

Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Ulm

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Der Effekt von Mycophenolatmofetil auf die
Restenoseentwicklung in einem koronaren
Organkultur – Modell des Hausschweines
(POC- Modell)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

Sandra Viola

aus Bruchsal

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Ludwig

Tag der Promotion: 11. Mai 2006

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die reaktive Kinetik der Muskelzellen.....	1
1.2 Das Medikament Mycophenolatmofetil und die Restenoseentwicklung.....	2
1.3 Ex vivo Restenose-Modelle.....	3
2. MATERIAL.....	4
2.1 Präparation, Kultivierung und Medikamentenzugabe.....	4
2.2 Aufarbeitung.....	6
2.3 Immunhistologie.....	7
2.4 Auswertung.....	9
3. METHODEN.....	10
3.1 Versuchsmaterial.....	10
3.2 Dilatation von Koronararterien vom Schwein.....	10
3.3 Kontrollsegmente.....	10
3.4 Kultivierung der Schweine Organkultur.....	10
3.5 Zugabe des Medikamentes MMF.....	11
3.6 Markierung mit Bromdesoxyuridin.....	11
3.7 Fixierung.....	12
3.8 Aufarbeitung.....	12
3.9 Elastika-van Gieson-Färbung.....	12
3.10 Immunhistologie.....	13
3.11 Auswertung.....	14
3.12 Statistische Analyse.....	16
4. ERGEBNISSE.....	17
4.1 Kultivierung von Koronararterien vom Schwein.....	17
4.2 Zellproliferation in der Schweine Organkultur mit MMF.....	17

4.3 Morphometrische Auswertung der Schweine Organkultur mit MMF.....	22
4.4 Glattmuskuläres α -Aktin-Muster der Schweine Organkultur	25
4.5 Von Willebrand-Faktor-Nachweis in der Schweine Organkultur.....	28
5. DISKUSSION.....	30
5.1 Ex vivo Organkultur-Modell	31
5.2 Der Effekt von Mycophenolatmofetil im POC-Modell.....	32
5.3 Mögliche Ursachen der fehlenden Wirkung von Mycophenolatmofetil.....	35
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	36
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	38
8. ANHANG.....	46
8.1 Abbildungen.....	46
8.2 Tabellen.....	46
9. DANKSAGUNG.....	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	= Abbildung
Adventitia	= Tunica Adventitia
AEC	= 3-Amino-9-Ethylcarbazole
Alpha (α)-SM-Aktin	= Alpha-Aktin der glatten Muskelzellen
Aqua bidest.	= zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	= destilliertes Wasser
BRDU	= 5-Bromo-2-Deoxyuridin
DMEM	= Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
d-cyt.	= Desoxycytidin
EC	= Endothelzelle
EVG	= Elastika-van Gieson-Färbung
Fcs	= fetales Kälberserum
HCMSMC	= Human coronary media smooth muscle cells
HCAEC	= Human coronary artery endothelial cell
HEPES	= N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N-ethansulfonsäure
HOC	= human organ culture
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule-1
IMPDH	= Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
Intima	= Tunica intima
LDL	= Low Density Lipoprotein
MPA	= Mycophenolsäure
Media	= Tunica media
MC	= Monozyten

MMF	= Mycophenolatmofetil
Neointima	= nach Gefäßverletzung neu entstandene Intimaanteile, die das Lumen verengen
P	= Penicillin
POC	= Schweine Organkultur
PBS ⁺	= Phosphate Buffered Saline mit Calcium und Magnesium
PBS ⁻	= Phosphate Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium
PS	= Penicillin/Streptomycin
PTCA	= perkutane transluminale koronare Angioplastie
RIVA	= Ramus interventricularis anterior
S	= Streptomycin
SI/MPL-Ratio	= significant inhibition/maximal plasma level
SD	= Standardabweichung
SMC	= glatte Muskelzelle
SRL	= Sirolimus
VIP	= Vakuum – Infiltrations - Prozessor
VWF	= von Willebrand-Faktor
WM/F12	= Waymouth`s Medium / Ham`s F12 Nutrient Mixture
XM	= Mittelwert

1. Einleitung

Eine der erfolgversprechenden Behandlungen koronarer Erkrankungen ist die Angioplastie (10) und Stentimplantation (16). Verschiedene Strategien wurden entwickelt, um die In-stent Restenose zu reduzieren, die vorherrschende Methode ist die Implantation von beschichteten Stents (65). 10-40% der Patienten erkranken an einer In-stent Restenose. Beschichtete Stents sind aufgrund ihrer aufwendigen Herstellung kostenintensiv und bei multi-Gefäßerkrankungen problematisch, zeigen aber aktuell sehr überzeugende Ergebnisse (5). Mit Hinsicht auf die hohen Kosten, die bei einer Mehrgefäßerkrankung auftreten würden, untersucht die vorliegende Arbeit den systemischen Therapieansatz der Restenose.

1.1. Die reaktive Kinetik der glatten Muskelzellen

Eines der charakteristischen Merkmale bei der Restenoseentstehung ist die Ansammlung von glatten Muskelzellen (SMC) in der Neointima (3, 36, 24). Während einer Ballonangioplastie kommt es zur Gefäßverletzung und anfangs zum Untergang von SMC in der Media (11). Daraufhin folgen verschiedene zelluläre Aktivitäten: 1) Es kommt zur weiteren Proliferation im subendothelialen Raum durch Einwandern von SMC in die Media, sowie zu einer Migration einer Subpopulation der Media-SMC im subendothelialen Raum. 2) zur Proliferation intimaler SMC, 3) der Produktion extrazellulärer Matrix von SMC des synthetischen Phänotypes und 4) zum vaskulären Remodelling, einschließlich der Entfernung überschüssig produzierter extrazellulärer Matrix durch Metalloproteasen (MMPs). Die letztendliche Einengung des Gefäßlumens findet wahrscheinlich durch eine Kombination dieser Ereignisse statt (9). Dartsch et al. (12, 13) legten dar, dass die Proliferation von SMC aus restenosierendem Plaquematerial deutlich erhöht ist, was durch Pickering et al. (24, 25) bestätigt wurde.

Diese Vorgänge werden durch komplexe Faktoren initiiert, es sind eine große Zahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt (1, 29, 42, 43, 63).

Da Wechselwirkungen (crosstalk) zwischen den verschiedenen Signalwegen auftreten können, ist es jedoch schwierig, durch die Inhibition eines einzelnen Aktivierungsweges die Effekte auf der gesamten gemeinsamen Endstrecke zu hemmen (30).

Seit zweieinhalb Jahrzehnten ist die Inhibition der reaktiven Zellproliferation nach Verletzung der Gefäßwand durch die systemische Gabe von Medikamenten ein erklärtes therapeutisches Ziel.

1.2. Das Medikament Mycophenolat-Mofetil (MMF) und die Restenoseentwicklung

Charakteristisch für die Restenoseentwicklung sind Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und das Anhäufen von extrazellulärer Matrix. Der molekulare Mechanismus, welcher der Restenose unterliegt, wird hauptsächlich durch Entzündungsmediatoren wie den Zytokinen geregelt (12).

MMF gehört zur Gruppe der Immunsuppressiva und ist eine Vorstufe der Mycophenolsäure (MPA). MMF hat antiproliferative Effekte, die schon bei Zellen beschrieben worden sind (34), die nicht dem Immunsystem angehören.

In einem 3D–Leukozyten-Angriffs-Modell humaner koronarer Gefäßwandzellen wurden die Effekte von MMF auf Monozyten (MC) Adhäsion und Chemotaxis und reaktive Zellproliferation glatter Muskelzellen untersucht (59). Da MMF bei Transplantationen mit Erfolg angewendet wird, liegt die Annahme nahe, MMF auch bei der Restenose wegen seiner antiinflammatorischen Wirkung in Koronararterien anzuwenden (26). MMF ist nicht nur eine Vorstufe der Mycophenolsäure (MPA), sondern auch ein reversibler Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welches ein Enzym in der Synthese von Guanosin Nukleotiden ist (66, 34). Guanosin Nukleotide sind notwendig zur DNA und RNA Synthese und zur maximalen Lymphozytenproliferation nach Stimulation (66).

MPA ist ein Produkt des Penicillin-Pilzes. 1896 wurde MPA aus dem Pilz isoliert. Die Substanz MPA zeigt anti-neoplastische, anti-virale, anti-fungale und immunsuppressive Aktivität (32).

Bei einem Aortentransplantationsmodell der Ratte (41) unterdrückte MMF alle histologischen Anzeichen transplantationsbedingter Arteriosklerose wie der Entzündung der Adventitia, der Medianekrose und der Intimaverdichtung.

In der Replikationsrate trat eine signifikante Reduktion von Entzündungszellen in der Adventitia und den glatten Muskelzellen (SMC) in der Media auf. Ebenso war die SMC alpha-Aktin Färbung signifikant erniedrigt (41).

Morath et al. (34) legten dar, dass MMF die Proliferation von B- und T- Lymphocyten hemmt und deshalb bei akuten und chronischen Erkrankungen angewendet werden könnte. Neuere Studien zeigen zusätzlich, dass MMF auch nicht - immune Zellen in der Proliferation hemmt. Ein Beispiel dafür sind glatte Muskelzellen. Morath et al. (34) zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation dermalen Fibroblasten durch MPA. Voisard et al. (58) untersuchte den antiproliferativen Effekt von MMF. Bereits ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml MMF zeigte sich eine signifikante Inhibition der Zellproliferation. Basierend auf den vorangegangenen Studien liegt die Vermutung nahe, dass MMF auch inhibierende Effekte auf die Restenose haben könnte.

1.3. Ex vivo Restenose-Modelle

Die Etablierung von ex vivo Organkulturen macht es möglich, sich der in vivo Situation unter in vitro Bedingungen möglichst weit anzunähern (37). Idealerweise werden humane Organkulturen verwendet. So wurde über ein humanes Organkultur-Modell mit Nierenarterien (54) und über Segmente der Arteria mammaria interna berichtet (49, 22). Der Nachteil dieser Ansätze ist jedoch, dass die Beschaffung der Arterien schwierig ist. Bei der Verwendung eines Organkultur-Modells mit koronaren Arterien des Hausschweins ergeben sich diese Beschränkungen nicht (14, 55, 57, 64).

Ziel der Arbeit ist es, die Effekte von MMF auf die Zellproliferation und neointimale Hyperplasie zu untersuchen. Daher wurde Organkulturen nach ex vivo Ballondilatation MMF in einer Konzentration von 50 µg/ml für einen Zeitraum von 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen zugegeben. Nach einer Kultivierung von 7 und 28 Tagen wurde der Effekt von MMF auf die Zellproliferation und neointimale Hyperplasie untersucht.

2. Material

2.1. Präparation, Kultivierung und Medikamentenzugabe

2.1.1 Versuchsmaterial

Zur weiteren Präparation dienten 11 Schweineherzen als Ausgangsmaterial, die direkt dem frisch geschlachteten Schwein entnommen wurden.

2.1.2 Kulturmedien und Seren

2.1.2.1 Präparationsmedium

Nach der Präparation der Koronararterie aus den Schweineherzen wurden diese in folgendes Medium überführt.

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) (Gibco BRL, Eggenstein), gepuffert mit 15 mM N - (2-Hydroxyethyl)-piperazine- N - (2- ethansulfonsäure) (HEPES) (Cambrex, Verviers, Belgien); 7,5 ml HEPES / 0,5 l DMEM zugeben.

2.1.2.2 Kulturmedium

- Waymouth`s MB 752/1 (WM) und Ham F12 Nutrient Mixture (F12) (Cambrex, Verviers, Belgien) im Verhältnis 1:1.

- Dem Medium wurden 100 U/ml Penicillin (P) und 100 µg/ml Streptomycin (S) (Gibco BRL, Eggenstein).

- 15 % fetales Kälberserum (fcs, Charge A 01129-058; PAA Laboratories, GmbH Cölbe) zugegeben. Vor der Verwendung wurde das Kälberserum zur Inaktivierung des Komplementsystems auf 56 °C 60 min. lang erwärmt, dann anschließend proportioniert und bei – 20 °C gelagert.

2.1.3 Pufferlösung

- N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N`-(2-ethansulfonsäure) (Cambrex, Verviers, Belgien): (HEPES) .

- Phosphate Buffered Saline mit Magnesium und Calcium (Cambrex, Verviers, Belgien) PBS⁺ .

- Phosphate Buffered Saline ohne Magnesium und Calcium (Cambrex, Verviers, Belgien) PBS⁻ .

2.1.4 Temperatur, Begasung

Die Organkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert.

2.1.5 Medikamentenzugabe von Mycophenolatmofetil (MMF)

MMF gehört zu den Medikamenten der Immunsuppressiva;

2.1.6 Bromodesoxyuridin-Stammlösung

- 30,71 mg 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BRDU; Serva, Heidelberg) und 26,37 mg 2-Desoxycytidin HCL (d-Cyt. HCL; Serva, Heidelberg) in 50 ml Aqua lösen. Die Lösung wurde vor Portionierung und Lagerung bei -20 °C, sterilfiltriert.

2.1.7 Fixierung

- 3,5-3,7% Formaldehyd mit PBS⁻ gepuffert (Fischar, Saarbrücken).

2.1.8 Präparationsschalen

- sind mit Silicon (Sygard 184 Kit; Sasco, Stuttgart) ausgegossene Polysterol-Petrischalen (Greiner, Nürtingen).

2.1.9 Kulturgefäße

- Falcon Multiwell™ Gewebekulturplatte, 6 Vertiefungen (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.1.10 Ballonkatheter

Ballonkatheter 3mm (18k 2030E) Medtronic, Düsseldorf.

2.1.11 Präparationsbesteck

- Minutien (Meier, München).
- Uhrmacherpinzetten (Aesculap, Tuttlingen).
- Anatomische Pinzetten (Aesculap, Tuttlingen).
- Scheren (Aesculap, Tuttlingen).
- Nadelhalter (Aesculap, Tuttlingen).

2.1.12 Geräte

- Laminarflowbank Klasse 2, Type UVF 6.18 S (BDK, Sonnenbühl).
- Wasserbad Julabo Type SW 20 (VWR International, Ulm).
- Inkubator HeraCell Partialdruck (Kendro Fellbach).
- TMS-Inversmikroskop (Nikon, Düsseldorf).

2.2. Aufarbeitung

2.2.1. Paraffineinbettung

- Tissue-Tek® III Gewebe-Einbettungskapseln (Vogel, Gießen).
- Xylol (Merck, Darmstadt).
- Paraffin: Paraplast (Vogel, Gießen).

Die Entwässerung der fixierten Arteriensegmente und Überführung in das Intermedium Xylol erfolgte in einem Vakuum-Infiltrations-Prozessor.

2.2.2 Paraffin-Schnittechnik

Nach der Einbettung wurden mit einem Mikrotom 4 µm-Schnitte angefertigt.

- Objektträger mit Mattrand 76 x 26 mm (Menzel-Gläser, VWR International, Ulm).
- Objektträger mit 2 Reaktionsfeldern (15 mm), adhäsiv beschichtet (Brenzinger, Walldorf).
- Deckgläser AL 24 x 60 mm (Menzel-Gläser, VWR International, Ulm).

2.2.3 Färbelösungen

Die Anfärbung der Schnitte erfolgte mit der:

Elastika-van Gieson-Färbung (EVG) :

- Weigerts Hämatoxylin,
Lösung A: Lösung B= 2:1 (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Van Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Resorcin-Fuchsin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Mayers Hämalan (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Absoluter Alkohol (Apotheke des Universitätsklinikum, Ulm).
- 25 % HCL (Merck, Darmstadt).
- Xylol (Merck, Darmstadt).

2.2.4 Eindeckmedium

- Vitroclud® (E. Langenbrinck, Emmendingen).

2.2.5 Geräte

- Vakuum Infiltrations-Prozessor Tissue-Tek® III V.I.P.™ (Miles Scientific, Elkhart, USA).
- Mikrotom Jung RM 2042 (Leica, Stuttgart).

2.3. Immunhistologie

Nach der Entparaffinierung am Paraffinschnitt erfolgte die Durchführung der Immunhistologie mit der Avidin-Biotin-Methode. Alle Antiseren wurden portioniert, bei -20°C gelagert und vor Gebrauch entsprechend verdünnt.

2.3.1 Erstantikörper

- **Antikörper zum Nachweis von BRDU:** Anti-BRDU (Anti-5-Bromo-2-Deoxyuridin; Dakopatts, Hamburg); Verdünnung 1:100 in 0,5% Tween 80 (Serva, Heidelberg) in PBS⁻.
- **Antikörper zum Nachweis von α -SM-Aktin an glatten Muskelzellen:** Anti- α - SM-Aktin (clone asm 1) (Renner, Dannstadt); Verdünnung 1:300 in PBS⁻.
- **Antikörper zum Nachweis des von Willebrand-Faktors an Endothelzellen:** Anti-vWF (Ziege polyklonal) (Incestar Stillwater, USA); Verdünnung 1:100 in PBS⁻.

2.3.2 Zweitantikörper

- Pferd-Anti-Maus-biotinyliert (Camon, Hamburg) Verdünnung 1:100 in PBS⁻.
- Pferd-Anti-Ziege-biotinyliert (Camon, Hamburg) Verdünnung 1:100 in PBS⁻.

2.3.3 Normalsera

- Pferdeserum (Dianova, Hamburg); Verdünnung 1:10 in PBS⁻.

2.3.4 Protease, Methanol, Immunkomplex und Salzsäure

- 0,1% -ige Protease (Sigma, Deisenhofen) in PBS⁻.
- 30% H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in Methanol (Merck, Darmstadt).
- Immunkomplex: Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Camon, Hamburg) in PBS⁻.
- 1 N HCL (Merck, Darmstadt).

2.3.5 Pufferlösungen

2.3.5.1 Phosphate Buffered Saline Dulbecco' A (PBS⁻):

Reagenzien: NaCl: Natriumchlorid (Fluka Chemie, Buchs)

KCL: Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O: di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Für 5 L PBS⁻: 40 g NaCl

1,0 g KCL

1,0 g KH₂PO₄

7,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

in Aqua bidest. lösen und pH-Wert 7,4 einstellen.

2.3.5.2 Acetatpuffer

- 210 ml 0,1 N Essigsäure (5,75 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua dest.) und 790 ml. 0,1 M Natriumacetat (13,61 g Natriumacetattrihydrat (Riedel de Haen, Stuttgart) in 1 l Aqua dest.) mischen. Die Endkonzentration betrug 0,1 mol/l bei einem pH-Wert von 5,2.

2.3.6 Substrate

- AEC-Komplex (3-Amino-9-Ethylcarbazole): 4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Sigma, Deisenhofen) in 1 ml N'N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) lösen. Unter Rühren 14 ml 0,1 M Acetatpuffer pH-Wert 5,2 und 15 µl 30 % H₂O₂ (Merck, Darmstadt) hinzufügen.

2.3.7 Färbelösung

- Mayers Hämalaun (Chroma Gesellschaft, Köngen).

2.3.8 Eindeckmedium

- Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).

2.3.9 Geräte

- Inkubator DDM-P820 (Medis Streck- und Inkubationstisch; Medis Weber, Busch).

- Wasserbad Grant (VWR International, Ulm).

2.4. Auswertung

2.4.1 Mikroskopie und Mikrofotografie

- Mikroskop: Nikon Optiphot-2-Mikroskop mit den Hellfeldobjektiven CF Planapochromat 4/0,20, CF Planapochromat 10/0,40, CF Planapochromat 40/1,0 Oil (Nikon Düsseldorf).

2.4.2 Morphometrie

- Summa Sketch® III (12x12) Graphiktablett mit Zeigergerät (Cursor) (Summagraphics Corporation, Seymour, USA).

- Rechnerprogramm BIOQUANT™ System 4 © 1989 R&M BIOMETRICS, INC. (Bilaney Consulting, Düsseldorf).

3. Methoden

3.1. Versuchsmaterial

3.1.1 Präparation von Koronararterien vom Hausschwein

Von gesunden Hausschweinen (Alter: 3-5 Monate, Gewicht 100-120 kg) - von einem lokalen Schlachthof bezogen – wurden frische Herzen entnommen und sorgfältig der Ramus interventrikularis anterior (RIVA) präpariert und von der epikardialen Oberfläche entfernt. Anschließend wurden die RIVA Koronararterien zur Aufarbeitung in einer silicon beschichteten Präparationsschale aufgespannt und schonend von umgebendem Binde- und Fettgewebe befreit. Die Präparation erfolgte in HEPES-gepuffertem Medium (siehe B 1.2.1). Anschließend wurden die Arterien in 5 mm große zylinderförmige Segmente zerteilt und in Kulturmedium überführt (siehe B 1.2.2).

3.2. Dilatation von Koronararterien vom Schwein

Die Koronararterien wurden zu je 3 Ringen gleichzeitig über einen Ballon-Katheter mit 9 bar 1 min. lang dilatiert. Somit wurden gleiche Bedingungen wie bei einem Katheter am Menschen geschaffen.

3.3. Kontrollsegmente

Insgesamt wurden je einer ganzen Koronararterie folgende Kontrollen mitgeführt. Eine völlig unbehandelt, nicht dilatiert. Eine andere dilatiert.

3.4. Kultivierung der Schweine Organkultur

Die 5 mm großen Stücke wurden mit 5 ml Kulturmedium und Medikament MMF(50 µg/ml) in einer 6-Lochplatte (siehe B 1.9) einmal über 7 Tage und die andere Hälfte über 28 Tage kultiviert.

Ebenso die beiden Kontrollen jedoch ohne das Medikament MMF.

Das Kulturmedium enthielt zu gleichen Teilen Waymouth's MB 752/1 (WM) und Ham F12 Nutrient Mixture (F12) mit 15 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin Gemisch (siehe B 1.2.2). In einem 2-3-Tages-Rhythmus wurde das Medium gewechselt.

3.5. Zugabe des Medikamentes Mycophenolatmofetil (MMF)

MMF 500 mg wurde in 10 ml Aqua inject. gelöst. Dies entspricht dann 50 000 µg/ml und wurde 1:10 verdünnt und dem Medium 1:100 zugegeben. Die Endkonzentration von MMF im Medium betrug dann 50 µg/ml.

3.5.1. Kultivierung mit MMF 7 Tage (7d) in Kultur

- a. 1 Tag 50 µg/ml MMF Medium + 6 Tage Medium.
- b. 2 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 5 Tage Medium.
- c. 3 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 4 Tage Medium.
- d. 4 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 3 Tage Medium.
- e. 5 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 2 Tage Medium.
- f. 6 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 1 Tag Medium.
- g. 7 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 0 Tage Medium.

Nach 7 Tagen (7d) wurden die Segmente fixiert. MMF wurde bei jedem Mediumwechsel erneuert.

3.5.2 Kultivierung mit MMF 28 Tage (28d) in Kultur

- a. 1 Tag 50 µg/ml MMF Medium + 27 Tage Medium.
- b. 2 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 26 Tage Medium.
- c. 3 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 25 Tage Medium.
- d. 4 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 24 Tage Medium.
- e. 5 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 23 Tage Medium.
- f. 6 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 22 Tage Medium.
- g. 7 Tage 50 µg/ml MMF Medium + 21 Tage Medium.

Nach 28 Tage wurden die Segmente fixiert. Die Segmentanzahl (n) beträgt sowohl bei 7 Tagen als auch bei 28 Tagen 5, zuzüglich der 2 mitgeführten Kontrollen. MMF wurde bei jedem Mediumwechsel erneuert.

3.6. Markierung mit Bromodesoxyuridin

Als Thymidinanalogon wird BRDU während der Replikationsphase in die DNA der Zelle eingebaut. 18 Stunden vor der Fixierung der Organkultur wurde diese zum Nachweis proliferierender Zellen mit BRDU und 2-Desoxy-Cytidin (d-Cyt.) markiert. Die 2 mM Stammlösung (siehe B 1.6) wurde dem Kulturmedium im Verhältnis 1:100 zugegeben. Das entsprach einer Endkonzentration von 20 µM.

3.7. Fixierung

Die Organkulturen wurden zweimal mit PBS⁺ gespült und anschließend in 3,5-3,7 %-iger Formaldehydlösung fixiert (B 1.7)

3.8. Aufarbeitung

3.8.1 Paraffineinbettung

Die fixierten Arteriensegmente wurden in Tissue-Tek® III-Kapseln im Vakuum-Infiltrations-Prozessor (VIP) über mehrere Stunden in das Intermedium Xylol überführt, damit die vollständige Durchdringung mit dem Einbettmedium Paraffin gewährleistet ist. Folgende Schritte wurden von dem VIP durchgeführt:

- Entwässern: Auswaschen des Fixierungsmittels (60 min.).

- Aufsteigende Alkoholreihe: 50, 70, 2 x 90 %-iges Isopropanol (je 60 min.).
2 x 99,9 %-iges Isopropanol (je 120 min.).

- Intermedium: Xylol rein (150 min.).
Xylol rein (30 min.).

- Einbettmedium: Paraffin (30 min.).
Paraffin (60 min.).
Paraffin (90 min.).
Paraffin (120 min.).

Anschließend wurden die Segmente als Paraffinblöcke (57°C) ausgegossen.

3.8.2 Paraffinschnittechnik

Von jedem Arteriensegment wurden am Mikrotom 4 µm-Schnitte angefertigt (siehe B 2.2).

3.9. Elastika-van Gieson-Färbung

Die Elastika-van Gieson-Färbung ist eine Trichromfärbung, bei der sich die Muskulatur gelb, Zellkerne schwarz und Bindegewebe rot darstellen. Die Färbelösungen wurden regelmäßig neu angesetzt bzw. bereitgestellt:

- Weigerts Hämatoxylin: Mischverhältnis der Lösungen A und B entspricht 2:1.

Die Differenzierungslösung HCL-Alkohol wurde folgendermaßen hergestellt:

- ein Liter 70 %-iger Alkohol versetzt mit 12 ml 25 %-iger HCL.

Arbeitsschritte der Elastika-van Gieson-Färbung:

- Entparaffinieren: 2 x Xylol (10 min.), 2 x absoluter Alkohol, 2 x 96 %-iger Alkohol, 80 %-iger Alkohol (je 5 min.).
- Resorcin-Fuchsin nach Weigert (30 min.).
- Spülen in 80 %-igem Alkohol (2x) und Aqua bidest..
- Hämatoxylin nach Weigert (10 min.).
- Differenzieren in HCL-Alkohol.
- Bläuen in Leitungswasser (10 min.), anschließend spülen in Aqua bidest..
- Van Gieson-Lösung (2 min.).
- Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 96 %-igem Alkohol und absolutem Alkohol (2 min.).
- Xylol.
- Eindecken in Vitroclud®.

3.10. Immunhistologie

3.10.1 Nachweis von Bromodesoxyuridin

Die Schnitte wurden zunächst bis PBS⁻ entparaffiniert:

- Entparaffinieren: 2 x Xylol (10 min.), 2 x absoluter Alkohol, 2 x 96 %-iger Alkohol, 2 x 70 %-iger Alkohol, 2 x PBS⁻ (je 5 min.)

Gemäß der Avidin-Biotin-Immunperoxidase-Technik erfolgten folgende Arbeitsschritte:

- 0,1 % Protease 15 min. bei 37°C im Wasserbad
- Spülen mit PBS⁻
- Methanol/H₂O₂ 10 min. bei Raumtemperatur (5 ml 30 % H₂O₂ / 200 ml Methanol) zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität
- Spülen mit PBS⁻ (2 x 5 min.)
- 1 N HCL 20 min. bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS⁻ (2 x 5 min.)
- Inkubation: Erstantikörper Anti-BRDU (Konzentration 1µg/ml) 1:100 in 0,5 % Tween 80 in PBS⁻ (40 min.)
- Spülen mit PBS⁻
- Inkubation: Zweitantikörper Pferd-Anti-Maus-biotinyliert 1:100 in PBS⁻ (10 min.)
- Spülen mit PBS⁻
- Inkubation: Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex 1:100 in PBS⁻ (10min.)

- AEC-Komplex (3-Amino-9-Ethylcarbazole): Herstellung siehe B 3.6; sofern ein Präzipitat auftritt, die Mischung filtrieren. Bei Raumtemperatur 5-20 min. inkubieren
- Spülen mit PBS⁻ (2 x 5 min.)
- Gegenfärben mit Hämalan (10 sek.)
- Bläuen in Leitungswasser (10 min.)
- Eindecken in Kaisers Glyceringelatine

Die Spülschritte wurden bei Raumtemperatur und die Inkubationsschritte bei 37°C auf einem Inkubationstisch durchgeführt.

3.10.2 Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin

Entsprechend der Arbeitsvorschrift von BRDU wurde der Nachweis von α -SM-Aktin an glatten Muskelzellen durchgeführt (siehe C 10.1). Die Protease wurde bei Raumtemperatur (10 min.) verwendet und der HCL-Schritt entfiel. Als Erstantikörper wurde Anti- α -SM-Aktin (Konzentration 1 μ g/ml) 1:300 in PBS⁻ 40 min. inkubiert. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte durch Pferde-Anti-Maus-biotinyliert 1:100 in PBS⁻ 10 min.

3.10.3 Nachweis des von Willebrand-Faktors

Der Nachweis des von Willebrand-Faktors an Endothelzellen wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift von BRDU durchgeführt (siehe C 10.1). Der HCL- Schritt entfiel, die Verweildauer in der Protease betrug 10 min. bei 20°C Raumtemperatur und als Erstantikörper wurde Anti-vWF (Konzentration 1 μ g/ml) 1:100 in PBS⁻ 40 min. inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Pferd-Anti-Ziege-biotinyliert 1:100 in PBS⁻ 10 min.

3.11. Auswertung

3.11.1 Morphometrie

Das Softwareprogramm BIOQUANT™ System 4 und ein Graphiktablett mit Zeigergerät wurde zur computergestützten morphometrischen Analyse der Neointima verwendet. Die 4 μ m-Schritte wurden angefärbt mit der Elastika-van Gieson-Färbung (siehe C. 9) und im Mikroskop (Nikon Alphaphot 2 mit Drawing Tube) eingestellt. Mit dem Cursor war es aufgrund des Tubus möglich den eingestellten Schnitt und das Graphiktablett einzusehen. Dadurch war ein Umfahren der relevanten Gefäßstrukturen mit dem Zeigergerät möglich.

Auf die digitalisierte Unterlage, welche die Signale zur Flächenberechnung an den Computer weiter vermittelt, wurden die umfahrenen Flächenumrisse projiziert. Die Fläche der vorläufigen Meßergebnisse wurde in Quadratmillimetern angegeben.

Die absolute Fläche der Neointima wurde über die Differenz zwischen der Fläche innerhalb des Neointima/Media-Übergangs und der Fläche des Lumens bestimmt. Von der größten Fläche innerhalb der Lamina elastica externa wurde die des Lumens abgezogen und somit Media + Neointima bestimmt.

Aufgrund der verschiedenen Größenverhältnisse (Durchmesser) der Koronararterien wurde jede relevante Struktur dreimal umfahren, der Mittelwert davon gebildet und so für alle Schritte der relative Anteil der Neointima im Vergleich zu Media + Neointima berechnet:

$$\frac{\text{Neointima-Fläche}}{\text{Fläche der Media + Neointima}} \times 100\%$$

3.11.2 Proliferation

Über den Einbau des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BRDU) wurde die Zellproliferation der Organkultur quantitativ bestimmt. Im Mikroskop (Nikon Optiphot 2) wurden die BRDU-positiven Zellen in Neointima und Media in 40-facher Vergrößerung ausgezählt und zur jeweiligen Gesamtzellzahl in Relation gebracht. Wie folgt errechnete sich die Zahl der proliferierenden Zellen in Prozent:

$$\frac{\text{Zahl der BRDU-positiven Zellen}}{\text{Gesamtzahl}} \times 100\%$$

3.11.3 Glattmuskuläres α -Aktin

Die α -Aktin-Expression glatter Muskelzellen wurde semiquantitativ bei 40-facher Vergrößerung in Neointima und Media wie folgt ausgewertet:

- +++ starke Expression.
- ++ mäßige Expression.
- + schwache Expression.
- keine Expression.

3.11.4 Von Willebrand-Faktor

Für den Nachweis von Endothelzellen gilt als Schlüsselmarker der von Willebrand-Faktor.

Bei 40-facher Vergrößerung wurden die Schnitte semiquantitativ nach folgenden Kriterien ausgewertet:

- +++ geschlossener Endothelzellring.
- ++ lückenhafter Endothelzellring.
- + vereinzelte Endothelzellen.
- keine Endothelzellen.

Genauso wurden die erkennbaren Zellkernzahlen mit +++, ++, + und – bezeichnet.

3.12. Statistische Analyse

Von den einzelnen Versuchsergebnissen wurde zum Klären der statistischen Zusammenhänge das arithmetische Mittel (\bar{x} in %) und die Standardabweichung (SD) als Streuungsparameter berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels des Wilcoxon, Mann und Whitney geprüft, wobei eine Signifikanz für $p < 0,05$ angenommen wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Kultivierung von Koronararterien vom Schwein

Uns standen 11 Schweineherzen zur Verfügung, die sofort aus einem frisch geschlachteten Schwein weiterpräpariert wurden. Nach der sterilen präzisen Präparation der Koronararterien wurden diese in 5 mm lange Segmente geschnitten, mit einem Ballonkatheter von 9 bar dilatiert und in WM/F12 (15% fcs, PS) Kulturmedium überführt. Von diesen Segmenten wurde eines als Kontrolle (K) nicht dilatiert und ein weiteres als Kontrolle dilatiert (K dil) mitgeführt, die restlichen Segmente wurden dilatiert und mit dem Medikament MMF versehen; die weiteren Schritte erfolgten nach dem in Kapitel Methoden C.5 zugrunde liegendem Schema.

4.2. Zellproliferation in der Schweine Organkultur

Die reaktive Zellproliferation wurde nach Ballondilatation und Markierung mit BRDU in Schweine Organkulturen Kontrolle, Kontrolle dilatiert, MMF Zugabe Tag 1-7 quantitativ nach 7 Tagen und 28 Tagen Kultivierung bestimmt. Dabei wurden BRDU-positive Zellen in der Neointima und Media als Nachweis einer Zellproliferation, ausgezählt und mit der Gesamtzellzahl der jeweiligen Schicht in Relation gebracht.

4.2.1 Zellproliferation in der Neointima der Schweine Organkultur mit MMF

4.2.1.1 7 d in Kultur (Abb. 1, 2)

Nach ex vivo Ballonisierung mit 9 bar der 7 Tage Kultur wurden vier Tage mit MMF nach Dilatation keine BRDU-positiven Zellen gefunden; ebenso bei der nicht dilatierten Kontrolle. Der Wert mit 3,14 +/- 7,28% BRDU-positiven Zellen ist in der Kontrolle dilatiert, erreicht worden. Bei 7 Tage Kultivierung mit eins, drei und fünf Tagen mit MMF Zugabe war die Anzahl der BRDU-positiven Zellen 2,42 +/- 5,98%, 2,54 +/- 6,64% und 2,86 +/- 7,01% zu beobachten. Ein stimulierender Effekt war mit MMF-Zugabe an 2 Tagen (4,28 +/- 12,23%) und 6 Tagen (4,65 +/- 13,90%) zu sehen. An 7 Tagen (0,71 +/- 2,41%) war ein hemmender Effekt zu verzeichnen.

Der Vergleich der Proliferationsraten mit MMF-Zugabe und der dilatierten Kontrolle ergab keine statistische Signifikanz.

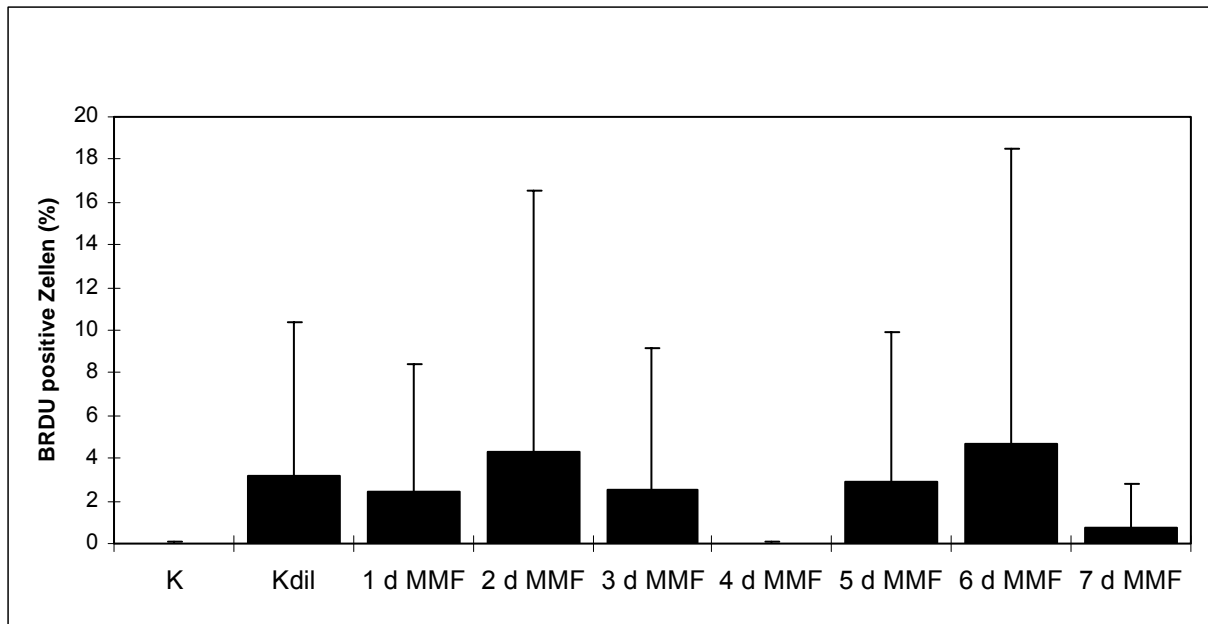


Abbildung 1: Schweine Organkultur nach Medikamentenzugabe mit MMF : Proliferation in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Xm(%) +/- SD) bei 7 Tagen in Kultur.

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

BRDU = 5 - Bromo - 2 Deoxyuridin

x-Achse : Anzahl der BRDU positiven Zellen in Prozent in den Segmenten

y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art



Abbildung: 2 Nachweis proliferierender Zellen nach 7-tägiger Kultivierung in der Neointima. Avidin-Biotin Färbung von BRDU (Pfeil).

A: Kontrolle nicht dilatiert

B: Kontrolle dilatiert

C: 7 Tage Kultur mit 4 Tage 50 µg/ml MMF

4.2.2.2 28 Tage in Kultur (Abb. 3, 4)

Die Zellproliferation bei Schweine Organkulturen der 28 tågigen Kultivierung war wesentlich geringer als bei der 7-tågigen Kultivierung. In der Neointima war die Zellproliferation der Kontrolle nicht dilatiert (0,05 +/- 0,20%) am geringsten; bei der Kontrolle dilatiert (0,42 +/- 1,0%), 1 Tag mit MMF (0,41 +/- 0,97%), 2 Tage mit MMF (0,13 +/- 0,46%) und 4 Tage mit MMF (0,85 +/- 0,23%) war die Proliferation ungefåhr gleich stark und bei 3, 5, 6 und 7 Tagen mit MMF gab es keine Proliferation.

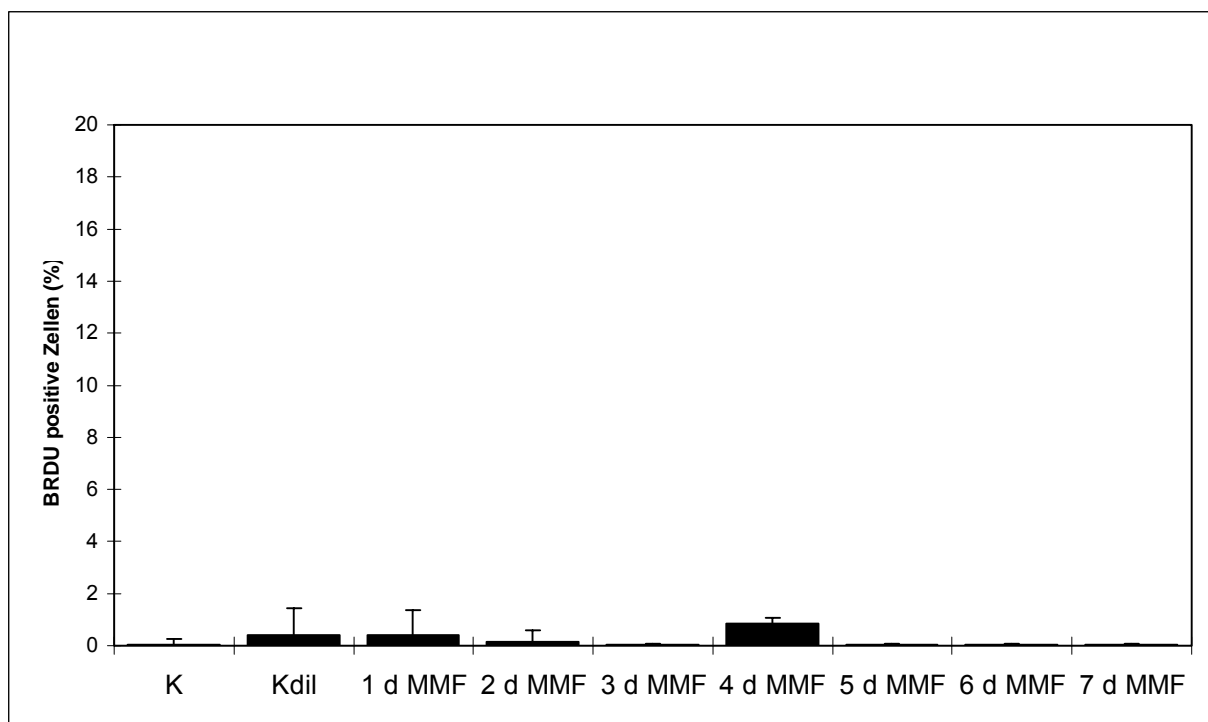


Abbildung 3: Schweine Organkultur nach Medikamentenzugabe mit MMF : Proliferation in Abhångigkeit von der Kultivierungsdauer (Xm(%) +/- SD) bei 28 Tagen.

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

BRDU = 5 - Bromo - 2 Deoxyuridin

x-Achse : Anzahl der BRDU positiven Zellen in Prozent in den Segmenten

y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art

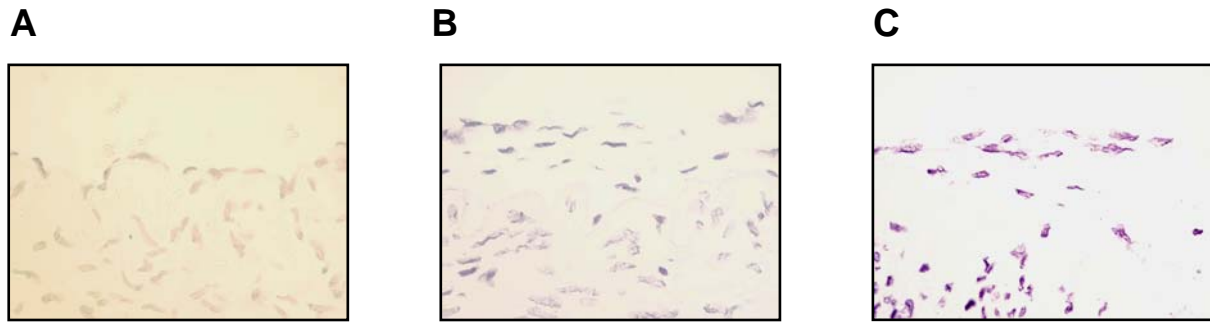


Abbildung 4: Nachweis proliferierender Zellen nach 28-tägiger Kultivierung in der Neointima.

A: Kontrolle nicht dilatiert

B: Kontrolle dilatiert

C: 28 Tage Kultur mit 2 Tage MMF

Der Vergleich der Proliferationsraten mit MMF-Zugabe und der dilatierten Kontrolle ergab keine statistische Signifikanz.

4.2.2 Zellproliferation in der Media der Schweine Organkultur mit MMF

4.2.2. 1 7 Tage in Kultur (Abb. 5)

In der Media der 7 Tage Kulturen ließ sich außer bei 4 Tagen mit MMF keine Zellproliferation vermerken. Die gemessene Proliferation betrug bei 4 Tagen mit MMF $0,76 \pm 2,63 \%$. Alle anderen Tage zeigten keine proliferative Aktivität.

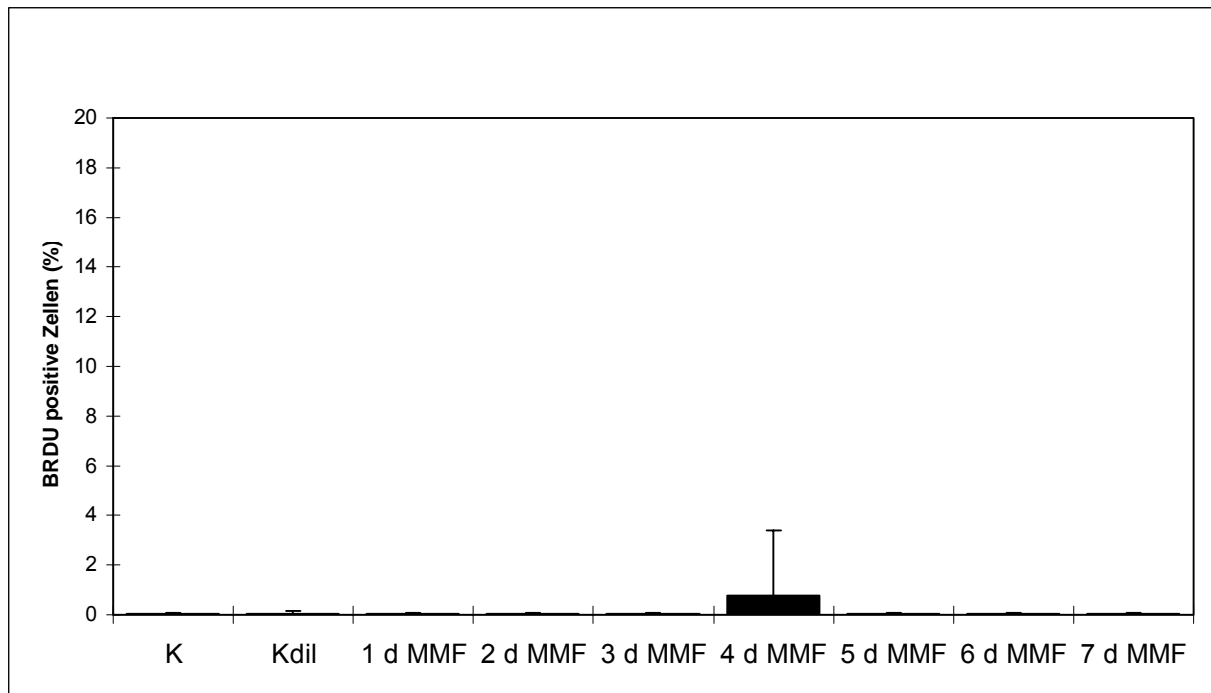


Abbildung 5: Zellproliferation in der Media der Schweine Organkulturen von 7 Tagen in Kultur.

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

BRDU = 5 - Bromo - 2 Deoxyuridin

x-Achse : Anzahl der BRDU positiven Zellen in Prozent in den Segmenten

y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art

4.2.2.2 28 Tage in Kultur (Abb.6)

Ähnlich verhielten sich die Schweine Organkulturen in der Media bei der 28 Tage Kultur. Auch hier war eine Zellproliferation nur bei 4 Tagen MMF zu vermerken. Hier betrug die gemessene Proliferationsrate 0,06 +/- 0,21 %.

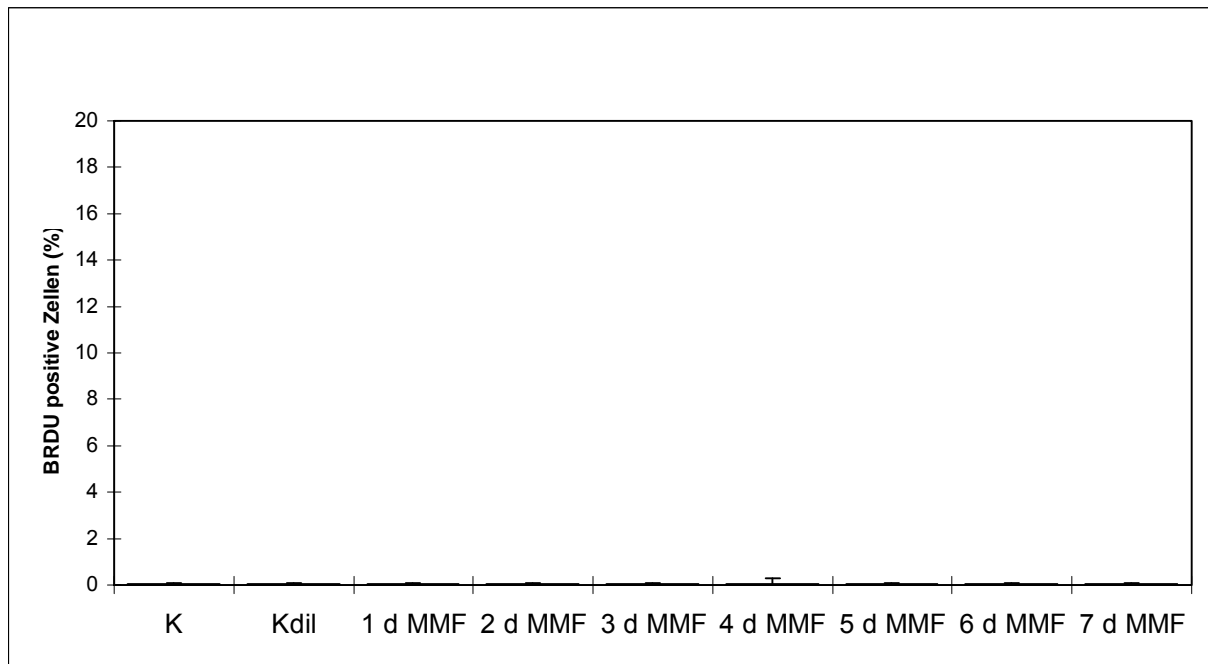


Abbildung 6: Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur: Zeitverlauf des BRDU - Einbaus in der Media während der Synthesephase (xm(%) +/- SD).

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

BRDU = 5 - Bromo - 2 Deoxyuridin

x-Achse : Anzahl der BRDU positiven Zellen in Prozent in den Segmenten
y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art

4.3. Morphometrische Auswertung der Schweine Organkultur mit MMF

Die angefertigten Schnitte zur morphologischen Auswertung wurden mit der Elastika-van Gieson-Färbung angefärbt.

Anschließend wurde die Dicke der Neointima computergesteuert analysiert und das prozentuale Neointimawachstum bezieht sich so auf Neointima und Media.

Von mindestens 5 Schweine Organkulturen wurde jeweils der Mittelwert in % +/- und die Standardabweichung in % (xm +/- SD) angegeben. Ebenso wurden die mitgeführten Kontrollen morphometrisch ausgewertet.

$$\frac{\text{Neointima}}{\text{Neointima + Media}} \times 100 \%$$

4.3.1 Morphometrie der Schweine Organkultur 7 Tage (Abb. 7, 8)

Das Neointimawachstum bei der 7 Tage Kultur beträgt bei der Kontrolle nicht dilatiert 1,68 +/- 3,76% und bei der Kontrolle dilatiert 1,1 +/- 1,5%. An 3 Tagen (0,89 +/- 1,99%), 5 Tagen (0,71 +/- 1,5%) und 7 Tagen (0,45 +/- 0,64%) mit MMF nimmt die Neointima immer mehr ab. An 1, 2, 4 und 6 Tagen mit MMF hingegen, haben kein Neointimawachstum. Nach 7 Tagen Kultivierung nach ex vivo Dilatation war eine sehr geringe Hyperplasie zu sehen im Vergleich zu den Kontrollen. Es ergab aber keine statische Signifikanz.



Abbildung 7: Plaquebildung in der Schweine Organkultur von 7 Tagen Kultivierung.

A: Kontrolle nicht dilatiert

B: Kontrolle dilatiert

C: 7 Tage Kultur mit 3 Tage MMF

Pfeil gefüllt: Lamina elastica interna

Pfeil dünn: Hyperplasie (Neointima)

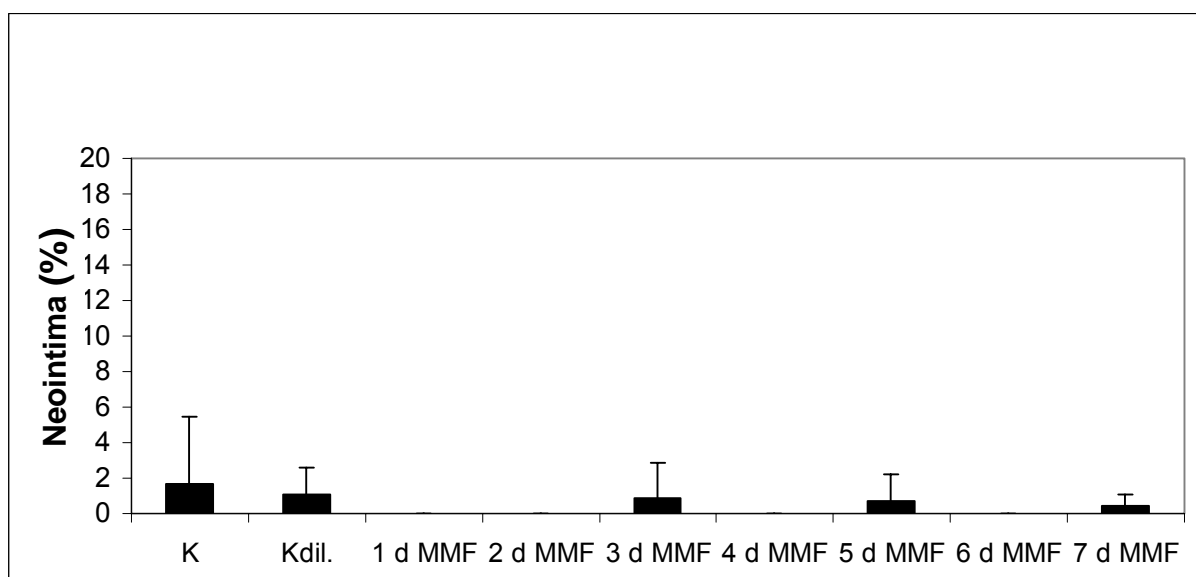


Abbildung 8: Morphometrie der Schweine Organkultur von 7 Tagen in Kultur.

MMF = Mycophenolatmofetil
 K = Kontrolle
 K dil. = Kontrolle dilatiert
 d = Tage

x-Achse : Bildung einer Neointima in Prozent in den Segmenten
 y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art

4.3.2 Morphometrie der Schweine Organkultur 28 Tage

In der Kontrolle dilatiert (10,3 +/- 3,34 %) verzehnfachte sich die Hyperplasia und stieg dann kontinuierlich von 1 Tag MMF (12,02 +/- 12,41%) bis hin zu 2 Tagen MMF (13,3 +/- 15,1%) an. Ein weiterer Anstieg war an 4 Tagen MMF (12,74 +/- 13,93%) zu bemerken.

Verringerte Werte der Hyperplasia zeigten sich an den 3 Tagen MMF (6,64 +/- 5,43%), 5 Tagen MMF (5,8 +/- 6,85), 6 Tagen MMF (4,95 +/- 4,34%) und 7 Tagen MMF (6,68 +/- 5,22%). Wegen hoher Standardabweichungen wurde keine statistische Signifikanz erreicht.

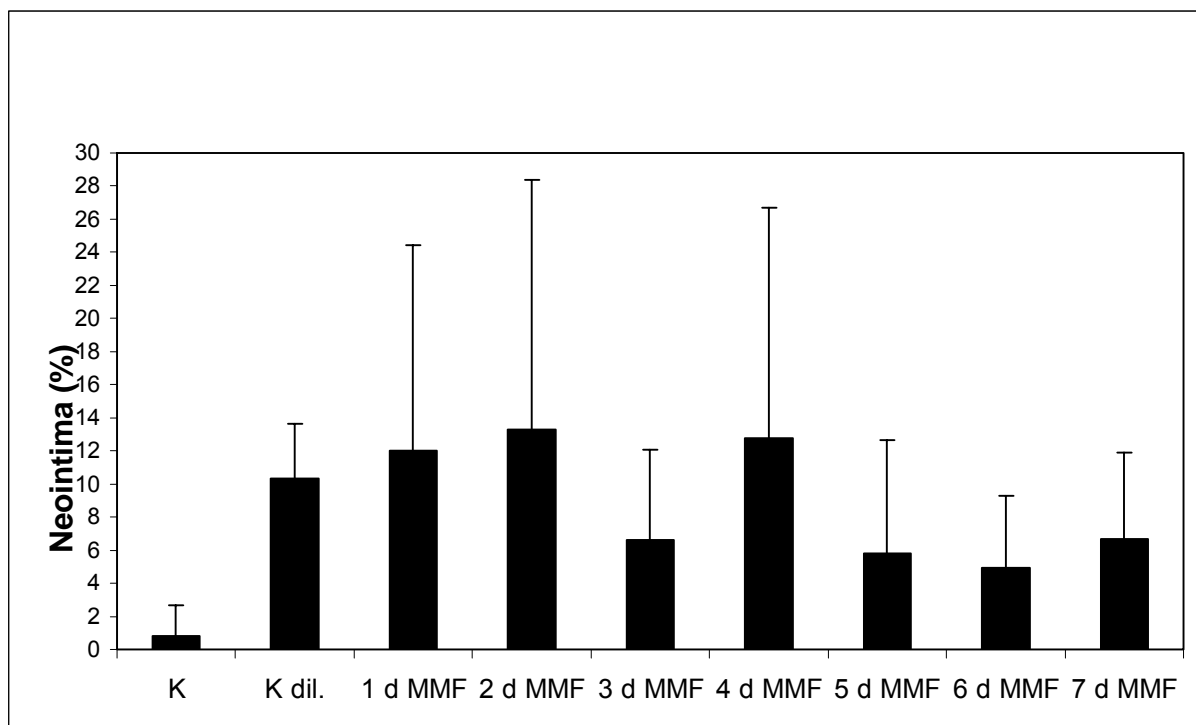


Abbildung 9: Morphometrie der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.

MMF = Mycophenolatmofetil
 K = Kontrolle
 K dil. = Kontrolle dilatiert
 d = Tage

x-Achse : Bildung einer Neointima in Prozent in den Segmenten
y-Achse: Angabe der Kultivierungsdauer und Art

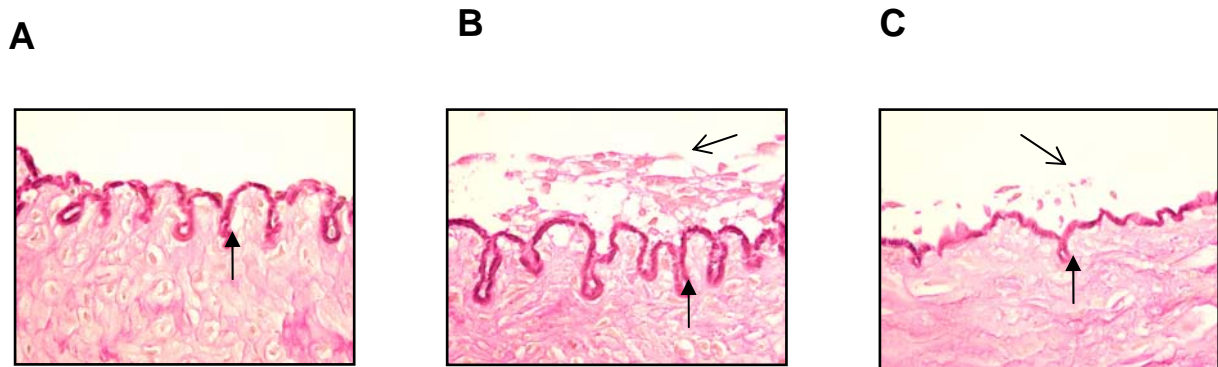


Abbildung 10: Plaquebildung in der Schweine Organkultur bei 28-tägiger Kultivierung.

A: Kontrolle nicht dilatiert

B: Kontrolle dilatiert

C: 28 Tage Kultur mit 3 Tage mit MMF

Pfeil gefüllt: Lamina elastica interna

Pfeil dünn: Neointima

4.4. Glattmuskuläres α -Aktin-Muster in der Schweine Organkultur

Durch eine semiquantitative Auswertung wurde die α -Aktin-Expression in der Neointima und Media bestimmt.

4.4.1 Neointima

In Tabelle 7 ist der α -SM-Aktin-Gehalt der Schweine Organkultur 7 Tage dargestellt. Die in der Neointima untersuchten Organkulturen weisen durchweg eine negative Reaktion mit Antikörpern gegen α -SM-Aktin auf. Ausnahmen mit positiver Reaktion sind nach 5 und 6 Tagen mit MMF vorhanden (Tabelle 1).

Tabelle 1: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.

Neo-intima	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
α -SM-Aktin	-	-	-	-	-	-	+	+	-

- keine α -SM-Aktin-Expression

+ normale α -SM-Aktin-Expression

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

α -SM-Aktin = Alpha Aktin glatter Muskelzellen

Bei den 28 Tagen verhält es sich in der Neointima negativ, bis nach 6 Tagen mit MMF befindliche Arterie, die eine schwache Expression aufweist (Tabelle 2).

Tabelle 2: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.

Neo-intima	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
α -SM-Aktin	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-

- keine α -SM-Aktin-Expression

(+) schwache α -SM-Aktin-Expression

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

α -SM-Aktin = Alpha Aktin glatter Muskelzellen

4.4.2 Media

In der Media war bei der Schweine Organkultur nach 7 Tagen eine positive bis sehr positive (2 Tage und 6 Tage) mit MMF α -SM-Aktin-Expression zu vermerken.

Die Kontrolle fiel jedoch negativ aus (Tabelle 3).

Tabelle 3: α -SM-Aktin-Gehalt der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.

Media	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
α -SM-Aktin	-	+	+	++	+	+	+	++	+

- keine α -SM-Aktin-Expression
- + normale α -SM-Aktin-Expression
- ++ normale α -SM-Aktin-Expression

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

α -SM-Aktin = Alpha Aktin glatter Muskelzellen

Die Schweine Organkultur 28 Tage fiel bis auf die Tage 5 und 6 (positiv) negativ aus (Tab. 4).

Tabelle 4: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.

Media	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
α -SM-Aktin	-	-	-	-	-	-	+	+	-

- keine α -SM-Aktin-Expression
- + normale α -SM-Aktin-Expression

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

α -SM-Aktin = Alpha Aktin glatter Muskelzellen

4.5. Von Willebrand - Faktor-Nachweis in der Schweine Organkultur

Der von Willebrand - Faktor dient zum Nachweis von Endothelzellen und wurde hier immunhistologisch dargestellt. Danach wurden die Schnitte semiquantitativ ausgewertet. Sowohl die Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur als auch die 28 Tage in Kultur zeigten einen geschlossenen Endothelzellring auf.

Tabelle 5: Gehalt der von Willebrand-Faktor positiven Endothelzellen in der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.

7d	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
vWF	-	+	+	+	+	+	+	+	+
EC	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+

(+) Andeutung zum Endothelzellring

+ geschlossener Endothelzellring

- kein Endothelzellring.

MMF = Mycophenolatmofetil

K = Kontrolle

K dil. = Kontrolle dilatiert

d = Tage

vWF = von Willebrand Faktor

EC = Endothelzellen

Tabelle 6: Gehalt der von Willebrand-Faktor positiven Endothelzellen in der Schweine Organkultur, 28 Tage in Kultur.

28d	K	K dil.	1d MMF	2d MMF	3d MMF	4d MMF	5d MMF	6d MMF	7d MMF
vWF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	++	+	+	+	+	+	+	+	+

++ eng geschlossener Endothelzellring.
 + geschlossener Endothelzellring.
 - kein Endothelzellring.

MMF = Mycophenolatmofetil
 K = Kontrolle
 K dil. = Kontrolle dilatiert
 d = Tage
 vWF = von Willebrand Faktor
 EC = Endothelzellen

5. Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht in einem koronaren Organkultur-Modell des Hausschweines (POC-Modell) den Effekt einer 1-7-tägigen Applikation von MMF auf die reaktive Proliferation und Intimahyperplasie nach ex vivo Ballonangioplastie. Weder die reaktive Zellproliferation am Tag 7 noch die neointimale Hyperplasie am Tag 28 wurden durch MMF (50 µg/mL) inhibiert. Bei fehlendem Anstieg der unbehandelten Kontrollen ist das Modell in der vorliegenden Form jedoch nicht aussagekräftig.

Während den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, ein besseres Verständnis der Restenose zu erhalten. Dabei stellte die fehlende Korrelation zwischen Labor und Krankenbett ein gravierendes Problem dar. Die Mehrzahl klinischer Studien zur systemischen Therapie wurde erfolgreich in vitro und in tierexperimentellen Studien getestet, jedoch sind fast alle klinische Studien fehlgeschlagen. Nikol et al. zeigten (35), dass der pharmazeutischen Industrie durch über 50 fehlgeschlagene klinische Studien Kosten in Höhe von insgesamt 2,5 Milliarden € bei einem Aufwand von in etwa 50 Millionen € pro Studie entstanden. Hieraus wird ersichtlich, dass zuverlässigen Modellen zur Austestung von potentiell wirksamen Medikamenten eine wichtige Rolle zukommt.

Ursachen für die fehlende Übertragbarkeit sind nach Lafont & Faxon (27) folgende Fehlerquellen: 1) Konzentrationsunterschiede von 100:1 und mehr zwischen den in vitro wirksamen Substanzen und den klinischen in vivo verabreichten Substanzen, 2) das Nichtbeachten von Unterschieden der Spezien Mensch/Tier und 3) die Generalisierung von Ergebnissen aus Prescreening in vitro Modellen (30). Die Vorteile der Organkultur liegen in der schnellen Beschaffung von Koronararterien des Hausschweines und der Möglichkeit des Vergleiches der Ergebnisse mit dem Tiermodell. Zusätzlich kann versucht werden, im Analogie-schluß die Ergebnisse auf die humane Situation zu übertragen.

Auf zellulärer Ebene stellen Migration und Proliferation glatter Muskelzellen einen entscheidenden pathogenetischen Faktor der Restenose dar (17).

Ein wichtiges gemeinsames anatomisches Merkmal vom Organkultur-Modell des Schweines und des Organkultur-Modell des Menschen ist das Vorhandensein von glatten Muskelzellen in der unverletzten Intima der Arterien (36). In vitro wurde gezeigt, dass durch vorherige Angioplastie eine Proliferation glatter Muskelzellen stattfindet und somit in menschlichen Koronararterien die Neointima vergrößert wird, ohne die Media zu involvieren (48).

Organkulturen bieten die Möglichkeit, die Reaktion der Gefäßwand nach Angioplastie unter klar definierten Bedingungen in vitro zu verfolgen. Weitere Vorteile bei der koronaren Organkultur des Schweines sind die sicheren und schnellen Beschaffungswege aus einem örtlichen Schlachthof. In der vorliegenden Studie wird an Koronarien des Hausschweines in einem ex vivo-Modell der Effekt des Medikamentes MMF auf die SMC-Proliferation und die Hyperplasie untersucht. Von besonderem Interesse ist die Frage, wie lange eine medikamentöse Behandlung fortgeführt werden muss, um eine Hemmung der reaktiven Zellproliferation und der neointimalen Hyperplasie zu erreichen. In der Charakterisierung des Modells durch Voisard et al. (55) zeigte sich eine maximale reaktive Zellproliferation am Tag 7 und eine maximale reaktive Intimahyperplasie am Tag 28.

5.1. Ex vivo Organkultur-Modelle und die intra/extravaskuläre Applikation

Die Etablierung von ex vivo Organkulturen macht es möglich, sich mit einem Modell der in vivo Situation anzunähern. Ex vivo Organkultur-Modelle haben den Vorteil, dass Ergebnisse bei gleicher experimenteller Basis einer bestimmten Spezies mit Ergebnissen des entsprechenden in vivo Spezies-Modell verglichen werden können. Somit ergibt sich für eine bestimmte Spezies bei definierten Kontrollpunkten eine ex vivo/in vivo Relation. Das in dieser Arbeit zugrunde liegende Restenose-Modell ist das Hausschwein (44, 8), ein in vivo Modell, welches der humanen Situation am Nächsten kommt. Mit den Koronararterien des Hausschweines wurde ein ex vivo Organkultur-Modell mit denselben Kontrollpunkten wie das in vivo Hausschwein-Modell (8) entwickelt.

Der Zeitpunkt der maximalen reaktiven Zellproliferation und der maximalen Intimahypertrophie im in vivo Hausschwein-Modell (8) und im ex vivo Schwein-Modell (52) wurde bestimmt und zeigt die ex vivo/in vivo Relation der Spezies Hausschwein auf.

Somit kann beim Etablieren eines humanen ex vivo Organkultur-Modells unter Beibehaltung des experimentellen Designs von der ex vivo/in vivo Relation einer Tierspezies auf die ex vivo/in vivo Relation der Spezies Mensch geschlossen werden.

Durch Ballondilatation und verwandte Techniken kommt es zu einer gesamten Gefäßwandbeschädigung, die sich nicht nur auf die Gefäßwandinnenseite beschränkt. Somit besteht die Wahrscheinlichkeit, dass sowohl lumennahe Signalwege als auch Signalwege in der gesamten Gefäßwand aktiviert werden. Um alle Signalwege inhibieren zu können, ist eine inhibierende Therapie von allen Gefäßwandseiten sinnvoll. Eine simultane intra/extravaskuläre Administration im Organkultur-Modell wird durch die Zugabe der entsprechenden Substanz zum Kulturmedium, das die zylinderförmigen Organkultur-Segmente von allen Seiten umspült, imitiert (56). Carter et al. (8) zeigten in ihrem experimentellen Restenose-Modell des Hausschweines vergleichend mit dem ex vivo Modell vom Schwein nahezu identische Daten auf. Das ex vivo Modell zeigt jedoch gewisse Mängel: das Fehlen eines Organismus mit seinen Scherkräften, fehlende Leber- und Nierentätigkeit, sowie fehlende Blutdruckamplituden. Ebenso mangelt es an der Zirkulation von Monozyten, die nach Fukuda et. al (18) eine wichtige Rolle in der neointimalen Hyperplasie spielen, besonders in der In-Stent Hyperplasie.

In vivo könnte eine simultane intra/extravaskuläre Applikation durch die Kombination der Implantation eines beschichteten Stents mit einer extravaskulären Applikation von proliferationsinhibierenden Substanzen im Perikardsack erfolgen (28, 31,49).

5.2. Der Effekt von Mycophenolatmofetil (MMF) im Organkultur-Modell vom Schwein

MMF gehört zu den Medikamenten der Immunsuppressiva und wird erfolgreich bei Transplantationen zur Inhibition der Abstoßung angewendet (17, 41).

MMF ist eine Vorstufe der Mycophenolsäure (MPA), einem Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welches das rate-limiting Enzym in der Synthese von Guanosin Nukleotiden darstellt (2). MPA ist ein Produkt des Penicillin-Pilzes und zeigt anti-proliferative, anti-virale, anti-fungale und immunsuppressive Eigenschaften (59).

In einem Aortentransplantationens-Modell der Ratte von der Gruppe von Raisanen-Sokolowski (41) unterdrückte MMF histologische Anzeichen einer transplantationsbedingten Arteriosklerose wie Entzündung der Adventitia, Medianekrose und Intimaverdichtung. In der Replikationsrate zeigte sich eine signifikante Reduktion von Entzündungszellen in der Adventitia und den glatten Muskelzellen (SMC) der Media. Die antiproliferativen Eigenschaften von MMF wurden in einer ausführlichen Studie (34) zusammengefasst. Morath et al. (34) zeigt in seinen Studien eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation durch MPA. Laut Morath et al. (34) verbesserte MMF in Tierstudien immunsuppressive und nicht immunsuppressive Krankheitsbilder. Diese Beobachtungen veranlassten weitere Untersuchungen, um den Effekt von MMF bei proliferativen Krankheiten nicht immunsuppressiven Ursprunges am Menschen zu untersuchen. Gregory et al. (20) berichtet über eine deutliche Reduktion der SMC-Proliferation in humanen Aorten durch MMF in Anwesenheit von β -FGF oder Angiotensin II. Ebenso war die SMC alpha-Aktin Färbung signifikant erniedrigt. Zusätzlich reduziert MMF die Leukozyteninfiltration, basierend auf einer Reduktion der Expression von Lymphozytenadhäsionsmoleküle und einer Interaktion (22).

Voisard et al. (58) berichteten über eine dosisabhängige Inhibition der proliferativen glatten humanen Muskelzellen unter dem Einfluss von MMF. Die erste Hemmung zeigte sich bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/mL}$, durch die Steigerung der Konzentration auf 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, und 500 $\mu\text{g/mL}$ wurde eine 100%-ige Hemmung erreicht. In einer weiteren Studie untersuchte Voisard (59) et al. den Effekt von MMF auf Kernprozesse der Restenose. Im ersten Teil wurde der Effekt von MMF (50, 100, 150, 200, 250, und 300 $\mu\text{g/mL}$) in Northern Blot- und Zytflow-Studien untersucht. MMF in Kombination mit TNF- α stimulierte die interzelluläre Expression des Adhäsionsmoleküles 1 (ICAM-1).

In humanen koronaren Endothelzellen (HCAEC) und koronaren medialen glatten Muskelzellen (HCMSMC) wurde keine signifikante Hemmung oder Stimulation nach Zugabe der klinisch relevanten Dosis von 50 µg/mL MMF verzeichnet. Ebenso war kein hemmender Effekt in der Zytoflow-Untersuchung zu beobachten (59). Im zweiten Teil der Untersuchung wurde ein koronares Leukozyten Angriff 3D Modell eingesetzt. Dort wurden sowohl HCAEC, als auch HCMSMC auf beiden Seiten eines Polycarbonatfilters kultiviert.

Mit Zugabe humaner Monozyten (MC) auf der endothelialen Seite wurde ein Leukozytenangriff (LA) durchgeführt. Der Effekt von MMF (50 µg/mL) auf die Adhäsion und die Chemotaxis (0,5, 1, 2, 3, 4, 6, und 24 h nach Leukozytenangriff) wurde untersucht, darüberhinaus der Effekt auf die Proliferation von co-kultivierten HCMSMC. MMF inhibierte weder die MC-Adhäsion noch die MC-Chemotaxis, hemmte aber die proliferative Aktivität der co-kultivierten humanen koronaren glatten Muskelzellen (59). Im Gegensatz zu den Berichten von Voisard et al. (51, 55, 57, 58, 59, 62) konnte in den aktuellen Studien keine Inhibition der Zellproliferation gezeigt werden.

In der Vergangenheit wurde der Effekt von MMF auf das Auftreten von Restenose in begrenzten Tierstudien getestet. Eine Gruppe von Neuseeland-Kaninchen (19) wurde mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert, anschließend erfolgte die Injektion von MMF. Der anderen Gruppe wurde ein Placebo injiziert. Bei der MMF-Gruppe war die Anhäufung neointimaler SMC und die Plaqueeentwicklung deutlich reduziert.

In einer Studie von Shimizu et al. (47) wurde der Effect von MMF als Schutz vor Transplantationen entstandener Arteriosklerose untersucht. MMF wurde oral verabreicht; eine Gruppe wurde als Kontrollgruppe, eine weitere wurde mit 20 µg/kg MMF und eine andere mit 40 µg/kg MMF geführt. Die drei Gruppen wurden histologisch und immunhistochemisch ausgewertet. Die Auswertung zeigte, dass MMF schützendes Potential bei Atherosklerose besitzt. Die Arbeitsgruppe von Fraser-Smith (17) zeigte in einem Ratten-Modell an Carotiden, dass oral verabreichtes MMF die Restenose nach Verletzung der Arterie hemmt.

Mit einer täglich oral verabreichten Dosis von 30 mg MMF/kg für 6 Tage vor Verletzung der Carotis reduzierte sich die totale Gefäßwanddicke von 17% auf 25% und die Neointimadicke verringerte sich 14 Tage nach Verletzung von 48% auf 60%.

Die Zugabe von MMF 14 Tage vor Verletzung der Arterie erbringt keinen Unterschied in der Reduktion der Neointimadicke. MMF reduziert somit die Neointimadicke nach Verletzung der Carotis bei Ratten.

5.3. Mögliche Ursachen der fehlenden Wirkung von Mycophenolatmofetil

Die vorliegenden Daten zeigen, dass MMF im Schwein-Organkultur-Modell weder die reaktive Zellproliferation (7 Tage nach Ballonisierung) noch die reaktive Intima-hyperplasie (28 Tage nach Ballonisierung) hemmt.

Generell sind in der aktuellen Organkultur Studie sehr hohe Standardabweichungen zu verzeichnen, dies wurde jedoch bereits in anderen Organkultur-Studien berichtet (54, 55, 57, 59). In der Diltiazem-POC Studie (57) wurden nach einer ex vivo Ballon-isierung Diltiazem (50 µg/mL) für einen Zeitraum von 1, 2, 3, 4, 5, 6, und 7 Tagen zugegeben (57). Am Tag 7 und 28 wurden die Zellproliferation (BRDU), der Neo-intimazuwachs und das Verhalten der glatten Muskelzellen mit α -Aktin und vWF analysiert. Auch in der Diltiazem-POC Studie (57) deuten sehr hohe Standardabweichungen darauf hin, dass die statistische Signifikanz bei 7 und 28 Tagen nach Ballonisierung zwischen den BRDU-positiven Zellen in der ballonisierten Gruppe im Vergleich zu der ballonisierten/Diltiazem Gruppe nicht erreicht wurde (57).

Das Kulturmedium umspült die Enden der Segmente und deren Oberfläche, simuliert aber nicht die Perfusion innerhalb der Koronarien. Somit findet eine mangelhafte Versorgung im Inneren der Koronarie mit Kulturmedium statt. Darüber hinaus entstehen trotz vorsichtiger Präparation der Koronarien auch in der unbehandelten Kontrolle Verletzungen, die die Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren können und das Entstehen einer neointimalen Hyperplasie begünstigen kann. Somit wird es schwierig, einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollen und dem dilatierten Segment nachzuweisen. Ein weiteres Problem könnte der hydrophile Charakter der Substanz sein; die Substanz verbleibt auf der Gefäßoberfläche und zeigt keine Wirkung, da sie nicht in die Gefäßwand eindringen kann. In weiteren Untersuchungen sollte eine Perfusion des Organkultur-Modells durchgeführt werden. Vielleicht ist nach einer besseren Versorgung der Gefäßwand die Aussagefähigkeit des Modells zu steigern.

6. Zusammenfassung

Das Schlüsselereignis der Restenoseentstehung ist die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in den subendothelialen Raum und die Produktion von extrazellulärer Matrix. Seit der Einführung von medikamentenbeschichteten Stents (Sirolimus und Paclitaxel) wurden große Fortschritte in der Behandlung der Restenose erzielt. Bei Patienten mit Mehrgefäßerkrankungen entstehen jedoch erhebliche Kosten, da jedes einzelne Gefäß mit einem beschichteten Stent versorgt werden muss. Durch eine systemische Therapie der Restenose könnten bei diesen Patienten die Kosten reduziert werden.

Mycophenolatmofetil (MMF) ist ein neueres Immunsuppressivum mit starken antiproliferativen Effekten *in vitro*; es wurde erfolgreich bei Organtransplantationen angewendet. Dadurch, dass MMF anti-proliferative, anti-virale, anti-fungale und immunsuppressive Aktivität zur Verhinderung der Organabstoßung zeigt, könnte MMF auch in der Behandlung der Restenose erfolgreich sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von MMF im koronaren Organkultur-Modell des Hausschweins (POC-Modell) untersucht. Die Herzen von 11 frisch geschlachteten Hausschweinen wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde präpariert, in 5 mm lange zylindrische Segmente geteilt und in ein Nährmedium überführt. Die Organkulturen wurden mit 9 bar *ex vivo* dilatiert, anschließend erfolgte die Zugabe von MMF (50µg/ml) für Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 5, Tag 6 und Tag 7. Daneben wurden eine Kontrolle und eine Kontrolle dilatiert ohne MMF mitgeführt.

Basierend auf die Ergebnisse der Voruntersuchung wurde die maximale reaktive Zellproliferation am Tag 7 erwartet, die maximale reaktive Neointimahyperplasie am Tag 28. Am Tag 7 zeigte sich nach 4-tägiger Zugabe von MMF ein inhibierender Effekt, der auch diskret an Tag 7 zu erkennen war; da sich jedoch nach 5- und 6-tägiger Inkubation mit MMF keine Inhibition zeigte, kann insgesamt nicht von einer inhibierenden Wirkung gesprochen werden.

Am Tag 28 nach ex vivo Ballonisierung wurde durch die 1-7-tägigen Inkubation mit MMF weder eine klare Stimulation, noch eine klare Inhibition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht.

In der vorliegenden Studie zeigte sich nach Applikation von MMF in einer Konzentration von 50 µg/ml weder eine Inhibition der reaktiven Zellproliferation, noch eine Inhibition der neointimalen Hyperplasie. Das POC-Modell in der vorliegenden Form beinhaltet Fehlerquellen, die einer verlässlichen Anwendung im Wege stehen. Das Kernproblem liegt in dem fehlenden Anstieg der Zellproliferation und der fehlenden Hypertrophie in der dilatierten Kontrolle ohne Medikamentenzugabe. Diese fehlende Reaktion der Organkultur könnte auf eine mangelnde Perfusion des Modells zurückzuführen sein. In der perfundierten Organkultur erfolgt eine Ernährung des Modells auch von der Innenseite. Des Weiteren sollte der Dilatationsdruck dadurch erhöht werden, dass der Dilatationsvorgang in einem Kunststoffschlauch erfolgt. Trotz der bestehenden Schwierigkeiten sind ex vivo Organkultur-Modelle als sehr interessante Modelle einzustufen, die eine Annäherung an die in vivo Situation erlauben

7. Literaturverzeichnis

1. Agrotis A, Kanellakis P, Kostolias G, Di Vitto G, Wie C, Hannan R, Jennings G, Bobik A. Proliferation of neointimal smooth muscle cells after arterial injury: Dependency on interactions between fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor-9. *J Biol Chem* 279: 42221 - 42229 (2004)
2. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacol* 47: 85 - 118 (2000)
3. Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 6: 369 - 375 (1985)
4. Barten MJ, van Gelder T, Gummert JF, Boeke K, Shorthouse R, Billingham M, Morris RE. Pharmacodynamics mycophenolate Mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *Am J Transplant* 2: 719 - 732 (2002)
5. Bathia V, Bathia R, Dhindsa M. Drug-eluting stents: new era and new concerns. *Postgrad Med J*. 80: 13 - 18 (2004)
6. Betz E. Cell culture system to study progression and inhibition of intimal proliferations. *Basic Res Cardiol* 86: 79 - 86 (1991)
7. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 34: 429 - 455 (1998)
8. Carter AI, Laird IR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *Am J Cardiol* 24: 1398 - 1405 (1994)

9. Coats W, Faxon DP, Currier J. Remodelling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 40: 129 – 140 (1997)
10. Cohen DJ, Becker ER, Culler SD, Ellis S, Green LM, Schnitzler RN, Simon AW, Weintraub WS. Impact of patients characteristics, complications, and facility volume on the costs and time of cardiac catheterisation and coronary angioplasty in 70 catheterization laboratories. *Am J Cardiol* 86: 595 - 601 (2000)
11. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 49: 327 - 333 (1983)
12. Dartsch PC, Voisard R, Bauriedel G, Höfling B, Betz E. Growth characteristics and cytoskeletal organisation of cultured smooth muscle cells from human primary and restenosing lesions. *Arteriosclerosis* 10: 62 - 75 (1990)
13. Dartsch PC, Voisard R, Betz E. In vitro growth characteristics of human atherosclerotic plaque cells: Comparison of cells from primary stenosing and restenosing lesions of peripheral and coronary arteries. *Res Exp Med* 190: 77 – 87 (1990)
14. Del Rizzo DF, Moon MC, Werner JP, Zahradka P. A novel organ culture method to study intimal hyperplasia at the site of a coronary artery bypass anastomosis. *Ann Thorac Surg* 12:73-79; discussion 12: 79 - 80 (2001)
15. Donners MM, Daemen MJ, Cleutjens KB, Heeneman S. Inflammation and restenosis: implications for Therapy. *Ann Med* 35: 523 - 531 (2003)
16. Dunder Y, Hill RA, Bakhai A, Dickson R, Walley T. Angioplasty and stents in coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Scand Cardiovasc J* 38: 195 - 196 (2004)

17. Fraser – Smith EB, Rosete JD, Schatzman RC. Suppression by mycophenolate mofetil of the neointimal thickening caused by vascular injury in a rat arterial stenosis model. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1204 – 1208 (1995)
18. Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kawarabayashi T, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 43: 24 - 26 (2004)
19. Greenstein SM, Sun S, Calderon TM, Kim DY, Schreiber TC, Schechner RS, Tellis VA, Berman JW. Mycophenolate mofetil treatment reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *J Surg Res* 91: 123 - 129 (2000)
20. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc* 25: 770 - 771 (1993)
21. Guerin P, Rondeau F, Grimandi G, Heymann MF, Heymann D, Pillet P, Al Habash O, Loirand G, Pacaud P, Crochet D. Neointimal hyperplasia after stenting in a human mammary artery organ culture. *Vasc Res* 41: 46 - 53 (2004)
22. Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T. Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transpl; Immunol* 4: 64 – 71 (1996)
23. Holmes DR, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, Faxon DP, Gruentzig AR, Kelsey SF, Detre KM. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol* 53: 77c - 81c (1984)
24. Hombach V, Kochs M, Hoehner M, Osterhues HH, Koenig W, Weissmuller P. Alternatives to balloon angioplasty. Radio frequency angioplasty, directional coronary atherectomy, high frequency rotational angioplasty and coronary extraction atherectomy. *Internist* 38: 11 - 19 (1997)

25. Jonasson L, Holm I, Hansson GK. Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci* 85: 2303 - 2306 (1988)
26. Jonsson CA, Carlsten H. Mycophenolic acid inhibits inosine 5`-monophosphate dehydrogenase and suppresses immunoglobulin and cytokine production of B cells. *Int Immunopharmacol* 3: 31 – 37 (2003)
27. Lafont A, Faxon D Why do animal models of post-angioplasty restenosis poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res* 39: 50 - 59 (1998)
28. Laham RJ, Simons M, Hung D. Subxyphoid access of the normal pericardium: a novel drug delivery technique. *Catheter Cardiovasc Interv* 47: 109 - 111 (1999)
29. Libby P, Tanaka H. The molecular basis of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 40: 97 - 106 (1997)
30. Lidington EA, Haskard DO, Mason JC. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activtaed receptor 1 and protein kinases C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement mediated injury. *Blood* 96: 2784 - 2792 (2000)
31. Macris MP, Igo SR. Minimally invasive access of the normal pericardium: initial clinical experience with a novel device. *Clin Cardiol* 22 (1Suppl 1): 136 - 139 (1999)
32. Mele TS, Halloran P. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology*. 47: 215 - 245 (2000)
33. Mohacsi PJ, Tuller D, Hullinger B, Wijngaard PL. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* 16: 484 - 492 (1997)

34. Morath C, Zeier M. Review of the antiproliferative properties of mycophenolate mofetil in non-immune cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 41: 465 - 469 (2003)
35. Nikol S. Restenose nach Angioplastie-Interventionsmöglichkeiten. In: Hombach V (ed) *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie*. Schattauer, Stuttgart – New York, pp 361 - 373 (2000)
36. Nobuyoshi M, Tanaka M, Fujii M, Asanuma A, Takimoto M. Thrombus formation on the aorta injured by angioplasty and its prevention with dilazep in atherosclerotic rabbits. *Thromb Res* 54: 561 – 572 (1989)
37. Ozaki H, Karaki H. Organ culture as a useful method for studying the biology of blood vessels and other smooth muscle tissues. *Jpn J Pharmacol* 89: 93 -100 (2002)
38. Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularisation. *J Clin Invest* 91: 1469 - 1480 (1993)
39. Pickering JG, Weir L, Rosenfield K, Stetz J, Jekanowski J, Isner JM. Smooth muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: implications for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol* 20: 1430 - 1439 (1992)
40. Pocock SI, Henderson HE, Rickards, Haupton IR, King SB 3th, Hamm CW, Puel I, Hueb W, Goy II Rodriguez A Meta-analysis of randomised trials comparing coronary angioplasty versus bypass surgery. *Lancet* 356: 1184 - 1189 (1995)
41. Raisanen – Sokolowski A, Vuoristo P., Myllarniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Hayry P. Mycophenolate mofetil inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts; *Transpl. Immunol* 3: 342 - 351 (1995)
42. Ross (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s *Nature* 362: 801 - 809 (1993)

43. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126 (1999)
44. Schwartz SM, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 70:117-1209 Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR Jr (1990). Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 82: 2190 - 2200 (1990)
45. 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 patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 331: 489 - 495 (1994)
46. Serruys PW, Luitjen HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter P, van den Brand. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3 and 4 months. *Circulation* 77: 361 - 371 (1988)
47. Shimizu H, Takahashi M, Takeda S, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Takeuchi K, Takeyoshi I, Morishita Y, Kobayashi E. Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Transplant*. 77: 1661 - 1667 (2004)
48. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to the injury in a pig model. *Circulation Res* 57: 105 -11 (1985)
49. Verrier RL, Waxman S, Lovett EG, Moreno R. Transatrial access to the normal pericardial space: a novel approach for diagnostic sampling, pericardiocentesis, and therapeutic interventions. *Circulation* 98: 2331 - 2333 (1998)

50. Virmani R, Farb A, Guagliumi G, Kolodgie FD. Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome. *Coronary Artery Dis* 15: 313 - 318 (2004)
51. Voisard R. Humane Restenose-Modelle: Annäherungen an die klinische Situation. Habilitationsschrift (2002)
52. Voisard R, Baur R, Herter T, Hombach V. Two decades of failing systematic restenosis trials: impact of the SI/MPL-ratio to characterize the clinical relevance of positive in vitro data. *Perfusion* 17: 186 - 197 (2004)
53. Voisard R, Dartsch PC, Seitzer U, Hannekum A, Roth D, Kochs M, Hombach V. The in vitro effect of antineoplastic agents on proliferative activity and cytoskeletal components of plaque – derived smooth muscle cells from human coronary arteries. *Coronary Artery Dis* 4: 935 - 942 (1993)
54. Voisard R, von Eicken J, Baur R, Dschwend JE, Wenderoth U, Kleinschmidt K, Hombach V, Höher M. A human arterial organ culture model of postangioplasty restenosis: results up to 56 days after ballooning *Artherosclerosis* 144: 123 - 134 (1999)
55. Voisard R, Jensch V, Baur R, Höher M, Hombach V. A coronary porcine organ culture system for studies of postangioplasty cell proliferation. *Coronary Artery Dis* 6: 657 - 665 (1995)
56. Voisard R, Koschnick S, Baur R, Vogel U, Mattfeldt T, Höher M, Hombach V. Das Transfilter Co-Kultur-Modell: Der Effekt von Diltiazem auf glatten Muskelzellen aus der koronaren Media des Menschen. In: Heinle H, Schulte H, Kaffarnik H (eds) *Arteriosklerose zerebraler Gefäße*. Kohlhammer, Stuttgart, pp 276 - 281 (1995)
57. Voisard R, E. Kucharczyk, U. Deininger, R. Baur, V. Hombach. Simultaneous intra/extravascular administration of antiproliferative agents as a new strategy to inhibit restenosis: The peak of reactive cell proliferation as a hallmark for the duration of the treatment. Research article, *BMC Cardiovascular Disorders* 2:2 (2002)

58. Voisard R, MD, Levent Gecgüner, R Baur, T Herter, V Hombach, MD. Antiproliferative Profile of Sirolimus and Mycophenolate Mofetil: Impact of the SI/MPL-Ratio. *Int. J Cardiol* 102: 435 - 442 (2005)
59. Voisard R, MD, Viola S, Kaspar V, Weber C M, von Müller L, Gastrock-Balitsch I, MD. Effects of Mycophenolate Mofetil on Key Pattern of Coronary Restenosis: a Cascade of in vitro and ex vivo Models *BMC Cardiovascular Disorders* 5:9 (2005)
60. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues H, Höher M, Hombach V. A prescreening system for potential antiproliferative agents: implications for local treatment strategies of postangioplasty restenosis. *Int J Cardiol* 51: 15 - 28 (1995)
61. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues H, Hombach V. Corticosteroid agents inhibit proliferation of smooth muscle cells from human atherosclerotic arteries in vitro. *Int J Cardiol* 43: 257 - 267 (1994)
62. Voisard R, S Voglic, R Baur, M Susa, W Koenig, V Hombach. Leucozyte attack in a 3D human coronary in-vitro model. *Coronary Artery Dis* 12: 401 -411 (2001)
63. Waltenberger J. Modulation of growth factor action: implication for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 96: 4083 – 4094 (1997)
64. Wilson DP, Saward L, Zahradka P, Cheung PK. Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model. *Cardiovasc Res* 42: 761 - 772 (1999)
65. Winslow RD, Sharma SK, Kim MC. Restenosis and drug-eluting stents. *M Sinai J Med* 72: 81 - 89 (2005)
66. Wu JC. Mycophenolate mofetil. Molecular mechanism of action. *Perspectives Drug Discovery Design*. 2: 185 (1994)

8. ANHANG

8. 1 Abbildungen (Abb.)

Abb. 1: Schweine Organkultur nach Medikamentenzugabe mit MMF : Proliferation in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ($X_m(\%) \pm SD$) bei 7 Tagen in Kultur.....	18
Abb. 2: Nachweis proliferierender Zellen nach 7 tägiger Kultivierung in der Neointima. Avidin-Biotin Färbung von BRDU (Pfeil).....	18
Abb. 3: Schweine Organkultur nach Medikamentenzugabe mit MMF : Proliferation in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ($X_m(\%) \pm SD$) bei 28 Tagen.....	19
Abb. 4: Nachweis proliferierender Zellen nach 28 tägiger Kultivierung in der Neointima.....	20
Abb. 5: Zellproliferation in der Media der Schweine Organkulturen von 7 Tagen In Kultur.....	21
Abb. 6 : Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur: Zeitverlauf des BRDU –Einbaus in der Media während der Synthesephase ($x_m(\%) \pm SD$).....	22
Abb. 7: Plaquebildung in der Schweine Organkultur von 7 Tagen Kultivierung.....	23
Abb. 8: Morphometrie der Schweine Organkultur von 7 Tagen in Kultur.....	24
Abb. 9: Morphometrie der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.....	25
Abb. 10: Plaquebildung in der Schweine Organkultur bei 28 tägiger Kultivierung.....	25
8. 2 Tabellen	
Tabelle 1: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.....	26

Tabelle 2: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.....	26
Tabelle 3: α -SM-Aktin-Gehalt der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.....	27
Tabelle 4: α -SM-Aktin-Gehalt in der Schweine Organkultur 28 Tage in Kultur.....	28
Tabelle 5: Gehalt der von Willebrand-Faktor positiven Endothelzellen in der Schweine Organkultur 7 Tage in Kultur.....	28
Tabelle 6: Gehalt der von Willebrand-Faktor positiven Endothelzellen in der Schweine Organkultur, 28 Tage in Kultur.....	29

9. Materialien, Geräte

Anatomische Pinzetten (Aesculap, Tuttlingen).....	5
Ballonkatheter 3mm (18k 2030E) Medronic, Düsseldorf.....	5
5-Bromo-2-Desoxyuridin (BRDU; Serva, Heidelberg)	5
Deckgläser AL 24 x 60 mm (Menzel-Gläser, VWR International, Ulm).....	6
2-Desoxycytidin HCL (d-Cyt. HCL; Serva, Heidelberg)	5
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) (Gibco BRL, Eggenstein)	4
3,5-3,7% Formaldehyd mit PBS ⁻ gepuffert (Fischar, Saarbrücken).....	5
Falcon Multiwell TM Gewebekulturplatte, 6 Vertiefungen (Becton Dickinson, Heidelberg).....	5
Inkubator HeraCell Partialdruck (Kendro Fellbach).....	6
Inkubator DDM-P820 (Medis Streck- und Inkubationstisch; Medis Weber, Busch).....	8
Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).....	8
Laminarflowbank Klasse 2, Type UVF 6.18 S (BDK, Sonnenbühl).....	6
Mayers Hämalaun (Chroma Gesellschaft, Köngen).....	7

Mikroskop: Nikon Optiphot-2-Mikroskop mit den Hellfeldobjektiven CF Planapochromat 4/0,20, CF Planapochromat 10/0,40, CF Planapochromat 40/1,0 Oil (Nikon Düsseldorf).....	9
Mikrotom Jung RM 2042 (Leica, Stuttgart).....	6
Minutien (Meier, München).....	5
Nadelhalter (Aesculap, Tuttlingen).....	5
N - (2-Hydroxyethyl)-piperazine- N - (2- ethansulfonsäure) (HEPES) (Cambrex, Verviers, Belgien)	4
Objektträger mit Mattrand 76 x 26 mm (Menzel-Gläser, VWR International, Ulm).....	6
Objektträger mit 2 Reaktionsfeldern (15 mm), adhäsiv beschichtet (Brenzinger, Walldorf).....	6
Paraffin: Paraplast (Vogel, Gießen).....	6
100 U/ml Penicillin (P) und 100 µg/ml Streptomycin (S) (Gibco BRL, Eggenstein)	4
Phosphate Buffered Saline mit Magnesium und Calcium (Cambrex, Verviers, Belgien) PBS ⁺	4
Phosphate Buffered Saline ohne Magnesium und Calcium (Cambrex, Verviers, Belgien) PBS ⁻	
Polysterol-Petrischalen (Greiner, Nürtingen).....	5
Rechnerprogramm BIOQUANT TM System 4 © 1989 R&M BIOMETRICS, INC. (Bilaney Consulting, Düsseldorf).....	9
Scheren (Aesculap, Tuttlingen).....	5
Summa Sketch® III (12x12) Graphiktablett mit Zeigergerät (Cursor) (Summagraphics Corporation, Seymour, USA).....	8
Silicon (Sygard 184 Kit; Sasco, Stuttgart)	5
Tissue-Tek® III Gewebe-Einbettungskapseln (Vogel, Gießen).....	6
TMS – Inversmikroskop (Nikon, Düsseldorf).....	6
Uhrmacherpinzetten (Aesculap, Tuttlingen).....	5

Vakuum Infiltrations-Prozessor Tissue-Tek® III V.I.P.™ (Miles Scientific, Elkhart, USA).....	6
Vitroclud® (E. Langenbrinck, Emmendingen).....	6
Wasserbad Julabo Type SW 20 (VWR International, Ulm).....	6
Waymouth`s MB 752/1 (WM) und Ham F12 Nutrient Mixture (F12) (Cambrex, Verviers, Belgien) im Verhältnis 1:1	4
15 % fetales Kälberserum (fcs, Charge A 01129-058; PAA Laboratories, GmbH Cölbe)	4
Tissue-Tek® III Gewebe-Einbettungskapseln (Vogel, Gießen).....	6

Elastika-van Gieson-Färbung (EVG) :

7

- Weigerts Hämatoxylin,
Lösung A: Lösung B= 2:1 (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Van Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Resorcin-Fuchsin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Mayers Hämalaun (Chroma Gesellschaft, Köngen).
- Absoluter Alkohol (Apotheke des Universitätsklinikum, Ulm).
- 25 % HCL (Merck, Darmstadt).
- Xylol (Merck, Darmstadt).

Immunhistologie

Erstantikörper

- **Antikörper zum Nachweis von BRDU:** Anti-BRDU (Anti-5-Bromo-2-Deoxyuridin; Dakopatts, Hamburg); Verdünnung 1:100 in 0,5% Tween 80 (Serva, Heidelberg) in PBS⁻.
- **Antikörper zum Nachweis von α -SM-Aktin an glatten Muskelzellen:** Anti- α - SM-Aktin (clone asm 1) (Renner, Dannstadt); Verdünnung 1:300 in PBS⁻.
- **Antikörper zum Nachweis des von Willebrand-Faktors an Endothelzellen:** Anti-vWF (Ziege polyklonal) (Incestar Stillwater, USA); Verdünnung 1:100 in PBS⁻.

Zweitantikörper

- Pferd-Anti-Maus-biotinyliert (Camon, Hamburg) Verdünnung 1:100 in PBS⁻.

- Pferd-Anti-Ziege-biotinyliert (Camon, Hamburg) Verdünnung 1:100 in PBS⁻.

Normalsera

- Pferdeserum (Dianova, Hamburg); Verdünnung 1:10 in PBS⁻.

Protease, Methanol, Immunkomplex und Salzsäure

- 0,1% -ige Protease (Sigma, Deisenhofen) in PBS⁻.

- 30% H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in Methanol (Merck, Darmstadt).

- Immunkomplex: Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Camon, Hamburg) in PBS⁻.

- 1 N HCL (Merck, Darmstadt).

5 Pufferlösungen

Phosphate Buffered Saline Dulbecco' A (PBS⁻):

Reagenzien: NaCl: Natriumchlorid (Fluka Chemie, Buchs)

KCL: Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O: di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Für 5 L PBS⁻: 40 g NaCl

1,0 g KCL

1,0 g KH₂PO₄

7,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

in Aqua bidest. lösen und pH-Wert 7,4 einstellen.

Acetatpuffer

- 210 ml 0,1 N Essigsäure (5,75 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua dest.) und 790 ml 0,1 M Natriumacetat (13,61 g Natriumacetattrihydrat (Riedel de Haen, Stuttgart) in 1 l Aqua dest.) mischen.

Substrate

- AEC-Komplex (3-Amino-9-Ethylcarbazole): 4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Sigma, Deisenhofen) in 1 ml N'N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) lösen. Unter Rühren 14 ml 0,1 M Acetatpuffer pH-Wert 5,2 und 15 µl 30 % H₂O₂ (Merck, Darmstadt) hinzufügen.

9. Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Dissertation wurden in der Abteilung Innere Medizin II der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. V. Hombach durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. R. Voisard danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die hervorragende Betreuung während der gesamten Anfertigung der Dissertation, für die vielen wertvollen Anregungen und das rege Interesse am Fortgang der Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die aufmerksame und schnelle Durchsicht des Manuskriptes.

Besonders herzlich danke ich Frau T. Herter für die freundliche und effiziente Anleitung beim Erlernen der verschiedenen Arbeitstechniken, für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung und das sehr freundschaftliche Verhältnis und angenehme Arbeitsklima. Ihre zahlreichen Hilfeleistungen waren für diese Arbeit und ihrer Durchführung von grundlegender Bedeutung. Ebenso bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Betreuung der Organkulturen in kritischen Zeiten.

Frau R. Baur danke ich für die freundliche und fachkräftige Unterstützung in der Dokumentation und Darlegung der Dissertation, sowie dem großen Engagement bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Den Mitarbeitern des Labors Prof. Dr. med. H. Hanke danke ich herzlich für die Bereitstellung des computergestützten morphometrischen Analysesystems.

Frau Engel, Abteilung Innere Medizin III Universität Ulm, danke ich für die freundliche Unterstützung beim Einbetten der Organkulturen in Paraffin.

Allen Mitarbeitern des Labors der Abteilung Innere Medizin II danke ich für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit.

Frau M. Schwab danke herzlich ich für die moralische und kulinarische Unterstützung.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Schwester Tanja Viola, deren ideelle Unterstützung sowie fundierte Computerkenntnis sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Lebensweg immer tatkräftig unterstützt haben und für mich da waren.