrt.

## **2.0 Applikation der $\gamma$ -Strahlung**

Nach Erreichen einer konfluenten Bedeckung des Kulturschalenbodens mit Zellen in 7 verschiedenen Kulturschalen, erfolgte die Bestrahlung in der Abteilung für Strahlentherapie (Prof. Dr. E. Röttinger) der Universität Ulm. Zur Applikation der  $\gamma$ - Strahlen wurde ein LINAC PHILIPS FL 75/20 (B 2.0) verwendet. Der Focus – Strahlenquellenabstand betrug 100 cm, wobei die Kulturschalen noch auf einer 2 cm dicken Plastikschaale ruhten. Die Dosisrate betrug 6 Gy/min. Die Feldgröße betrug 40 x 40 cm. Die Proben wurden unfraktioniert mit entweder 0,5 Gy, 1 Gy, 10 Gy, 20 Gy oder 30 Gy bestrahlt. Nicht bestrahlte Zellkulturen aus der Kontrollgruppe wurden während der Strahlenapplikation im Kontrollraum der Strahlentherapie klinik belassen.

## **3.0 Zellstimulierung**

20 Stunden nach Applikation der Strahlung erfolgte eine Stimulierung der ICAM –1 Expression mittels Gabe von TNF- $\alpha$ . In die mit 10 ml Nährmedium gefüllten Zellkulturschalen wurden 20ng/ml TNF- $\alpha$  (B 3.0) gegeben. Nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurden die Zellen, einschließlich einer nicht stimulierten Kontrollschale unter standardisierten Bedingungen für 6 Stunden wieder im Inkubator aufbewahrt.

## **4.0 RNA-Isolierung**

6 Stunden nach Stimulierung der ICAM – 1 Expression durch TNF- $\alpha$  erfolgte die Isolierung mit dem Rneasy Mini Kit (B 4.0). Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde einmalig mit PBS<sup>-</sup> gespült. Anschließend wurden 600 $\mu$ l RLT Lysepuffer auf die in den Kulturschalen verbliebenen Zellen pipettiert und auf der Wachstumsfläche verteilt. Nun folgte die Lösung der Zellen durch einen Einweg – Zellschaber. Die entstandene Zellsuspension wurde auf eine Qiashreddersäule (B 4.0) gegeben und 2 min bei Raumtemperatur mit 13000 U/min zentrifugiert. Der Qiashreddersäule wurde verworfen und in den entstandenen Durchfluß wurden 600  $\mu$ l 70% Ethanol pipettiert und resuspendiert. Das Resuspensat wurde in eine RNeasy – Säule transferiert und zweimal 15 sec. bei Raumtemperatur mit 10000 U/min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden 700  $\mu$ l RW 1 auf die Säule gegeben und erneut 15 sec. bei Raumtemperatur und 10000 U/min zentrifugiert. Durchfluß

---

und dazu gehörendes Sammeltube wurden verworfen, und die Rneasy Säule auf ein neues 2 ml Sammeltube gesetzt. Mit 100 % Ethanol wurde nun neuer RPE Puffer angesetzt und dieser in einer Menge von 500 µl in das Sammeltube gefüllt. Es folgte eine 15sec. lange Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10000 u/min. Nach Verwerfen des Durchflusses erneute Zugabe von 500 µl Puffer RPE mit anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10000 U/min. Dieser Arbeitsschritt wurde ohne weitere Zugabe von RPE Puffer bis zu vollständigem Trocknen der Membran wiederholt. Die Rneasy Säule wurde dann auf ein neues 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube gesetzt und es erfolgte die Zugabe von 30 µl RNase – freien Wassers direkt auf den Filter. 1 min lang erfolgte dann bei Raumtemperatur und 10000 U/min die Zentrifugation. Nach diesem Schritt sammelte sich nun die Gesamt – RNA in dem Eppendorf Safe - Lock Tube, welches umgehend auf Eis gestellt wurde und bis zur weiteren photometrischen Dichtebestimmung bei – 20 °C gelagert wurde.

### **5.0 RNA Konzentrationsbestimmung**

Die bei – 20 °C gelagerten RNA – Proben wurden auf Eis gelegt und die enthaltene RNA Menge photometrisch bestimmt. Als Referenzwert diente hierbei eine mit 600 µl DEPC Wasser gefüllte UVette (B 12.0). Eine UVette wurde nun mit 597 µl DEPC Wasser gefüllt, die Probe resuspendiert und 3 µl der RNA Probe dem DEPC hinzugefügt. Anschließend wurde erneut resuspendiert und die Dichtebestimmung bei der Wellenlänge 260 nm und 280 nm durchgeführt. Aus den erhaltenen Messwerten wurde die pro µl enthaltene Menge an RNA in µg errechnet. Letztlich wurde noch das Volumen in µl bestimmt in welchem sich 10 µg RNA befinden. Die hier jeweils errechnete RNA Menge wurde später zur Probenherstellung verwendet.

### **6.0 Agarose-Gel**

Zur Herstellung des Gels wurden 1,8 g Agarose (B 6.0) in einem sterilem 200 ml Erlenmeyerkolben abgewogen. Es folgte die Zugabe von 108 ml sterilem Wasser und eines Magnetrührers. Nach kurzem Rühren wurde das Gemisch in einer Mikrowelle bei 600 Watt aufgekocht, bis die Agarose in vollständig gelöstem Zustand vorlag. Unter Rühren wurden nun 15 ml 10 x running Buffer und 27 ml 37 % Formaldehyd hinzugefügt und das noch



flüssige Gel in die Gelkammer gegossen. Es erfolgte nun noch das Einsetzen des Taschenkamms.

#### ➤ **Probenherstellung**

Zur Probenherstellung wurde die RNA nach dem während der Konzentrationsbestimmung errechnetem Schema in auf Eis gelegte 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes pipettiert und für 20 min in den Lyophilisator gegeben. Während dieser Zeit erfolgte die Herstellung vom NSB und Mastermix (B 6.0). Für 7 Proben wurden zu 40 µl 5 x running noch 200 µl deonisiertes Formamid und 70 µl 37 % Formaldehyd hinzugefügt und anschließend gevortext. Zur Herstellung des Mastermixes wurden zu 40 µl DEPC insgesamt 120 µl frisch angesetztes NSB, 28 µl Bromphenolblau und 0,8 µl Ethidiumbromid zugegeben. Der erhaltene Mastermix wurde nach Herstellung ebenfalls kurz gevortext. Zu den lyophilisierten Proben wurden jeweils 23,6 µl Mastermix gegeben und diese für 10 min in einem Heizblock bei 55 °C inkubiert. Nun wurden die Proben nochmals gevortext und 8 sec. bei 10000 U/min zentrifugiert. Die 23,6 µl großen Proben wurden nun auf das Gel aufgetragen.

#### ➤ **Agarose-Gelelektrophorese**

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1-x running buffer (1 Liter)gefüllt (B 6.0). Aus dem Gel wurde der Kamm entfernt, das Gel in den running buffer gelegt und in die entstandenen Geltaschen wurden die jeweils 23,6 µl großen Proben pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte 3 h lang bei 75 V. Das Gel wurde nun am UV-Transluminator (B 11.0) fotografiert.

### **7.0 Northern Blot**

Eine Plastikschielle wurde mit 500 ml 20 x SSC (B 7.0) gefüllt und eine Glasplatte über beide Seitenränder gelegt. 3 MM Whatmanpapiere wurde so zu geschnitten, dass sie die ganze Breite des Gels abdeckten. Auf dieses luftblasenfrei aufgelegte Whatman Papier (B 7.0) wurde nun das umgedrehte Gel gegeben und eine der Größe des Gels entsprechende Hybond N Membran (B 7.0) gelegt. Die nächste Schicht bildete eine ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnittene dreilagige Schicht von luftblasenfrei aufgelegtem MM Whatmanpapier. Die verbliebenen freien Ränder der Plastikschielle wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf den Blot eine ca. 10 cm hohe Zellstoffschicht gelegt und diese mit einem ca. 500 g schweren Gewicht fixiert. Nach 24 h wurde der Blot abgebaut es erfolgte das Crosslinken der Hybond N Membran.

## 8.0 DNA Labeling

In einem Eppendorf Safe-Lock Tube wurden 1,5 µl ICAM 1 oder GAPDH Sonde (B 8.0) mit 18,5 µl Tris/EDTA Puffer verdünnt. Diese Probe wurde nun bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu diesen 20 µl denaturierter DNA erfolgte die Gabe von 10 µl Nukleotidmix, 5 µl Primer, 14 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Klenow Enzymsolution aus dem Genes Image random prime labeling module (B 8.0). Die Probe wurde mit einer Pipette nochmals resuspendiert, 8 sec. abzentrifugiert und 1 h lang bei 37 °C inkubiert.

## 9.0 Hybridisierung

### ➤ Prähybridisierung

In einem Wasserbad wurde der Hybridisierungspuffer (B 9.0) auf 65 °C aufgewärmt. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurde der Blot mit nach innen gerichteten RNA Banden in das Hybridisierungspufferröhrchen gelegt und für 1 h im ebenfalls auf 65 °C erhitzten Hybridisierungssofen belassen.

### ➤ Hybridisierung

Die während des DNA Labeling markierte Sonde wurde bei 95 °C nochmals denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die nun denaturierte Sonde wurde dem Hybridisierungspuffer und dem darin enthaltenen Blot zugegeben und anschließend für 24 h nochmals in den Hybridisierungssofen (B11.0) gegeben. Am nächsten Tag folgte das Herauswaschen unspezifischer Bindungen durch jeweils 15 minütiges Waschen in zwei verschiedenen konzentrierten Waschlösungen. Dazu wurde der Blot aus dem Hybridisierungspuffer genommen in eine mit Waschlösung I (B 9.0) gefüllte Tupperchale gelegt. Auf einem Schüttler wurde die Tupperchale nun mit dem enthaltenen Blot bewegt. Der selbe Vorgang wurde mit Waschlösung II (B 9.0) wiederholt.

## 10.0 Entwicklung

Zur Entwicklung wurde das Genes images Star CPD Detection Kit verwendet (B 10.0). 90 ml Puffer A (B 10.0) wurden mit 10 ml Liquidlösung in einer Plastikschaale gemischt, der Blot hinzugegeben und 1 h auf dem Schüttler belassen. Als nächster Schritt erfolgte das

---

Abwiegen von 0,15 g Bovine Serum Albumin, welches 50ml Puffer A zugegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt wurde. Zu den 50ml Puffer A wurden noch 10  $\mu$ l antifluoreszein Antikörper hinzugegeben nochmals gerührt, in eine Plastikschaale gegeben und der Blot dazugelegt. Diesen belies man nun für 1 h Stunde auf einem Schüttler. Als nächstes wurden 3 Lösungen mit jeweils 50 ml Puffer A und 150  $\mu$ l Tween 20 hergestellt. Zum Blocken wurde der Blot nun jeweils für 10 min in die 3 Lösungen gelegt und auf den Schüttler gestellt. Es folgte die Detektion, hierzu legte man den Blot auf eine Glasplatte und bedeckte den Blot mit 5ml Detektionsreagenz und lies das Reagenz für 5 min wirken. Der Blot wurde nun luftblasenfrei in Folie eingepackt und in der Dunkelkammer auf einem Film exponiert (B 10.0).

### **11.0 Quantitative Auswertung**

Der Blot wurde in den LAS 1000 Image Reader (B 11.0) gelegt und die erhaltene Signalstärke der mit TNF- $\alpha$  stimulierten und bestrahlten Proben in Relation zu der lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierten Bande der Kontrollgruppe gesetzt. Als weitere Kontrolle diente die Bande, welche aus der weder bestrahlten noch mit TNF- $\alpha$  stimulierten Probe stammte. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm LAS 1000. Anschliessend erfolgte die grafische Darstellung.

### **12.0 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der relativen Bandendichte der ICAM 1 Expression auf RNA Ebene erfolgte als Mittelwert +/- Standardabweichung. Statistische Signifikanz zwischen der lediglich stimulierten Kontrollgruppe und den zusätzlich bestrahlten Proben wurde über den paired t-test ermittelt. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

---

## D. Ergebnisse

### ➤ ICAM-1 Expression nach Applikation von $\gamma$ -Strahlung

Die Bestrahlung der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen erfolgte mit 0,5 Gy, 1 Gy, 10 Gy, 20 Gy und 30 Gy. Bei einer Kulturschale aus der Kontrollgruppe wurde auf die Bestrahlung verzichtet. 20 h nach Applikation der  $\gamma$ -Strahlung erfolgte die Stimulation der ICAM-1 Expression mit 20ng/ml TNF- $\alpha$  bei einer nicht bestrahlten Kulturschale und den mit 0,5 Gy, 1 Gy, 10 Gy, 20 Gy und 30 Gy bestrahlten Schalen. Weitere 6 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  erfolgte die Isolierung der Gesamt RNA mit anschließender Northernblot-Analyse der ICAM-1 RNA Expression.

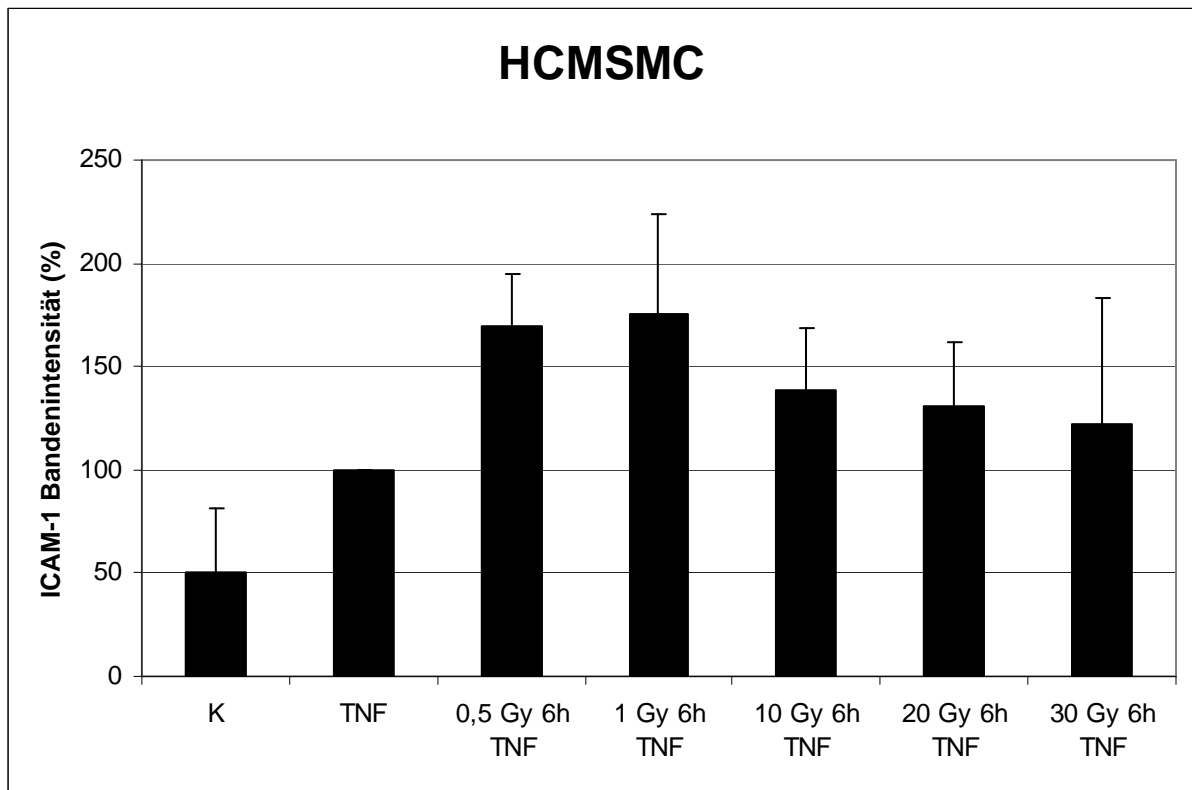
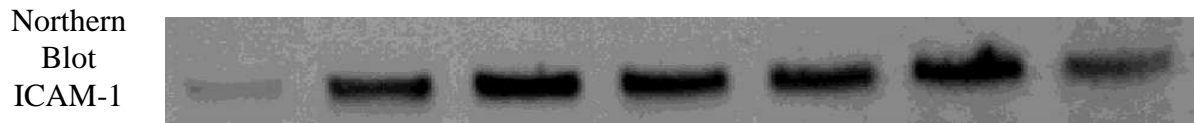
#### 1.0 Northern Blot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei glatte Muskelzellen der humanen koronaren Media (HCMSMC)

Bei den HCMSMC Kulturen wurde die relative ICAM-1 RNA Bandendichte nach Bestrahlung und anschließender Stimulation mit TNF- $\alpha$  bestimmt. Die nach 3 Versuchen ermittelten Werte wurden als arithmetischer Mittelwert und daraus resultierende Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich wurde noch die Signifikanz der erhaltenen Werte gegenüber der Kontrollgruppe mittels des paired t-tests ermittelt. Als 100 % Vergleichswert diente hierbei die lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierte jedoch nicht bestrahlte Kulturschale. In der weder mit TNF- $\alpha$  stimulierten noch mit  $\gamma$ -Strahlung behandelten Kontrollgruppe wurde eine Basis ICAM-1 Expression von  $50,12 \% \pm 31,4$ ; [ $x \pm SD(n-1)$ ] beobachtet. In den übrigen Kulturschalen lies sich durchgängig ein stimulierender Effekt der ICAM-1 Expression erkennen, der bei niedriger Strahlendosis stärker ausgeprägt war. Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und TNF- $\alpha$  Stimulation ergab sich eine relative Bandendichte von  $169,75 \% \pm 24,81$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ], bei 1 Gy und TNF- $\alpha$  Gabe ein Wert von  $175,35 \% \pm 48,7$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ], bei 10 Gy und TNF- $\alpha$  Gabe  $138,23 \% \pm 30,27$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ], bei 20 Gy und TNF- $\alpha$  Gabe  $130,88 \% \pm 31$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] und schließlich bei 30 Gy und TNF- $\alpha$  Gabe ein Wert von  $121,99 \% \pm 61,43$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ]. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 und der Abbildung 1 tabellarisch bzw. graphisch dargestellt.

**Tab. 1:** Tabellarische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HCMSMC 26h nach  $\gamma$ -Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle (K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

	<b>K</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>0,5 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>1 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>10 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>20 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>30 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Versuch 1</b>	15,74	100	143,73	120,87	104,67	108,95	62,33
<b>Versuch 2</b>	77,28	100	193,14	190,55	163,48	( - )	185,05
<b>Versuch 3</b>	57,33	100	172,38	214,63	146,55	152,80	118,58
<b>gesamt x <math>\pm</math> SD(n-1)</b>	50,12 $\pm$ 31,4	100 $\pm$ 0	169,75 $\pm$ 24,81	175,35 $\pm$ 48,7	138,23 $\pm$ 30,27	130,88 $\pm$ 31	121,99 $\pm$ 61,43
<b>p</b>			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Legende: p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. = nicht significant,  $x \pm SD (n-1)$  = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung



**Abb. 1:** Graphische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HCMSMC 26h nach  $\gamma$ Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle (K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

---

## **2.0 Northern Blot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)**

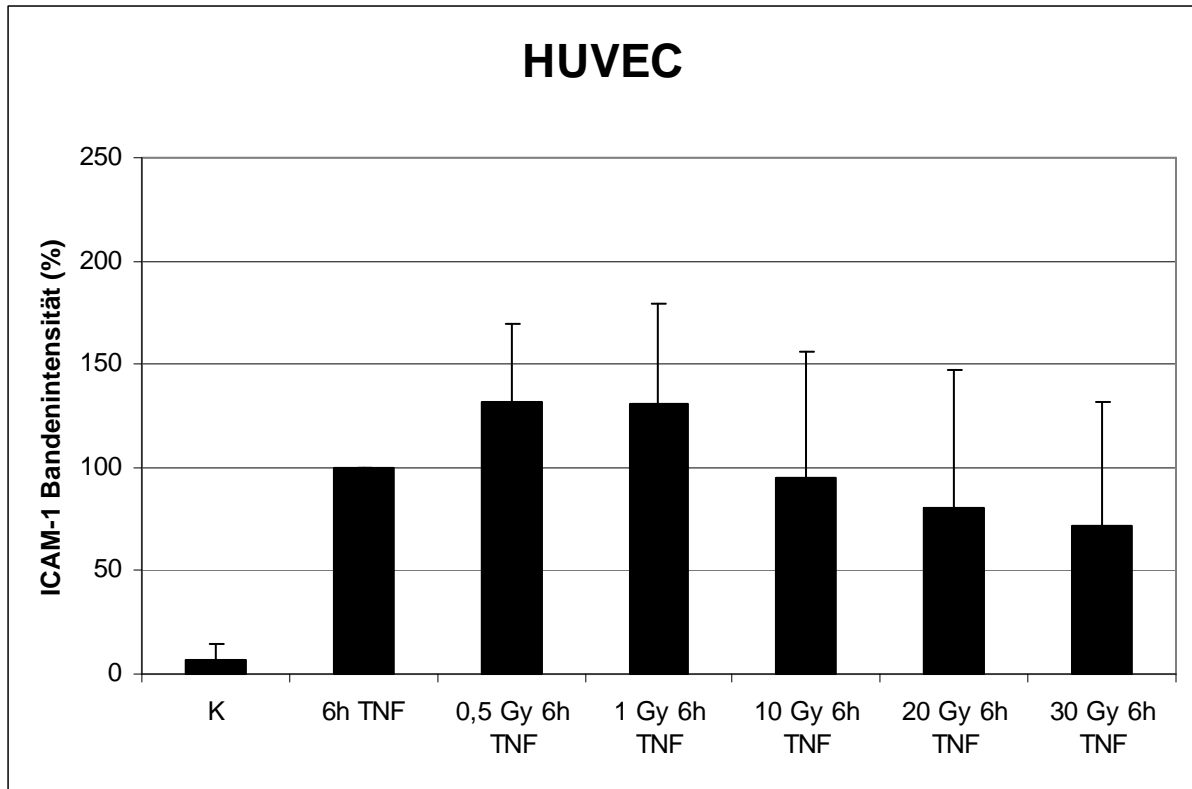
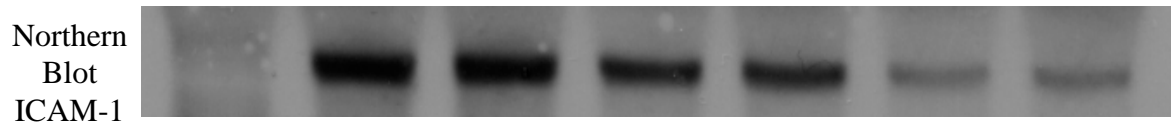
Auch bei HUVEC Zellkulturen wurde die relative Bandendichte der ICAM-1 Expression mittels Northern Blot-Analyse nach  $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation mit TNF- $\alpha$  bestimmt. Nach 4 Versuchsreihen wurde der arithmetische Mittelwert aus den erhaltenen Ergebnissen ermittelt und die Standardabweichung bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden durch den paired t-test auf statistische Signifikanz untersucht. Als 100% Vergleichsgruppe zur Signifikanzbestimmung diente hierbei die lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierte Kontrollkulturschale. Als Basis ICAM-1 Expression wurde in der weder bestrahlten noch stimulierten Gruppe ein Wert von  $6,3\% \pm 7,98$  [ $x \pm SD(n-1)$ ] festgestellt. In den mit 0,5 Gy bestrahlten und mit TNF- $\alpha$  stimulierten Kontrollschalen wurde ein stimulierender Effekt von  $131,50\% \pm 37,7$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] beobachtet. Dies lies sich auch in der mit 1 Gy bestrahlten und mit TNF- $\alpha$  bestrahlten Gruppe mit  $130,7\% \pm 48,6$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] erkennen. Der hier beobachtete stimulierende Effekt bei niedriger Strahlendosis (0,5 Gy und 1 Gy) ist im Vergleich zu HCMSMC und HCAEC jedoch weniger stark ausgeprägt. Inhibitorisch auf die ICAM-1 Expression wirkte die Bestrahlung mit 10 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Hier wurde ein niedrigerer Wert mit  $94,49\% \pm 61,25$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Bei der Bestrahlung mit 20 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurde mit  $80,91\% \pm 65,93$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] ebenfalls ein inhibitorischer Effekt aufgewiesen. Inhibitorisch wirkte ebenso die Bestrahlung mit 30 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$ , hier wurde eine relative Bandendichte von  $71,47\% \pm 60,14$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] beobachtet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 und der Abbildung 2 tabellarisch bzw. graphisch dargestellt.

**Tab. 2:** Tabellarische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HUVEC 26h nach  $\gamma$ Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle (K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

	<b>K</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>0,5 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>1 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>10 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>20 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>30 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Versuch 1</b>	8,59	100	109,6	128,23	67,64	79,91	61,61
<b>Versuch 2</b>	0	100	101,26	64,31	55,94	9,78	6,39
<b>Versuch 3</b>	16,61	100	185,12	177,35	185,96	168,84	152,0
<b>Versuch 4</b>	0	100	130,0	152,85	68,43	65,12	65,89
<b>gesamt x <math>\pm</math>SD(n-1)</b>	6,3 $\pm$ 7,98	100 $\pm$ 0	131,50 $\pm$ 37,7	130,7 $\pm$ 48,6	94,49 $\pm$ 61,25	80,91 $\pm$ 65,93	71,47 $\pm$ 60,14
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Legende:  $p$  = Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. = nicht significant,  $x \pm SD (n-1)$  = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung





**Abb. 2:** Graphische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HUVEC 26h nach  $\gamma$ -Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle (K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

---

### **3.0 Northern Blot-Analyse der ICAM-1 Expression nach $\gamma$ -Bestrahlung und Stimulation durch TNF- $\alpha$ bei Endothelzellen aus humanen Koronararterien (HCAEC)**

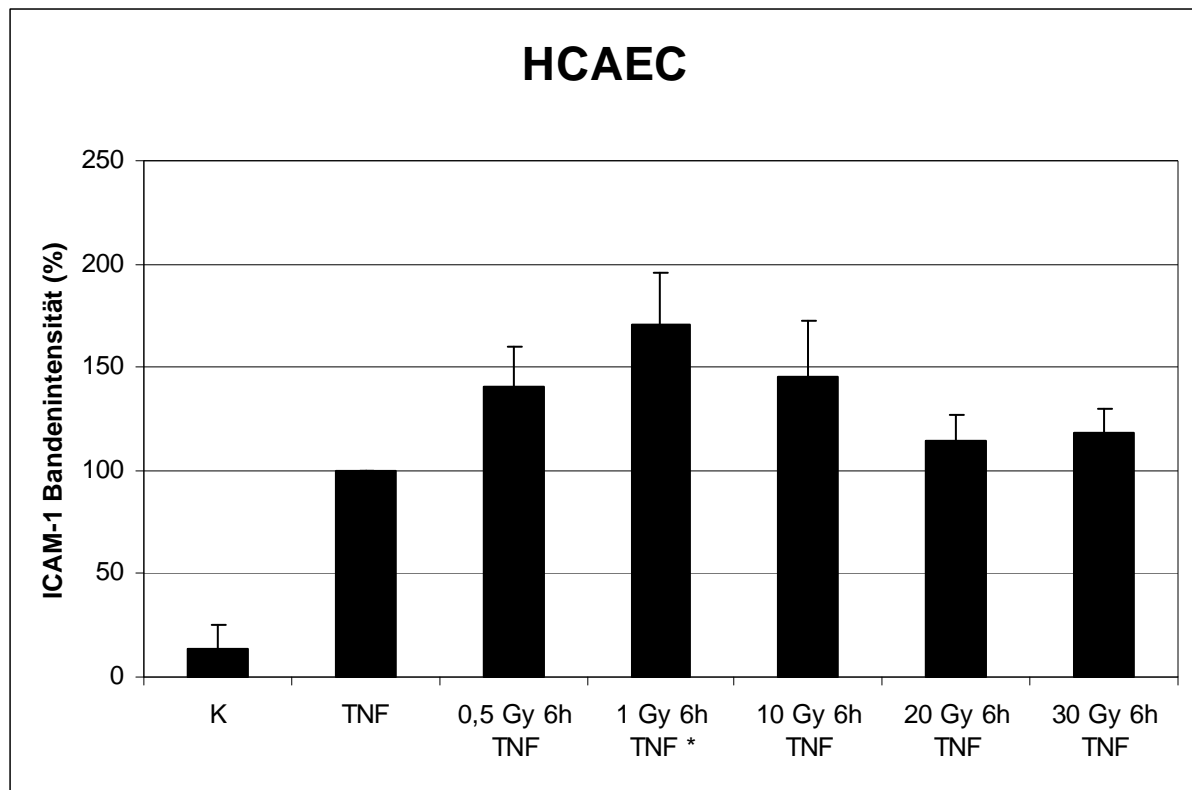
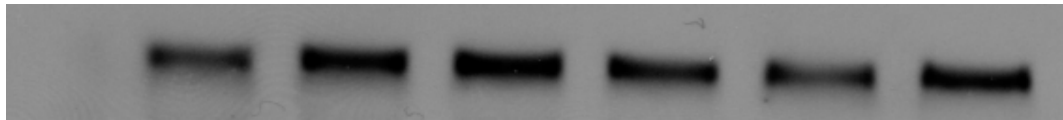
Wie bei HCMSMC und HUVEC wurde auch bei HCAEC die relative Bandendichte der ICAM-1 Expression durch Northernblot-Analyse nach  $\gamma$ -Bestrahlung in variabler Dosis und Stimulation mit TNF- $\alpha$  bestimmt. Die Versuchsreihe wurde dreimalig durchgeführt und aus den erhaltenen Ergebnissen der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des paired t-tests ermittelt. Als 100% Vergleichsgruppe diente die nicht bestrahlte und lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierte Probe. Die ICAM-1 Basisexpression betrug bei HCAEC  $13,29\% \pm 12,0$  [ $x \pm SD(n-1)$ ]. Bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurde eine erhöhte ICAM-1 Expression von  $140,12 \pm 19,58$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] beobachtet. Eine statistisch signifikante Überexpression von ICAM-1 konnte bei der Bestrahlung mit 1 Gy und der Stimulation mit TNF- $\alpha$  gezeigt werden. Hier wurde ein Wert von  $170,71\% \pm 24,96$  [ $x \pm SD(n-1)$ ] mit einem  $p < 0,05$  ermittelt. Bei der Bestrahlung mit 10 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurde ein Wert von  $145,01\% \pm 27,26$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] bestimmt. Bei Bestrahlung mit 20 Gy und Stimulation mit TNF- $\alpha$  zeigte sich mit  $114,66\% \pm 12,45$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ] ebenfalls eine gesteigerte Expression von ICAM-1. Die höchste Strahlendosis mit 30 Gy und zusätzliche Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte ebenso zu einer erhöhten ICAM-1 Expression mit einem Ergebnis von  $118,59\% \pm 10,92$  (n.s.) [ $x \pm SD(n-1)$ ]. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle I und der Abbildung I tabellarisch bzw. graphisch dargestellt.

**Tab. 3:** Tabellarische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HCAEC 26h nach  $\gamma$ -Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle (K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

	<b>K</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>0,5 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>1 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>10 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>20 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>30 Gy TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Versuch 1</b>	16,52	100	129,7	142,22	114,12	100,44	106,73
<b>Versuch 2</b>	0	100	127,95	181,23	155,17	119,93	120,81
<b>Versuch 3</b>	23,34	100	162,70	188,69	165,75	123,60	128,23
<b>gesamt x <math>\pm</math>SD(n-1)</b>	13,29 $\pm$ 12,0	100 $\pm$ 0	140,12 $\pm$ 19,58	170,71 $\pm$ 24,96	145,01 $\pm$ 27,26	114,66 $\pm$ 12,45	118,59 $\pm$ 10,92
<b>p</b>			n.s.	< 0,05	n.s.	n.s.	n.s.

Legende: p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. = nicht significant,  $x \pm SD (n-1)$  = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Northern  
Blot  
ICAM-1



**Abb. 3:** Graphische Darstellung der Northern Blot Analyse der ICAM-1 RNA Expression bei HCAEC 26h nach  $\gamma$ -Bestrahlung und 6h nach Stimulation mit 20ng/ml TNF- $\alpha$ . Als Kontrolle(K) diente eine weder bestrahlte noch stimulierte Probe.

\*: < p 0,05

---

## E. Diskussion

### 1.0 Anwendung der Brachytherapie im klinischen Modell

Mit dem Einsatz der intravaskulären Brachytherapie wurde eine Therapieoption zur Verhinderung der Restenoseentwicklung nach perkutaner transluminaler Koronarintervention (PTCA) zunächst im Tiermodell gefunden (88, 90). Sich daran anschließende klinische Studien konnten zeigen, dass sowohl die Anwendung von  $\beta$ -Strahlung als auch die Anwendung von  $\gamma$ -Strahlung das Wiederauftreten von In-Stent Restenosen verringert (43, 89). Der Erfolg dieser Methode wird jedoch durch das vermehrte Auftreten von Kantenstenosen limitiert, welche in postinterventionellen Kontrollangiographien gefunden wurde (1). Angiographische und intravaskuläre Ultraschalluntersuchungen an Patienten, die mit einer vaskulären Brachytherapie behandelt wurden, zeigten eine nahezu komplette Inhibition der Neointima auf Höhe des eingebrachten Stents bei nahezu vollständiger Stenose der Gefäße an den Rändern, der mit einem Stent versehenen und am Rande der bestrahlten Fläche liegenden Gefäßsegmente. Die Bildung von Kantenstenosen konnte auch nicht durch das zusätzliche Anlegen von weiteren Stents während der Bestrahlung unterbunden werden (86).

### 2.0 Mögliche Ursachen des Kanteneffektes

Über die Ursachen des Kanteneffektes wird derzeit kontrovers diskutiert und die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge konnten bis heute noch nicht geklärt werden. Als möglicher Grund wird ein Zusammenhang zwischen einer durch die Dilatation bzw. das Anbringen der Stents verursachten Verletzung der Gefäßwandzellen bei gleichzeitigem Dosisabfall der applizierten Strahlung am Rande der bestrahlten Fläche vermutet (2, 34). Um den Strahlendosisabfall an den Kanten der bestrahlten Fläche zu umgehen wurde von Seyda et al. eine Ausweitung der bestrahlten Fläche um einen Sicherheitsabstand von 10 mm pro interventioniertem Gefäß vorgeschlagen, um das Auftreten von Kantenstenosen zu verhindern (72). Zu einer vergleichbaren Schlussfolgerung kamen auch Chenau et al. in ihrer Studie. Sie konnten beweisen, dass eine Ausdehnung der bestrahlten Fläche um 14,5 mm vom jeweiligen Ende des Stents den Kanteneffekt weiter minimieren kann (18). Folge dieser Ausweigungsstrategie ist jedoch, dass auch unverletzte Arterien bestrahlt werden. Über die

---

Konsequenzen dieses Vorgehens ist bisher noch wenig bekannt. In einer erst kürzlich veröffentlichten Fallstudie beschrieben Baweja et al. die Entstehung einer neuen und signifikanten Stenose in weit proximalen Segmenten, die zuvor als vollkommen unauffällig klassifiziert wurden, nachdem sehr weit distal des unveränderten Endothels eine In-Stent Restenose bestrahlt wurde. Möglicherweise wurde dies durch eine angiographisch nicht feststellbare Verletzung in Kombination mit der strahlentherapeutischen Behandlung verursacht (6).

### **3.0 In vitro Modell zur Aufdeckung der Ursachen des Kanteneffektes**

Während der therapeutischen Applikation von Strahlung im Bereich von In-stent Restenosen kommt es, abhängig von der angewandten und applizierten Strahlentechnik und Strahlendosis, auch zur Bestrahlung sowohl von verletzter als auch unverletzter Gefäßwand, im Bereich von 0 Gy bis 30 Gy. Hierzu wurde in der aktuellen Studie der Effekt einer  $\gamma$ -Bestrahlung mit 0.5, 1, 10, 20 und 30 Gy auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) bei humanen koronaren Gefäßwandzellen untersucht. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass sich nach Bestrahlung sowohl bei HCAEC als auch bei HCMSMC durchgängig eine Stimulation der ICAM-1 RNA Expression ergab, die bei niedrig dosierter Bestrahlung (0.5 Gy und 1 Gy) stärker ausgeprägt war als bei höheren Strahlendosen. Nach Bestrahlung der HCAEC mit 1 Gy wurde das Signifikanzniveau erreicht. Wie bei HCMSMC und HCAEC wurde auch bei HUVEC im niedrigen Dosisbereich (0.5 Gy und 1 Gy) eine Stimulation der ICAM-1 RNA Expression beobachtet, die jedoch im Vergleich zu HCAEC und HCMSMC schwächer ausgeprägt war. Nach Applikation von hohen Strahlendosen (10, 20 Gy und 30 Gy) ergab sich bei HUVEC eine Inhibition der ICAM-1 RNA Expression. Die Ergebnisse dieser in vitro Studie stützen somit die These, dass gerade im niedrigen Dosisbereich, wie er in vivo in weit von den Stents entfernten Gefäßabschnitten auftritt, eine Stimulation von ICAM-1 in unverletzten Gefäßwandzellen erfolgt. HCMSMC und HCAEC stammen aus humanen Koronarien, während HUVEC aus Nabelvenen von Neugeborenen stammen. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der HUVECs nur bedingt auf die in vivo Situation bei Erwachsenen zu übertragen.

### **4.0 Auswirkungen der Brachytherapie im Tiermodell**

Dass selbst geringe Strahlendosen einen Effekt auf intrazelluläre und Zellmembran assoziierte Vorgänge haben können, berichten Eidus et al. (27). Hier wird beschrieben, wie schon

---

Strahlendosen von 2 Gy und weniger bei verschiedenen Zellen mesodermalen Ursprungs zu einer verstärkten intrazellulären metabolischen Aktivität und immunologischer Antwort führen. Zusätzliche Hinweise auf einen stimulierenden Effekt der Brachytherapie wurden von Virmani et al. (86) erzielt. Während in der vorliegenden Studie die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen der arteriellen Gefäßwand, Endothelzellen humaner Umbilikanvenen und glatten Muskelzellen der koronaren Media nach  $\gamma$ -Bestrahlung anschließender TNF- $\alpha$  Stimulation und einem 26-stündigen Intervall untersuchten, beobachtete die Gruppe von Virmani et al. (86) den Langzeiteffekt von  $\beta$ -Strahlung auf Schweinekoronarien nach 6 Monaten. Eine der humanen Koronarsklerose ähnliche, durch Strahlung verursachte Stenosebildung konnte in normalen Schweinekoronarien sechs Monate nach Applikation eines hochdosierte  $\beta$ -Strahlendosis emittierenden Stents simuliert werden. Endovaskuläre Brachytherapie führte hier bei niedriger Strahlendosis (10 Gy) zu einer paradoxen Gewebezunahme, wohingegen höhere Strahlendosen antiproliferativ wirkten. Weitere klinische und tierexperimentelle Studien untersuchten den Effekt der Radiatio nach unterschiedlich langen Zeitabständen. Powers et al. konnten in einem Hundemodell belegen, dass die intimale Proliferation in Hundeaorten nach intraoperativer Bestrahlung bei Strahlendosen  $>20$  Gy inhibiert werden konnte, jedoch durch eine Einzelgabe von weniger als 20 Gy oder einer fraktionierten Gabe stimuliert wurde. Die Fibrose der Adventitia stieg mit zunehmender Dosis an und trägt zum langfristigen vaskulären Remodeling bei. Schwere Folgeerscheinungen der Bestrahlung mit mehr als 20 Gy wurden jedoch erst nach 4-5 Jahren gefunden (65). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in dem in dieser Studie verwendeten in vitro Modell schon nach einem relativ kurzfristigen Zeitintervall gefunden. Hier fanden wir nach bereits 26 Stunden einer gesteigerte ICAM-1 Expression nach Applikation einer Strahlendosis kleiner 20 Gy. Lediglich bei HUVEC zeigte sich nach der Bestrahlung mit 20 Gy und 30 Gy eine geringere ICAM-1 Expression als in der unbestrahlte Vergleichsgruppe. In den beiden anderen Zelllinien HCMSMC und HCAEC stimulierte auch die Gabe von hohen Strahlendosen (20 und 30 Gy) die ICAM-1 Expression, ebenso wie geringe Strahlendosen, jedoch nicht so ausgeprägt.

Natürlich lässt sich das in vitro Modell nicht einfach auf die in vivo Langzeitsituation im Hundemodell bzw. einer klinischen Studie am Menschen übertragen, aber es scheint Hinweise darauf zu geben, dass es möglicherweise unmittelbar nach erfolgter Brachytherapie zu einem inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Zellwandzellen kommt, während vieles darauf

---

hindeutet, dass es als Langzeiteffekt zu einer Stimulation kommen konnte. Weiterhin kann darüber spekuliert werden, ob eine Bestrahlung möglicherweise zeitlich parallel sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte hat. Für den proliferationshemmenden Effekt in der Frühphase würde ein Überwiegen der inhibierenden Faktoren gegenüber den stimulierenden Faktoren sprechen, wobei in der Spätphase eine gegenläufige Gewichtung mit einem Überwiegen der stimulierenden Faktoren gegenüber den inhibierenden Parametern vorläge. Wie unsere Ergebnisse zeigen, erfolgen schon in der Frühphase nach der Bestrahlung, in unserem Fall 26h später, entscheidende Veränderungen durch die erhöhte Expression von ICAM-1 im Bereich des Endothel und der glatten Muskelzellen.

### **5.0 Funktion und Bedeutung von Endothelzellen bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen**

In dieser Studie wurde der Effekt von Brachytherapie auf die Expression von ICAM-1 bei Endothelzellen humaner Koronarien und Endothelzellen umbilikaler Venen untersucht. Endothelzellen bilden die innerste, dem Lumen zugewandte Schicht der Gefäße. Vielfältige Funktionen werden von der Endothelschicht ausgeführt. Eine intakte Schicht von ruhenden Endothelzellen verhindert eine Thrombusformation, die Rekrutierung von Leukozyten ins Gefäßgewebe, sowie die Proliferation und Migration der darunterliegenden Schicht von glatten Muskelzellen (61). Mehrere Berichte konnten den Beitrag des Endothels zur Entstehung einer neointimalen Hyperplasie beschreiben (5, 51). Nach mechanischer Verletzung werden Endothelzellen aktiviert und beginnen verschiedenste Oberflächenmoleküle, wie auch beispielsweise ICAM-1, Wachstumsfaktoren und Zytokine zu exprimieren (20, 32, 46, 50, 80). Einerseits fördern diese Faktoren das Wachstum von Endothel und Reendothelisierung von durch PTCA zerstörten Gefäßabschnitten, andererseits fördert aktiviertes Endothel auch die Umwandlung der darunterliegenden ruhenden glatten Muskelzellschicht in den proliferativen und migratorischen Typus mit konsekutiver intimalen Hyperplasie (17, 70, 83). Diese Studie untersucht die spezifische Rolle von ICAM-1 exprimiert durch Endothelzellen. Die vor allem im niedrigen Dosisbereich aufgezeigte Stimulierung scheint somit eine wichtige Rolle in der Genese der Re- und Kantenstenosen zu spielen.



---

## **6.0 Funktion und Bedeutung von ICAM-1 bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen**

Die besondere Bedeutung von ICAM-1 liegt in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül. Adhäsionsmoleküle erlauben Zellen sich an andere Zellen oder an Moleküle der extrazellulären Matrix zu binden (12, 26, 74, 79). Adhäsionsvorgänge werden für Zellen benötigt, um mit anderen Zellen interagieren und gegebenenfalls an den jeweiligen Bestimmungsort migrieren zu können. Neben ihrer wichtigen Funktion in immunologischen Vorgängen (Migration und Aktivierung von Leukozyten) spielen sie außerdem unter anderem in der embryonalen Entwicklung (zelluläre Interaktion und Migration) und Hämatopoese (Differenzierung von hämatopoetischen Zellen) eine Rolle. Im Bereich immunologischer Vorgänge wurden drei verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen beschrieben (74). Zu den ersten beiden Gruppen von Adhäsionsmolekülen zählen die Integrine und die Selectine. Integrine, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, vermitteln Zell-Zell-Kontakte, Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix sowie das Fortleiten von Signalen in die Zelle. Für ICAM-1 bestehen in der Gruppe der Integrine zwei Rezeptoren: LFA-1 (CD11a/CD18) und MAC-1 (CD11b/CD18), beide werden von Leukozyten exprimiert (22-24, 49, 74). Selectine werden von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Kommt es, durch die Bestrahlung verursacht, zu einer Entzündungsreaktion an der Gefäßwand, können Leukozyten sich an den von den Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmolekülen anlagern und sich in Blutflussrichtung mit niedriger Geschwindigkeit am Endothel entlang rollen. Durch das Rollen werden die Leukozyten aktiviert, binden stärker an das Endothel und migrieren letztendlich durch das Endothel in den extravaskulären Raum. Das langsame Rollen am Endothel entlang wird durch die ICAM-1 Expression der Endothelzellen (9, 16) und den CD18 Integrinen der Leukozyten vermittelt (44, 75). Wie diese hier vorliegende Studie zeigen konnte, wird diese Entzündungsreaktion durch die applizierte Strahlung wesentlich mitverursacht. Zusammen mit den ICAM-2 und ICAM-3 Molekülen zählt ICAM-1 zur Familie der Immunglobuline (76). ICAM-1 ist ein transmembranöses Glycoprotein und besteht aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen, genau wie ICAM-3, während ICAM-2 lediglich aus 2 Immunglobulin-ähnlichen Bausteinen (28, 30, 76) besteht. ICAM-1, -2, -3 sind eng miteinander verwandt und binden an denselben Integrin Rezeptor LFA-1 (Leukozytenfunktions assoziiertes Antigen) (11). Neben dem zellmembranassoziierten ICAM-

---

1 wurde auch noch eine im Plasma, Liquor und Sputum zirkulierende lösliche Form von ICAM-1 beschrieben: ICAM-1s (19, 84). Bei einer Reihe von Zellen wird ICAM-1 durchgehend exprimiert, wie beispielsweise bei Endothel-, Epithel-, dendritischen-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten (25). In Übereinstimmung besteht auch bei den von uns verwendeten Zelllinien HCMSMC, HUVEC und HCAEC eine stimulationsunabhängige Grundexpression. Bei anderen Zelllinien lässt sich die ICAM-1 Expression durch Zugabe verschiedener Stimulantien induzieren. Diesen Induktoren beinhalten unter anderem Zytokine, Steroide und physikalische Faktoren. TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und Interleukin-1(IL-1) scheinen die universalsten Induktoren der ICAM-1 Expression zu sein, während Glukocortikoide einen hemmenden Einfluss ausüben (77, 78). Eine Zeit- und Dosisabhängige Induktion der ICAM-1 Expression bei Endothelzellen durch TNF- $\alpha$  konnte in dieser Arbeit und durch vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe Voisard bestätigt werden (87). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 scheinen auch eine Rolle bei der erhöhten ICAM-1 Expression zu spielen, welche in gewöhnlich in atherosklerotischen Plaques gefunden wird (64). Erhöhte endotheliale ICAM-1 Expression könnte somit zu verstärkter fibrinogenen Ablagerung und monozytärer Bindung, gefolgt von einer subendothelialen Migration führen. Diese Vorgänge sind ein Schlüsselement in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (3, 42, 68). Wenige Stunden nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  kann bei Endothelzellen eine überhöhte ICAM-1 Expression nachgewiesen werden (25). Mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie lässt sich nun zeigen, dass sich diese Überexpression auch nicht durch Bestrahlung verhindern lässt. Weitere Studien sollten einen niedrigeren bzw. höheren Strahlendosisbereich untersuchen, oder die Expression von ICAM-1 durch Gabe von spezifisch gegen ICAM-1 gerichtete Antikörper verhindern, wie es bereits Mollà et al. (53) in einer experimentellen Studie versuchten. Durch Blockade der ICAM-1 Rezeptor kann die Anbindung von Leukozyten ans Endothel verhindert werden und dadurch eine effektive Unterbindung einer Entzündungsreaktion hervorgerufen werden.

### **7.0 Funktion und Bedeutung von glatten Muskelzellen bei der Entwicklung atherosklerotischen Plaques und Restenosen**

In der aktuellen Studie wurde die Expression von ICAM-1 in glatten Muskelzellen der humanen koronaren Media untersucht. Die Funktion von glatten Muskelzellen besteht im unverletzten Zustand der Gefäße darin, die Struktur und Kontraktilität der Gefäße aufrecht zu

---

erhalten. Im differenzierten kontraktile Zustand liegen sie eingebettet in der Gefäßwand, wo sie den einzigen Zelltyp darstellen. Bei der Pathogenese von Restenosen ist die Beteiligung von glatten Muskelzellen entscheidend. Restenosen werden durch neointimale Neubildung als Folge einer Migration von glatten Muskelzellen in die Intima verursacht, wo sie extrazelluläre Matrix produzieren und unverhältnismäßig stark proliferieren (5, 56). Das Ausmaß der intimalen Hyperplasie wird ebenfalls durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wesentlich bestimmt. Der Plättchen-abhängige Wachstumsfaktor (PDGF), der Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF, FGF-2), der vaskuläre Endothel Wachstumsfaktor (VEGF), Interleukin-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Interleukin-8 werden als sofortige Antwort auf Verletzung produziert und wird von einer Koagulation, Entzündungsreaktion, Rekrutierung und Aktivierung von im Blut zirkulierenden Leukozyten, einer mesenchymalen Zellmigration und Proliferation, sowie einer Produktion extrazellulärer Matrix gefolgt (14, 56, 73). Bisher ging man davon aus, dass eine intakte Schicht von ruhenden Endothelzellen eine Thrombusformation verhindert und die Rekrutierung von Leukozyten in das Gewebe sowie die Proliferation der unter der Endothelschicht liegenden glatten Muskelzellen unterdrückt (61). Nach mechanischer Verletzung oder, wie in dieser Studie aufgezeigt, durch Applikation von Strahlen beeinflusste Endothel und glatte Muskelzellen werden aktiviert und exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, Wachstumsfaktoren and Zytokinen (46, 50, 80). Zusätzlich führt dies dazu, dass die glatten Muskelzellen von ihrem kontraktile Phänotyp in den migratorischen und proliferativen Typus wechseln und für eine neointimale Schichtzunahme sorgen (17, 70, 83). Die hier beschriebene erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen konnte so in Übereinstimmung mit den von uns mittels für ICAM-1 kodierenden erhöhten RNA Nachweis nach Bestrahlung ebenso gezeigt werden und spricht folglich für das Model, welches davon ausgeht, dass niedrige Strahlendosen die Gefahr von Restenosen zusätzlich erhöhen.

### **8.0 Beobachtung der Expression von Oberflächenmolekülen nach Bestrahlung und Stimulierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten**

Zur Beobachtung der Expression von Oberflächenmolekülen nach Bestrahlung und Stimulierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchten mehrere vergleichbare Studien die Expression von proinflammatorischen Oberflächenmolekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen in humanem Endothel und glatten Muskelzellen. Übereinstimmend berichten viele Autoren, dass die ICAM-1 Expression sich durch Bestrahlung erhöhen läßt. Lediglich über

---

den Zeitpunkt der Höherregulierung wird diskutiert. Wir konnten eine Induktion 26h nach Radiatio in allen drei untersuchten Zelllinien nachweisen. Wondergem et al. (92) berichten mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmend, über eine erhöhte Expression von ICAM-1 in mechanisch verletzten und mit einer Einzeldosis von 15 Gy bestrahlten humanen arteriellen Endothelzellen, welche aus Nabelarterien gewonnen wurden. Die Expression wurde mittels Flow Cytometrie 24 Stunden nach Bestrahlung ermittelt. In der vorliegenden Studie wurde die ICAM-1 Expression auf RNA Ebene nach einem vergleichbaren Zeitraum von 26h lediglich nach Bestrahlung, jedoch zusätzlicher Stimulierung mit TNF- $\alpha$  bestimmt. In Übereinstimmung mit der Studie von Wondergem (92) zeigte sich auch in dieser Studie eine erhöhte Expression von ICAM-1. Hildebrandt et al. (40) untersuchten die Expression von ICAM-1 bei Endothelzellen nach Bestrahlung zwischen 0,3 und 10 Gy zu verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich, dass Bestrahlung die Expression von Zelladhäsionsmolekülen bei Endothelzellen in vitro stimulieren lässt. Wobei bei Bestrahlung mit weniger als 5 Gy die Veränderungen der ICAM-1 Expression nur gering gegenüber der lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierten war. Über ähnliche Befunde berichten sowohl Bevilacqua et al. (10) als auch Thornhill et al. (82). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der aktuellen Studie. Hier lies sich durch Applikation von  $\gamma$ -Strahlung gerade im niedrigen Dosisbereich eine im Vergleich zu den lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen eine erhöhte ICAM-1 Expression erkennen. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch die Verwendung eines anderen Endothelzelltypus (EA hy 926) und der doppelten Menge von TNF- $\alpha$  verglichen zu Hildebrandt et al. (40) erklären. Eine Induktion von ICAM-1 nach Bestrahlung mit Dosen > 2Gy wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie und auch den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen beobachtet. So beschrieben Hallahan et al. (36) eine Erhöhung bereits nach 24h, dagegen beobachteten, abweichend von den Resultaten dieser Studie, Gaugler et al. (33) sowie Quarmby et al. (67) eine signifikante Steigerung der Expression erst nach 48h. Diese Überexpression scheint nach Gaugler et al. (33) auch noch 10 Tage nach Bestrahlung zu bestehen. Somit scheint ICAM-1 schon in der Frühphase der Entzündungsreaktion die Rekrutierung von Leukozyten zu vermitteln aber ebenso einen langandauernden Effekt zu besitzen. Unabhängig vom Vorhandensein von TNF- $\alpha$  oder IL-1 beobachteten Behrends et al. (7) interessanterweise, dass die Bestrahlung mit 10 Gy in Endothelzellen ICAM-1 ebenfalls induziert. Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen erfordert dieser Studie zufolge somit keine autokrine Stimulation durch freigesetzte Zytokine. Von Prabhakarpanadian et al. (66)

---

wurde berichtet, dass ICAM-1 nach Einzeldosisbestrahlung mit 10 Gy bei humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), HUVEC und transformierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) hochreguliert wird. In dieser Studie wurde die ICAM-1 Expression zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 5h und 72h nach Radiatio untersucht. Diese Gruppe fand genau wie Gaugler et al. (33) und Quarmby et al. (67) eine Steigerung der ICAM-1 Expression bei HUVEC erst nach 48h, und steht damit im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und der von Hallahan et al. (36). Bei HMEC-1 wurde in der Studie von Prabhakarandian et al. (66) ebenso erst eine Induktion von ICAM-1 nach 48h entdeckt. Bei HDMEC wurde jedoch in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen und denen von Heckmann et al. (37) eine Zeit- und Dosisabhängige starke Induktion der ICAM-1 Expression gefunden. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die Verwendung der jeweiligen Strahlenquelle, der Dosisstärke sowie der Art der Applikation erklären. Zusätzlich wurden Endothelzellen verschiedener Herkunft verwendet, sowie der molekularbiologische Nachweis der Expression von ICAM-1 mit verschiedenen Methoden geführt.

### **9.0 Zusammenfassende Beurteilung der ICAM-1 Expression nach Radiatio als Ursache einer Atherosklerose- und Kantenstenosen- Bildung**

Die vorgelegten Daten belegen, dass eine erhöhte Expression von entzündungsfördernden Oberflächenmolekülen wie ICAM-1 in humanen Koronarien das Risiko einer Restenose nach endovaskulärer Brachytherapie erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass Bestrahlung zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 führt. Dies gilt als ein wichtiger Baustein in der Kaskade von Entzündungsvorgängen, welche schließlich zu Atherosklerose bzw. Kantenstenosen führen kann. Weitere experimentelle Studien sollten den weiteren Ablauf dieser Kaskade genauer abklären bzw. Gegenstrategien entwickeln, welche antagonistisch auf die ICAM-1 Expression wirken können. Gentechnisch veränderte Mäuse, denen der ICAM-1 Rezeptor fehlt oder deren Rezeptor durch ICAM-1 Antikörper blockiert, fielen durch eine ausbleibende Entzündungsreaktion auf. Dies könnte ein möglicher Therapieansatz sein (34). Genauere Untersuchungen der Steuerung von Adhäsionsmolekülen und deren Funktion sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Das in dieser Studie verwendete in vitro Modell versucht die in vivo Situation genau nachzustellen. Ebenso entsprechen die von uns verwendeten Strahlendosen den klinisch relevanten Dosen. Trotzdem ist bei der Interpretation der Ergebnisse Vorsicht geboten, da die in vivo Vorgänge der Atherogenese bzw.

---

Kantenstenosenbildung weitaus komplexer sind, so dass mit unserem Modell nur ein kleiner Teilaspekt des komplexen Geschehens aufgedeckt werden konnte. Zusätzlich werden noch andere, von uns nicht verwendete Zellreihen und im Serum zirkulierende Wachstumsfaktoren und Zytokine bei der in vivo Antwort auf Radiatio eine Rolle spielen. Auch wurde in dieser Studie nur ein Zeitpunkt gewählt, um die Expression von ICAM-1 zu bestimmen. In vivo findet die Entzündungsreaktion jedoch ebenso zu früheren und auch späteren Zeitpunkt statt. Dennoch liefern diese Ergebnisse wichtige Hinweise, die einen Beitrag zum Verständnis der Restenosebildung führen können. Sollten wirksame Gegenstrategien zur Entzündungsreaktion der bestrahlten Gefäßwandzellen entwickelt werden, könnte die elegante Methode der PTCA mit anschließender Brachytherapie weiter effektiv eingesetzt werden.

---

## F. Zusammenfassung

Das Auftreten von Restenosen nach koronarer Intervention und erfolgter Dilatation konnte in experimentellen und klinischen Studien durch die Anwendung von  $\gamma$ -Strahlung vermieden werden. Als Reaktion auf eine koronare Intervention kommt es im dilatatierten Gebiet zu einer komplexen Entzündungsreaktion. Ein entscheidender Mechanismus dieser Entzündungskaskade ist die ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) vermittelte Adhäsion zirkulierender Monozyten. Der Effekt von  $\gamma$ -Strahlung auf die ICAM-1 Expression wurde in dieser Studie untersucht. Hierzu wurden humane koronare Endothelzellen (HCAEC), humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) und humane koronare glatte Muskelzellen der Media (HCMSMC) verwendet. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen mit 0,5, 1, 10, 20 und 30 Gy bestrahlt. Nach Applikation der Bestrahlung wurden die Zellen für 20h inkubiert und anschließend erfolgte mit 20ng/ml TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ) die Stimulation der ICAM-1 Expression. Als Referenz diente eine lediglich mit TNF- $\alpha$  stimulierte jedoch nicht bestrahlte Zellkultur zum Vergleich. Nach der sechsständigen Stimulation wurde die Gesamt-RNA durch das RNEasy Mini Kit (Quiagen) isoliert. Nun wurde die relative Bandenintensität der sowohl bestrahlten als auch mit TNF- $\alpha$  stimulierten ICAM-1 mRNA im Vergleich zur lediglich stimulierten jedoch unbestrahlten Kontrolle gesetzt. Als Ergebnis lies sich feststellen, dass bei HCAEC und HCMSMC durchgängig eine Stimulation der ICAM-1 Expression erfolgte, welche vor allem im Bereich der niedrigen Strahlendosierung (0,5 und 1 Gy) besonders ausgeprägt war. Eine signifikante Stimulation der ICAM-1 Expression wurde nach Bestrahlung mit 1 Gy bei HCAEC gefunden. Ebenso wurde bei HCMSMC im niedrigen Strahlendosisbereich eine Stimulation der ICAM-1 RNA Expression beobachtet, welche allerdings weniger stark als in den anderen beiden Zellreihen ausgeprägt war. Die Applikation von hohen Strahlendosen (10, 20, und 30 Gy) führte bei HUVEC zu einer Inhibition der ICAM-1 RNA Expression. Die in vitro Daten weisen darauf hin, dass nach Applikation von  $\gamma$ -Strahlung bei HUVEC, HCAEC und HCMSMC eine Stimulation der ICAM-1 mRNA Expression auftritt, welche bei niedriger Bestrahlung (0,5 Gy und 1 Gy) stärker ausgeprägt ist. Dieses Phänomen könnte sowohl für das Auftreten der Kantenstenosen als auch, nach entsprechender Änderung

der Bestrahlungstechnik zur Verhinderung der Kantenstenosen, für das Auftreten der Restenosen im unbehandelten Gebiet von Bedeutung sein.



---

## G. Literaturverzeichnis

- 1) Albiero R, Adamian M, Kobayashi N, Amato A, Vagheti M, Di Mario C, Colombo A. Short- and intermediate-term results of  $^{32}\text{P}$  radioactive  $\beta$ -emitting stent implantation in patients with coronary artery disease. The Milan dose-response study. *Circulation* 101:18-26 (2000)
- 2) Albiero R, Nishida T, Adamian M, Amato A, Vagheti M, Corvaja N, Di Mario C, Colombo A. Edge restenosis after implantation of high activity  $^{32}\text{P}$  radioactive  $\beta$ -emitting stents. *Circulation* 101:2454-2457 (2000)
- 3) Altieri DC, Duperray A, Plescia J, Thornton GB, Languino LR. Structural recognition of a novel fibrinogen  $\gamma$  chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem* 270:696-699 (1995)
- 4) Apisarnthanarax S, Chougule P. Intravascular Brachytherapy. A review of the current vascular biology. *Am J Clin Oncol* 26:e13-e21 (2003)
- 5) Bauters C, Meurice T, Hamon M, FcFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME. Mechanism and the prevention of restenosis : from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res* 31:835-846 (1996)
- 6) Baweja G, Kamineni R, Butman S. Unexpected adverse effects of coronary brachytherapy remote from intended target. *J Invasive Cardiol* 17:94-95 (2005)
- 7) Behrends U, Peter RU, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Holler E, Bornkamm GW, Caughman S.W, Degitz K. Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *J Invest Dermat* 103:726-730 (1994)

- 
- 8) Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243:1160-1165 (1989)
  - 9) Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767-804 (1993)
  - 10) Bevilacqua MP, Nelson RM. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemostasis* 70:152-154 (1993)
  - 11) Binnerts ME, van Kooyk Y, Simmons DL, Figdor CG. Distinct binding of T-lymphocytes to ICAM-1,-2,-3 upon activation of LFA-1. *Eur J Immunol* 24:2155-2160 (1994)
  - 12) Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036 (1991)
  - 13) Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in the arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Path* 42:139-162 (1985)
  - 14) Caplice NM, Aroney CN, Bett JH, Cameron J, Campbell JH, Hoffmann N, McEniery PT, West MJ. Growth factors released into coronary circulation after vascular injury promote proliferation of human vascular smooth muscle cells in culture. *J Am Coll Cardiol* 29:1536-1541 (1997)
  - 15) Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, Harlan JM. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 76:965-970 (1990)
  - 16) Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101 (1994)

- 
- 17) Chamley-Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 40:347-357 (1981)
  - 18) Cheneau E, Waksman R, Yazdi H, Chan R, Fourdnadjiev J, Berzingi C, Shah V, Ajani AE, Leborgne L, Tio FO. How to fix the edge effect of catheter-based radiation therapy in stented arteries. *Circulation* 106:2271-2277 (2002)
  - 19) Chihara J, Yamamoto T, Kurachi D, Nakajima S. Soluble ICAM-1 in sputum of patients with bronchial asthma. *Lancet* 343:1108 (1994)
  - 20) Collo G, Pepper MS. Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during imigration in vitro. *J Cell Sci* 112:569-578 (1999)
  - 21) Crocker I, Robinson KA. Rationale for coronary artery radiation therapy. *Semin Rad Onc* 12,1:3-16 (2002)
  - 22) Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54) : a counter-receptor for MAC-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111:3129-3139 (1990)
  - 23) Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer DA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glykosylation. *Cell* 65:961-971 (1991)
  - 24) Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecule mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 120:545-556 (1993)
  - 25) Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and Interferon -  $\gamma$ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-254 (1986)

- 
- 26) Dustin ML. Two-way signalling through the LFA-1 lymphocyte adhesion receptor. *Bioessays* 12:421-427 (1990)
- 27) Eidus L. Hypothesis regarding a membrane-associated mechanism of biological action due to low-dose ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 39:139-195 (2000)
- 28) Fawcett J, Holness CLL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, Simmons DL. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360:481-484 (1992)
- 29) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent restenosis study investigators. *N Engl J Med* 331:496-501 (1994)
- 30) Fougerolles de AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 175:185-190 (1992)
- 31) Franklin SM, Faxon DP. Pharmacologic prevention of restenosis: Review of the randomized clinical trials. *Coron Artery Dis* 4:232-242 (1993)
- 32) Gajdusek CM, Luo Z, Mayberg MR. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 157:133-144 (1993)
- 33) Gaugler MH, Squiban C, Meeren van der A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 72:201-209 (1997)

- 
- 34) Giessen van Der WJ, Regar E, Hartevelde MS, Coen VL, Bhagwandien R, Au A, Levendag PC, Ligthart J, Serruys PW, den Boer A, Verdouw PD, Boersma E, Hu T, van Beusekom HM. "Edge effect" of  $^{32}\text{P}$  radioactive stents is caused by the combination of chronic stent injury and radioactive dose falloff. *Circulation* 104:2236-2241 (2001)
- 35) Grüntzig AR. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis (letter to the editor). *Lancet* 1:263-264 (1978)
- 36) Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res* 56:5150-5155 (1996)
- 37) Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp Cell Res* 238:148-154 (1998)
- 38) Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158:1825-1832 (1997)
- 39) Henseleit U, Steinbrink K, Sunderkotter C, Goebeler M, Roth J, Sorg C. Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: Correlation with immigration of monocytes. *Exp Dermatol* 3:249-256 (1994)
- 40) Hildebrandt G, Maggiorella L, Rödel F, Rödel V, Willis D, Trott KR. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after x-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 78:315-325 (2002)
- 41) Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndroms of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle proliferation. *J Am Coll Cardiol* 15:1667-1687 (1990)

- 
- 42) Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway. *Cell* 73:1423-1434 (1993)
- 43) Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE. Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med* 344:250-256 (2001)
- 44) Lusinskas FW, Gimbrone MAJ. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med* 47:413-421 (1996)
- 45) Kim HS, Waksman R, Cottin Y, Kollum M, Bhargava B, Mehran R, Chan RC, Mintz GS. Edge stenosis and geographical miss following intracoronary gamma radiation therapy for in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 37:1026-1030 (2001)
- 46) Kim SC, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells. Implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2085-2093 (1999)
- 47) Maeng M, Busk M, Tanderup K, Mertz H, Andersen HR, Thuesen L. Catheter-based 32P  $\beta$ -radiation after stent implantation in porcine coronary arteries: role of source-centering and geographical miss. *Cathet Cardiovasc Intervent* 60:247-257 (2003)
- 48) Mannebach H, Hamm Ch, Horstkotte D. 18. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. *Z Kardiol* 91:727-729 (2002)
- 49) Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813-819 (1987)
- 50) McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Armour PA. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol* 109:811-822 (1989)

- 
- 51) Meurice T, Vallet B, Bauters C, Dupuis B, LaBlanche JM, Bertrand ME. Role of endothelial cells in restenosis after coronary angioplasty. *Fundam Clin Pharmacol* 10:234-242 (1996)
- 52) Mollà M, Panés J, Casadevall M, Salas A, Conill C, Biete A, Anderson DC, Granger DN, Pique JM. Influence of dose-rate on inflammatory damage and adhesion molecule expression after abdominal radiation in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:1011-1018 (1999)
- 53) Mollà M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biete A, Piqué JM, Panés J. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation induced intestinal inflammation. *Int J Radial Oncol Biol Phys* 57:264-273 (2003)
- 54) Muller DW, Ellis SG, Topel EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 19:418-432 (1992)
- 55) Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. Induction of ICAM-1 by TNF- $\alpha$ , IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 263:C767-C772 (1992)
- 56) Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 190:300-309 (2000)
- 57) Norris PG, Barker JN, Allen MH, Leiferman KM, MacDonald DM, Haskard DO, Hawk JL. Adhesion molecule expression in polymorphic light eruption. *J Invest Dermatol* 99:504-508 (1992)
- 58) Old L. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230:630-632 (1985)
- 59) Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 269:1955-1964 (1995)

- 
- 60) Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114:1066-1090 (1998)
- 61) Pearson JD. Endothelial cell biology. *Radiology* 179:9-14 (1991)
- 62) Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA Jr. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 138:3319-3324 (1987)
- 63) Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 84:1426-1436 (1991)
- 64) Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140:665-673 (1992)
- 65) Powers BE, Thames HD, Gillette EL. Long-term adverse effects of radiation inhibition of restenosis: radiation injury to the aorta and branch arteries in a canine model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:753-759 (1999)
- 66) Prabhakarandian B, Goetz D.J, Swerlick R.A, Chen X, Kiani M.F. Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation* 8:355-364 (2001)
- 67) Quarmby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 82:385-395 (1999)
- 68) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809 (1993)



- 
- 69) Royall JA, Berkow RL, Beckman JS, Cunningham MK, Matalon S, Freeman BA. Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability *Am J Physiol* 257:399-410 (1989)
- 70) Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatayeyama K, Sumiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 75:389-392 (1996)
- 71) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in the patients with coronary artery disease. Benestent study group. *N Engl J Med* 331:489-495 (1994)
- 72) Syeda B, Siostrzonek P, Schmid R, Wexberg P, Kirisits C, Denk S, Beran G, Khorsand A, Lang I, Pokrajac B, Potter R, Glogar D. Geographical miss during intracoronary irradiation: impact on restenosis and determination of required safety margin. *J Am Coll Cardiol* 40:1225-1231 (2002)
- 73) Simon DI, Dhen Z, Seifert P, Edelman ER, Ballantyne CM, Rogers C. Decreased neointimal formation in Mac-1 (-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest* 105:293-300 (2000)
- 74) Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434 (1990)
- 75) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314 (1994)
- 76) Staunton DE, Dustin ML, Springer TA,. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339:61-64 (1989)
- 77) Stolpe A van de, Caldenhoven E, Raaijmakers JA, Saag PT van der, Koenderman L. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:340-347 (1993)

- 
- 78) Stolpe A van de, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JAM, Johnson JP, Saag PT van der. 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone: functional analysis of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter. *J Biol Chem* 269:6185-6192 (1994)
- 79) Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455 (1991)
- 80) Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation* 88:1788-1803 (1993)
- 81) Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 336:1697-1703 (1997)
- 82) Thornhill MH, Li J, Haskard DO. Leukocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA.hy.926. *Scand J Immunol* 38:279-286 (1993)
- 83) Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Drjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 281:421-433 (1995)
- 84) Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 43:2679-2682 (1993)

- 
- 85) Verin V, Popowski Y, de Bruyne B, Baumgart D, Sauerwein W, Lins M, Kovacs G, Thomas M, Calman F, Disco C, Serruys PW, Wijn W. Endoluminal  $\beta$ -radiation therapy for the prevention of coronary restenosis after balloon angioplasty. The Dose-Finding Study Group. *N Engl J Med* 344:243-249 (2001)
- 86) Virmani R, Farb A, Carter AJ, Jones RM. Comparative pathology: radiation-induced coronary artery disease in man and animals. *Semi Intervent Cardiol* 3:163-172 (1998)
- 87) Voisard R, Oßwald M, Baur R, Jakob U, Susa M, Mattfeldt T, Hemmer W, Hannekum A, Koenig W, Hombach V. ICAM-1 expression in human coronary endothelial and smooth muscle cells after stimulation with TNF- $\alpha$  . *Coron Artery Dis* 9:737-745 (1998)
- 88) Waksman R, Robinson K, Crocker I, Gravanis M, Cipolla G, King S. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. A possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circulation* 91:1533-1539 (1995)
- 89) Waksman R, Bhargava B, White L, Chan R, Mehran R, Lansky AJ, Mintz GS, Satler LF, Pichard AD, Leon MB, Kent KK. Intracoronary  $\beta$ -radiation therapy inhibits recurrence of in-stent restenosis. *Circulation* 101:1895-1898 (2000)
- 90) Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces restenosis after balloon angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 23:1491-1498 (1994)
- 91) Wilentz JR, Sanborn TA, Haundenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 75:636-642 (1987)

- 92) Wondergem J, Wedekind LE, Bart CI, Chin A, Laarse van der A, Beekhuizen H. Irradiation of mechanically-injured human arterial endothelial cells leads to increased gene expression and secretion of inflammatory and growth promoting cytokines. *Atherosclerosis* 175:59-67 (2004)
- 93) Wong CS, Leon MB, Popma JJ. New device angioplasty: The impact on restenosis. *Coron Artery Dis* 4:243-253 (1993)

---

## H. Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin II der Universitätsklinik und Poliklinik durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt daher dem Leiter dieser Abteilung Herrn Professor Dr. Hombach, durch dessen Unterstützung und Förderung diese Arbeit ermöglicht wurde.

Großen Dank spreche ich auch Herrn PD Dr. Voisard aus, nach dessen Idee und unter dessen Betreuung diese Dissertation entstand. Für die Bereitstellung des Labors und der benötigten Materialien sowie die ständige Unterstützung während der Entstehung dieser Studie möchte ich mich bedanken. Anstehenden Problemen und Fragen stand PD Dr. Voisard stets hilfsbereit und offen gegenüber. Für die Schaffung einer äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre möchte ich besonders danken.

Ebenfalls sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Regine Baur, die mich bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit jederzeit tatkräftig und verlässlich unterstützte. Bei der Erlernung der angewandten Methoden und des gesamten organisatorischen Ablaufs war Frau Baur eine äußerst zuverlässige Stütze. Allen offenen Fragen stand Frau Baur stets als kompetente Ansprechpartnerin zur Verfügung. Daneben trug Frau Baur ebenso zur Entstehung einer sehr freundlichen Arbeitsatmosphäre bei.

Großen Dank auch Herrn Professor Dr. Röttinger der Abteilung Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik und Frau Dipl. –Phys. Uta Machold und Herrn Dr. rer. nat. Peter Blank für deren Zusammenarbeit bei der Bestrahlung der Gefäßwandzellen.

Der größte Dank gebührt meiner Familie für die Ermöglichung des Studiums der Humanmedizin, der Gestaltung dieser Arbeit und die immerwährende liebevolle Unterstützung in sämtlichen Lebensbereichen.

---

## I. Lebenslauf

### Persönliches:

---

Name: Dirk Wiegmann  
Geboren am: 16.09.1977  
In: Ludwigshafen am Rhein  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung:

---

1985 – 1989 Grundschule Plochingen  
1989 – 1997 Gymnasium Plochingen  
18.06.1997 Abitur am Gymnasium Plochingen

### Zivildienst:

---

01.11.1997 – 30.11.1998 Zivildienst im Pflegebereich einer internistischen Abteilung des Kreiskrankenhaus Plochingen

### Studium:

---

15.10.1999 Immatrikulation an der Universität Ulm und Beginn des Studiums der Humanmedizin  
03.09.2001 Erfolgreiches Absolvieren der Ärztlichen Vorprüfung  
19.09.2002 Erfolgreiches Absolvieren des 1. Staatsexamen  
30.03.2005 Erfolgreiches Absolvieren des 2. Staatsexamen

---

**Famulaturen:**

---

Innere Medizin, Kardiologie	Städtische Kliniken Esslingen am Neckar (2002)
Radiologie und Nuklearmedizin	Praxis Metz/Unger/Pala Esslingen am Neckar (2002)
Anästhesie und Operative Intensivmedizin	Städtische Kliniken Esslingen am Neckar (2003)
Chirurgie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie	Charité, Campus Virchowklinikum der Humboldt Universität zu Berlin (2003) und Universitätsklinikum Ulm (2004)

---

**Praktisches Jahr:**

---

Orthopädie:	University of British Columbia, Vancouver, Kanada (2 Monate) und Karl - Olga Krankenhaus, Stuttgart (2 Monate)
Chirurgie:	Universidad Nacional Autónoma, Tegucigalpa, Honduras (4 Monate)
Innere Medizin:	Karl - Olga Krankenhaus, Stuttgart (4 Monate)

---

**Dissertation:**

---

„Der Effekt von  $\gamma$ -Strahlung auf die ICAM-1 Expression bei humanen koronaren Gefäßwandzellen“

Experimentelle Arbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Ulm, Abteilung Innere Medizin II (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. V. Hombach) unter Betreuung von PD Dr. R. Voisard.