

Die Wirkung der Interleukine 4, 10 und 13 auf die
Koinkubation von Endothelzellen und Mononukleären
Zellen, gemessen an der Freisetzung von PDGF,
Interleukin 1 β und Interleukin 6

Jörg Kampshoff

**I. Medizinische Klinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**Die Wirkung der Interleukine 4, 10 und 13 auf die
Koinkubation von Endothelzellen und Mononukleären
Zellen, gemessen an der Freisetzung von PDGF,
Interleukin 1 β und Interleukin 6**

Jörg Kampshoff

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann, Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg (schriftl. Beurteilung)
1. apl. Prof. Dr. M. P. Gawaz (mdl. Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 22.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.02.2004 angenommen.

gewidmet meinen Eltern

Juliane und Nikolaus Kampshoff

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	3
1.1	ATHEROSKLEROSE.....	3
1.2	GRUNDLAGEN DER RESTENOSE.....	5
1.3	ZYTOKINE.....	7
1.4	ZIEL DER STUDIE.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	ZELLKULTUR.....	14
2.2	VERSUCHSABLAUF	15
2.3	PROTEINBESTIMMUNG MITTELS ELISA.....	18
2.4	STATISTIK.....	18
3	ERGEBNISSE.....	19
3.1	PDGF – FREISETZUNG	19
3.2	IL-1 β - FREISETZUNG	21
3.3	IL6 – FREISETZUNG	23
3.4	KOMBINATION DER INTERLEUKINE	25
4	DISKUSSION	29
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	37
6	LITERATURVERZEICHNIS	38
7	DANKSAGUNG	46

Verwendete Abkürzungen

ACE	Angiotensinconverting enzyme
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukin
LDL	Low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MNC	Mononukleäre Zellen
min	Minuten
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
ra	Rezeptor Antagonist
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SMC	Smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Folge der Atherosklerose wie Herzinfarkt und plötzlicher Herztod ist die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern (Libby 1998). Der Name Atherosklerose stammt aus dem Griechischen, wobei „*athere*“ Schleim und „*sclerosis*“ Verhärtung bedeutet. Synonym dazu ist heute der Begriff Arteriosklerose, also die Verhärtung von Arterien. Verschiedenen Ausprägungen an unterschiedlichen Stellen des Körpers sind bekannt. So führt eine Arteriosklerose peripherer Arterien zur *Claudicatio intermittens* oder zur Gangrän der Extremität, eine Atherosklerose der Arteria carotis zu Gehirnschämien und die Koronarsklerose zu myokardialen Ischämien. Eine erfolgreiche Vorbeugung und Therapie der Atherosklerose ist wegen der oft gravierenden Folgen sehr wünschenswert und deshalb auch Ziel zahlreicher Forschungsgruppen.

Die erste Veränderung in der Entstehung der Atherosklerose ist die erhöhte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und weiterer Plasmabestandteile als Vorstufe für die Bildung so genannter „Fatty-streaks“. Diese sind Anreicherungen von lipidhaltigen Makrophagen und T-Lymphozyten in der innersten Gefäßschicht der Intima (Ross 1993; Luscher 1996). Diese Gefäßläsion ist eine reine Entzündungsreaktion, kann schon im Fetalalter auftreten und ist reversibel (Stary 1994; Napoli 1997). Aus diesem Fatty-streak kann sich eine fibröse Plaque entwickeln. In ihrem Kern enthält diese Plaque Lipide und nekrotische Trümmer von Makrophagen, umgeben von einer dünnen Schicht aus Fibrozyten und Myozyten, dem „Fibrous cap“. Im weiteren Verlauf wandern zusätzlich zu den Leukozyten auch Myozyten in diese fibröse Plaque ein. Diese Plaque kann nun weiter wachsen, wobei es initial zu einer Ausweitung der Gefäßwand kommt. Reicht die Elastizität des Gefäßes nicht mehr aus, um die Gefäßwandverdickung zu kompensieren, führt dieses zur Einengung des Lumens (Glagov 1987). Das verminderte Lumen seinerseits führt zu einem beschleunigten Blutfluss mit Bildung von Turbulenzen oder zu einer direkten Minderversorgung des dahinter liegenden Gewebes. Turbulenzen können die Entstehung eines Thrombus, der das Gefäß akut verschließt, begünstigen. Zu einem Abbau der „Fibrous cap“ kann es unter

dem Einfluss aktivierter Makrophagen mit Freisetzung von Metalloproteinasen und andern proteolytischen Enzymen kommen. Es ist jedoch sehr selten, dass eine spontane Heilung eintritt.

Reißt der „Fibrous cap“ ein und gibt seinen Inhalt in die Blutbahn frei, kann es zur Koronarthrombose kommen. Einem Herzinfarkt geht so gut wie immer ein solcher Vorgang voraus (Baer 1996).

Eine weitere Besonderheit der Koronarsklerose ist die verdickte Intima. Wahrscheinlich kommt es durch die ständige Bewegung des Herzens zu einer mechanischen Reizung, so dass die koronare Intima eines 40-jährigen schon so dick ist, wie die umgebende Media, was eine Koronarsklerose begünstigen kann (Baer 1996). Es ist bisher nicht bekannt, dass eine solche Entwicklung einer anderen Arterie im menschlichen Körper stattfindet.

Klinisch fallen Patienten mit Veränderungen der Herzkranzgefäße erst relativ spät auf, denn koronare Herzkrankheiten verlaufen lange symptomlos. So haben 50% aller Männer als Erstsymptom einen Herzinfarkt, 36% eine Angina pectoris und 11% einen plötzlichen Herztod (Hausmann D 1999). Nach überstandener Erstmanifestation bleibt auch eine Stenosierung des Lumens bis zu 70% nahezu symptomlos.

Das Spektrum der Risikofaktoren ist groß und reicht von erhöhtem LDL, Blutglukose- und Homocysteinspiegel über freie Radikale aus Zigarettenrauch zu Infektionen mit Herpesviren oder *Clamydia pneumoniae* (Ross 1999).

Bei Betrachtung der zytokinvermittelten Reaktionen des Entstehungsmechanismus der Arteriosklerose stellt sich heraus, dass multiple Mediatoren an diesem Geschehen beteiligt sind.

Laut Ross (Ross 1999) führen PDGF, NO, Prostacycline, Angiotensin II und Endothelin zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels. Plasmabestandteile können das Lumen verlassen. Die Myozyten werden von PDGF, „Fibroblast-growth-factor-2“ und dem „Transforming-growth-factor- β “ zur Einwanderung in den „Fatty-streak“ stimuliert und führen somit zu weiteren Verdickung der Zellwand. T-Zell-Aktivierung findet über TNF- α und IL-2 statt. Die Schaumzellbildung aus Makrophagen wird angeregt durch oxydiertes LDL, MCSF, TNF- α und IL-1 β . Die „Fibrous cap“ ist die Folge einer erhöhten Freisetzung von PDGF, IL-1 β , TGF- β und TNF- α .

1.2 Grundlagen der Restenose

Bei der Behandlung einer koronaren Stenose oder eines koronaren Verschlusses, ist die *perkutane transluminale koronare Angioplastie* (PTCA) in vielen Kliniken das Mittel der Wahl. Bei diesem Verfahren wird die Engstelle mittels eines Ballons gedehnt und gegebenenfalls mittels „Stent“ gestützt.

Trotz zunehmender Erfahrung und damit Verbesserung der Langzeitergebnisse ist die Restenose eine der größten Komplikationen dieses Verfahrens. In 10-58% der dilatierten Stenosen kommt es erneut zu einem klinisch relevanten Rezidiv mit angiographisch gesicherter Stenosierung von über 50% des ursprünglichen Lumens. Dieses führt zu einer hohen Rate an Reangioplastien (Haude 1993; Serruys 1994; Kastrati 1997; Kastrati 1997).

Oemar (Oemar 1999) beschreibt drei Phasen der Restenose nach PTCA:

1. Phase: Akuter Lumenverlust aufgrund der elastischen Kontraktion innerhalb weniger Stunden nach PTCA.
2. Phase: Murale Thrombusbildung aufgrund freigelegter tiefer Gefäßstrukturen nach mechanischer Endothelzerstörung während der PTCA. Diese Thromben sind reich an Wachstumsfaktoren, unter diesen auch IL-1 und PDGF.
3. Phase: Später Lumenverschluß nach Aktivierung der Myozyten, unterteilt in drei Stadien:
 - I. Vermehrung der Myozyten in der *Tunica media* innerhalb der ersten zwei Tagen. Hier spielt der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) eine wichtige Rolle (Lindner 1991)
 - II. Vom zweiten bis zum vierzehnten Tag wandern Myozyten der Media in intimale Schichten ein. PDGF ist ein wichtiger Mediator in diesem Zusammenhang (Jawien 1992; Libby 1992)
 - III. Vermehrung von intimalen Myozyten mit Anhäufung extrazellulärer Matrix, wobei beide Mediatoren, PDGF und bFGF eine entscheidende Rolle bei der Zellvermehrung spielen. Stimulus zur Produktion extrazellulärer Matrix ist zusätzlich noch der „Transforming-growth-factor- β “ (TGF- β) (Nabel 1993)

Galea und Mitarbeiter fanden vermehrt IL-1 β in der *Adventitia*, den Endothelzellen und Makrophagen in *arteriosklerotischen Plaques*, verglichen mit Koronarien von normalen Herzen (Galea 1996). IL-1 β ist darüber hinaus sogar ein Prädiktor für Restenose. So korreliert ein erhöhter IL-1 β -Spiegel im Blut vor einer PTCA mit einem erhöhten Lumenverlust sechs Monate nach dieser Behandlung (Pietersma 1995).

Funayama und Mitarbeiter (Funayama 1998) konnten zeigen, dass bei *in vitro* Koinkubation von Endothelzellen und Monozyten eine vermehrte PDGF Konzentration gemessen werden kann, welches nach Oemar eine wichtige Rolle in der Entstehung der Restenose darstellt (Oemar 1999).

Bisher konnten immer noch keine Medikamente entwickelt werden, die die Restenose kausal verhindern können (Baer 1996). Lefkovits und Topol (Lefkovits 1997) konnten in ihrem Review keine klare Reduktion der Restenose durch Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, Ticlopidin und Thromboxan-A₂-RA feststellen. Weder Heparin, Hirudin und Hirulog verhindern eine Restenose, noch ACE-Hemmer und Fischölzusätze. Auch konnte die systemische Applikation von Medikamenten, wie zum Beispiel HMG-CoA-Reduktasehemmer (Horlitz 2001), Enoxaparin und Abciximab (Kereiakes 2001) keine deutliche Verminderung der Restenose zeigen.

Zur Verminderung und Behandlung dieser Restenose werden außer systemischer medikamentöser Therapie noch weitere Verfahren angewandt, von denen sich ebenfalls keines durchsetzen konnte.

- Verschiedene Stent-Designs (Kastrati 2001)
- Lokale, katheterverabreichte Substanzen (z.B. L-Arginin) (Schwarzacher 1997; Niebauer 1999)
- Transfer antiproliferativ wirkender Gene (von der Leyen 1995; Nikol 1998; Niebauer 1999)
- Brachytherapie mit radioaktiven Stents (Hehrlein 1995; Waksman 1998; Raizner 2000)

1.3 Zytokine

Bei der Restenoseentwicklung ist eine Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt. Es handelt sich um einen komplexen Prozess an dem eine Vielzahl von Zellen beteiligt sind. Aus diesem Interzellulären „Cross talk“ sind Zytokine bekannt, die zur Entwicklung der Restenose beitragen oder deren erhöhte Serumspiegel ein positiver Vorhersagefaktor in der Entstehung der Restenose darstellen.

Darüber hinaus sind Zytokine bekannt, die hemmenden Einfluss auf eine Entzündung nehmen. Ihre Bedeutung ist in Bezug auf die Restenoseentwicklung jedoch noch nicht definitiv geklärt.

Auf ausgewählte Zytokine wird im Folgenden näher eingegangen.

PDGF gilt als die Mitose anregendes Zytokin für Bindegewebe und spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Es ist ein chemischer Lockstoff für Monozyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, spielt aber auch in der embryonalen Angiogenese eine wichtige Rolle. Gebildet von Thrombozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen, Gliazellen und Nephrozyten wird es als Dimer sezerniert. Dieses Dimer besteht aus A- oder B-Ketten (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB) (Battegay 1994; Callard R 1994; Edelberg 1998).

Sowohl der PDGF-A als auch PDGF-B Rezeptor stimuliert das Zellwachstum. Während der A-Rezeptor je nach Zelle auch hemmende Funktionen ausübt, wirkt der B-Rezeptor immer stimulierend. Sowohl auf Makrophagen als auch auf Endothelzellen findet sich ausschließlich der B-Rezeptor (Heldin 1999).

Im Gegensatz zu IL-6 werden allerdings direkt nach Angioplastie keine erhöhten PDGF-Konzentrationen im Serum gemessen (Hojo 2000). Sucht man jedoch mittels Immunzytochemie in präparierten Koronarien, denen zuvor ein Stent implantiert wurde, nach PDGF-kodierender mRNA, so findet man eine deutliche Erhöhung nach durchgeführter Angioplastie im Vergleich zu unbehandelten Koronarien (Ueda 1996).

PDGF spielt eine große Rolle in der zweiten und dritten Phase der Restenose (Jawien 1992; Libby 1992; Nabel 1993). So konnte an Ratten, deren Arteria carotis verletzt und die danach mit rekombinanten PDGF-BB behandelt wurden, eine zwei- bis dreifache Verdickung der Media und eine 20-fache Verdickung der

Intima festgestellt werden. Auch regte PDGF die Migration glatter Muskelzellen von der Media zur Intima an (Jawien 1992).

Funayama und Mitarbeiter (Funayama 1998) untersuchten den Anstieg der PDGF-Konzentration nachdem sie auf HUVEC besiedelte 24-Well-Platten Monozyten gaben. In diesem Versuch kam es zu einer vierfachen Konzentration von PDGF gegenüber der getrennt inkubierten Monozyten oder Endothelien. Die Maximalkonzentration an PDGF wurde nach 24 Stunden gemessen.

IL-1 hat eine große Breite an biologischer Aktivität und beeinflusst viele unterschiedliche Zellen. *In vivo* löst es Akut-Phase-Reaktionen wie Fieber, Hypotonie und Gewichtsverlust aus. Es gibt zwei Isoformen, IL-1 α und IL-1 β welche an den gleichen Rezeptoren binden und ähnliche Reaktionen zur Folge haben. IL-1 α ist dabei überwiegend zellgebunden, während IL-1 β überwiegend sezerniert wird. (Dinarello 1988; Dinarello 1988).

Viele Zellentypen können IL-1 produzieren: Monozyten, Gewebsmakrophagen, B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten, Thymusepithelzellen, Astrozyten, Mikrogliazellen, Keratinozyten und Chondrozyten (Dinarello 1988; Dinarello 1988; di Giovine 1990; Callard R 1994; Galea 1996). IL-1 kann die IL-6 Produktion sowohl in Endothelzellen als auch in Monozyten stimulieren (Navarro 1989; Sironi 1989; Tosato 1990).

In einer Studie von Chamberlain und Mitarbeitern (Chamberlain 1999) ist nach Verletzung einer Koronarie durch Überdehnung mittels PTCA eine erhöhte Aktivität von IL-1 β in Endothelzellen, als auch in Adventitia- und Neointimazellen gemessen worden. Sechs Stunden nach PTCA ist der Spiegel an IL-1 β mRNA in Zellen der Arterienwand durchschnittlich zwölfmal höher als in den Zellwänden der Kontrolle. Auch im weiteren Verlauf wurde vermehrt IL-1 β in Zellwänden, Adventitia- und Endothelzellen gemessen. Dabei lag der Gipfel der Konzentration zwischen dem dritten und siebten Tag nach Intervention.

Shimokawa und Mitarbeitern (Shimokawa 1996) gelang es durch Anbringen eines IL-1 β -freigebenden Baumwollgeflechts um Koronarien, bei 2-4 Monate alten Schweinen atherosklerotische Veränderungen zu erzeugen. Darüber hinaus konnten sie die sowohl funktionell als auch histologisch sichtbaren Veränderungen dadurch hemmen, dass sie neutralisierende Antikörper gegen IL-1 β oder gegen PDGF substituierten.

IL-6, ursprünglich „Hybridoma Growth Factor“ (HGF) genannt, ist ein multifunktionales Zytokin, welches B- und T-Zellfunktionen, Hämatopoese und Akut-Phase-Reaktionen reguliert. Es wird von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mesangiumzellen und Astrozyten produziert. Im menschlichen peripheren Blut wird es jedoch hauptsächlich durch Monozyten freigesetzt (Aarden 1987; Callard R 1994).

Marina Sironi (Sironi 1989) konnte schon 1989 zeigen, dass die Freisetzung von IL-6 aus HUVEC durch IL-1 β stimuliert werden kann. Im darauf folgenden Jahr zeigten Tosato und Mitarbeiter (Tosato 1990), dass präparierte mononukleäre Zellen nach IL-1 β Stimulation ebenfalls IL-6 produzieren können. Aber auch ohne Zytokine kann die IL-6 Freisetzung *in vitro* aus HUVEC durch Hypoxie ausgelöst werden (Yan 1995).

Schon 1993 wurde bei akutem Herzinfarkt der Anstieg von IL-6 im peripheren Serum bekannt (Miyao 1993). Gleichzeitig kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl von Monozyten im Blut, welche eine gesteigerte Sensibilität gegenüber IL-6 aufweisen (Tashiro 1995). Die gesteigerte Monozytenkonzentration lässt sich über eine Dauer von mehr als zwei Wochen nachweisen.

Vergleicht man im akuten Herzinfarkt die IL-6 Konzentration von arteriellem Blut mit der des Blutes im Koronarsinus, so kann auch hier eine signifikante Konzentrationssteigerung im Koronarsinus gemessen werden (Neumann 1995). Die Konzentrationen steigen nach Reperfusion ein zweites mal an, während bei anderen Zytokinen wie IL-1 β oder TNF- α kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden kann.

Weitere Studien konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhtem IL-6 nach Angioplastie und der Entwicklung einer Restenose sechs Monate später herzustellen (Hojo 2000; Suzuki 2000; Ikeda 2001).

IL-4 wird vor allem von Mastzellen, T-Zellen und Stomazellen im Knochenmark gebildet. Es wirkt auf Monozyten, Endothelzellen, B- und T-Lymphozyten sowie Fibroblasten (Callard R 1994). Es gibt zwei Arten von Rezeptoren von denen die einen von IL-4 wie auch IL-13 stimuliert werden können (Chomarat 1998).

IL-4 gilt als antiinflammatorisches Zytokin und so wurde schon Anfang der 90er entdeckt, dass *in vitro* mit LPS stimulierte Monozyten unter Einfluss von IL-4 erheblich weniger IL-1, IL-6 und TNF α freisetzen.

An glatten Muskelzellen (SMC), gewonnen aus menschlichen Nabelschnurarterien, hemmt IL-4 vor allem in der Mitose. Es wird vermutet, dass IL-4 dadurch als protektiver Faktor an atherosklerotischen Läsionen wirkt und zu einer Minimierung der Plaquegröße beitragen kann (Vadiveloo 1994).

Über das Vorkommen von IL-4 in Koronarien oder Zusammenhänge von IL-4 mit kardialen Ischämien ist wenig bekannt.

IL-10 wurde erstmalig von Fiorentino, Bond und Mosmann 1989 unter dem Namen „cytokine synthesis inhibitory factor“ (CSIF) beschrieben (Fiorentino 1989). IL-10 ist ein von CD4⁺ T-Lymphozyten produziertes Zytokin, welches die Aktivierung der Zytokinsynthese in Monozyten, T-Zellen und natürlichen Killerzellen blockiert sowie die Proliferation von B-Lymphozyten, Mastzellen und Thymuszellen stimuliert (Callard R 1994).

Es wirkt in Monozyten hemmend auf die Synthese von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF und vielen weiteren Zytokinen. Durch die gleichzeitige Hemmung der inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF, die sich bei einer Entzündung synergistisch verhalten, wirkt es auf zwei Wegen antiinflammatorisch (Moore 2001). Zusätzlich zu diesem hemmenden Effekt stimuliert IL-10 die Produktion natürlicher Antagonisten wie IL-1ra, und löslichem p55 und p75 TNFR (Jenkins 1994; Hart 1996; Dickensheets 1997; Donnelly 1999). Auch Oberflächenstrukturen wie MHC Klasse II Antigen und CD54 (ICAM-1), CD80 und CD 86 werden durch IL-10 supprimiert (Willems 1994; Buelens 1995).

Insgesamt wirkt IL-10 auf Makrophagen wie auf Monozyten gleich, jedoch auf Monozyten deutlich ausgeprägter (Berkman 1995; Moore 2001).

Wie auch IL-13 vermag IL-10 bei in LPS stimulierten Monozyten die Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF α zu reduzieren während es gleichzeitig die Produktion von IL-1ra stimuliert. Dabei ist IL-10, vor allem zur Hemmung der TNF α -Freisetzung, deutlich potenter als IL-13 (Minty 1997).

Frangogiannis et al. (Frangogiannis 2000) untersuchten mittels PCR die IL-10 Produktion in Koronarien des Hundes nach balloninduzierter Ischämie. Dabei wurde drei Stunden nach einstündiger Okklusion deutlich mehr IL-10 mRNA in

Koronarien nachgewiesen als in der Kontrollkoronarien.. Die maximale Konzentration wurde nach 4 Tagen erreicht. Der größte Anteil wurde dabei von Lymphozyten freigesetzt Ein postischämisch gemessener Anstieg an „Tissue inhibitor of metalloproteinases“ (TIMP)-1 mRNA in Monozyten konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 inhibiert werden. Es wurde ein wichtiger Zusammenhang zwischen dem antiinflammatorischen IL-10 und der postischämischen Wundheilung am Herzen postuliert.

Abgesehen von den Wirkungen auf die Entzündungsreaktionen und die Stenoseentwicklung fördert IL-10 die NO-Freisetzung in Endothelzellen, gezeigt an Endothelzellen der Vena saphena magna. Dieses führt zur Dilatation der Gefäße und zur Abnahme der Adhäsion von mononukleärer und granulozytärer Zellen (Stefano 1997).

Aktivierte T-Zellen sezernieren **IL-13** welches die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α , und IL-8 aus LPS stimulierten Monozyten hemmt und die Produktion von IL-1ra induziert. (Callard R 1994; Minty 1997).

Es gibt zwei IL-13 Rezeptoren, die jeweils aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt sind (Chomarat 1998). Der Rezeptor mit unterschiedlichen Untereinheiten wird überwiegend auf Monozyten exprimiert, und durch IL-13 und IL-4 stimuliert (Hart 1999).

An Endothelzellen zeigt IL-13 keinen Einfluss auf das Zellwachstum, erhöht jedoch die Chemotaxis, weswegen über den antiinflammatorischen Effekt hinaus auch ein proinflammatorischer Effekt diskutiert wird (Halloran 1997). Einen minimal proinflammatorischen Effekt entdeckten auch Evans und Mitarbeiter als sie feststellten, dass IL-13 Endothelzellen vor Apoptose schützt (Evans 2000).

1.4 Ziel der Studie

Das klinische Ziel der Studie besteht in der Verminderung der Restenoserate nach PTCA. Arteriosklerose und Restenose stehen in direktem Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion. Hieraus folgt die Hypothese, dass eine Senkung der Entzündungsreaktion die Restenoseentwicklung senkt.

Oben genannte Studien konnten zeigen dass die Zytokine PDGF, IL-1 β und IL-6 maßgeblich an dieser Entzündungsreaktion beteiligt sind. Sie werden unter anderem beim „Cross talk“ von Endothel- mit mononukleären Zellen freigesetzt. Über die humanen Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 sind verschiedene vielfältige entzündungshemmende Wirkungen beschrieben.

Die Arbeitshypothese ist, dass diese vermehrte Entzündung, gemessen an der Sekretion von PDGF, IL-1 β und IL-6 durch Zugabe entzündungshemmender humaner Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 vermindert werden kann.

Bei *in vitro* Koinkubation von humanen mononukleären Zellen mit humanen Endothelzellen soll es zu einer vermehrten Sekretion an PDGF, IL-1 β und IL-6 kommen. Es soll gezeigt werden, dass durch Zugabe von IL-4, IL-10 und / oder IL-13 dieser Sekretionsanstieg hemmbar ist.

2 Material und Methoden

In den durchgeführten elf Versuchen wurden menschliche Endothelzellen (HUVEC) und menschliche mononukleäre Zellen (MNC) verwendet. HUVEC wurden aus Nabelschnurgewebe präpariert, MNC mittels Ficoll® Präparation (Erläuterung siehe unten) aus Vollblut gewonnen. Nach 24stündiger Inkubation wurde im Überstand des Mediums beider Zellarten die Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und PDGF mittels Elisa gemessen. Diese Werte wurden verglichen mit dem des Überstandes der Koinkubation beider Zellarten.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 auf diese Zytokinfreisetzung untersucht.

Die für diesen Versuch benutzten HUVEC wurden zum größten Teil durch Präparation aus frischem Nabelschnurgewebe gewonnen, sowie von der Firma CellSystems® (St. Katharinen, Deutschland) käuflich erworben. Die Zellen wurden in „Endothelial Cell Growth Medium: Customer Formulation“ der Firma PromoCell® (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) gezüchtet. Zum Lösen der HUVEC vom Flaschengrund wurde „Trypsin-Solution“ (PromoCell) verwendet. 24 Stunden vor geplanter Koinkubation wurde das Wachstumsmedium gegen „Starving-Medium“ ausgetauscht, welches auch während der Koinkubation als Medium diente. Das „Starving-Medium“ setzte sich wie folgt zusammen: M199 (SIGMA Cell Culture, Saint Louis, USA), endotoxinfreies BSA 0,5%, Insulin 10 μ g/ml, Transferrin 10 μ g/ml, Penicillin /Streptomycin 1% und Glutamin 2mmol/l. Zur Gewinnung der MNC wurde frisches Spenderblut mit CPDA zur Antikoagulation versehen und die MNC durch Separation mittels Ficoll-Plaque® (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gewonnen.

Die zugesetzten humanen Interleukine (IL-4, IL-10 und IL-13) wurden von der Firma SIGMA Cell Culture hergestellt.

Der PDGF und der IL-1 β Enzym-Immunoassay wurde von R&D Systems (Wiesbaden-Nordendstadt, Deutschland) hergestellt, der IL-6 Enzym-Immunoassay stammt von DPC Biermann GmbH (Bad Bauheim, Deutschland).

2.1 Zellkultur

Da die mononukleären Zellen für jeden Versuch frisch gewonnen werden konnten, mussten nur HUVEC in Kultur gezüchtet werden. Dabei wurde als Nährmedium die „Customer Formulation“ von PromoCell® verwendet. Das Medium, 20ml/Flasche, wurde alle 72 Stunden gewechselt. War der Boden der Flasche, nach mikroskopischer Beurteilung, mit HUVEC dicht besiedelt, was etwa 10 Tage nach Aussaat erreicht war, wurden die Zellen einer Flasche gelöst. Zum Lösen der Zellen vom Flaschengrund wurden 3ml „Trypsin-Solution“ (PromoCell®), nach Absaugen des Nährmediums, hinzugegeben. Die in „Trypsin-Solution“ gelösten Zellen wurden abgesaugt und in einem 50ml Kunststoffbehälter (Falcon®) mit Nährmedium auf 50ml aufgefüllt. Danach wurden die Zellen auf drei neue Flaschen aufgeteilt und mit weiteren 10ml Nährmedium pro Flasche versehen. Im Versuch wurden nur Zellen verwendet, die sich höchstens in ihrer vierten Passage befanden.

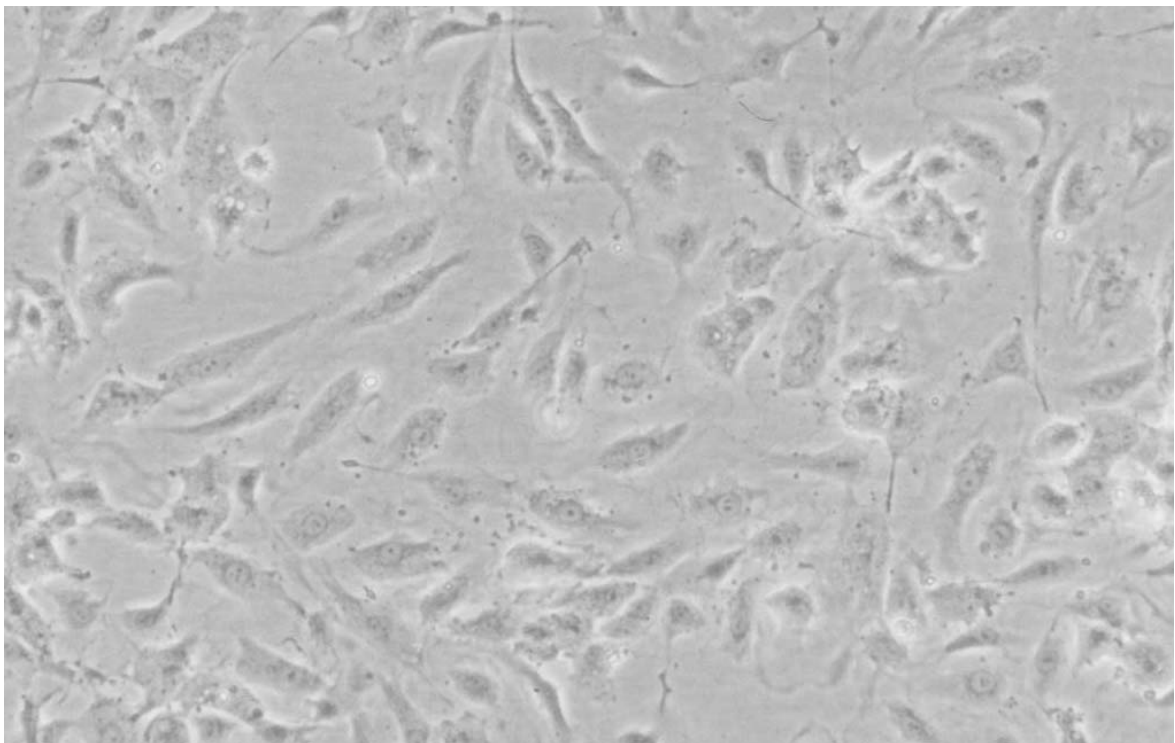


Abbildung 2-1: HUVEC in Kulturflasche vor Splitting

Ähnlich wurde auch bei der Aussaat der Zellen auf die 24-Well-Platten verfahren. Hierbei wurden die Zellen einer Flasche auf zwei 24-Well-Platten (1.000µl

Zelllösung pro Well) verteilt, wobei auf eine gleichmäßige Aussaat der Zellen auf allen Platten geachtet wurde.

Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Mikroskopisch wurde die Dichte der Zellpopulation kontrolliert. Bei gleichmäßiger Besiedelung des Bodens wurde der Versuch gestartet.

24 Stunden vor der Koinkubation wurde das Medium noch einmal abgesaugt und durch 1.000µl „Starving-Medium“ ersetzt.

2.2 Versuchsaufbau

Zur Blutentnahme wurden fünf 20ml-Einmalspritzen mit je 2 ml CPDA zur Antikoagulation vorbereitet. Dem Spender wurde am Morgen jedes Versuchstages unter Verwendung einer Butterfly-Nadel 90ml Blut entnommen, das in den bereits vorbereiteten Spritzen aufgefangen wurde.

Die Gewinnung der MNC erfolgte mittels Ficoll-Plaque® Präparation. Jeweils 20ml Ficoll-Plaque® wurde in eine entsprechende Anzahl 50ml-Kunststoffeinmalgefäße gegeben. Das gewonnene Blut wurde vorsichtig auf den Ficoll®-Gradienten gegeben. Dabei wurde sehr darauf geachtet, dass sich beide Lösungen des Gradienten nicht miteinander vermengten. Der Gradient wurde 17 Minuten bei Raumtemperatur mit 2100 Rpm und deaktivierter Bremse zentrifugiert. Die milchige Intermediärschicht enthielt nun die mononukleären Zellen des Spenderblutes. Diese wurden mittels einer sterilen Transferpipette in ein neues 50ml-Kunststoffeinmalgefäß gegeben, dort mit LPS-gereinigtem PBS auf 50ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1600 Rpm, 4°C, 10 min). Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurden die MNC gezählt und bis zu einer Konzentration von 2.000.000/ml verdünnt. Diese Konzentration sollte doppelt so hoch sein, wie sie für die 24 Well-Platten des Versuchs geplant waren. Diese Ansätze inkubierten dann mindestens eine Stunde bei 37°C im Brutschrank bevor sie auf die HUVEC gegeben werden konnten. Diese waren zuvor mit entsprechenden Interleukinen versetzt worden.

Vor der Koinkubation wurden ausreichende Mengen „Starving-Medium“ mit Interleukinen (IL-4, IL-10 oder IL-13) versetzt. Auch hier wurde die doppelte der

später gewünschten (200ng/ml) Konzentration angesetzt: 400 ng Interleukin / ml „Starving-Medium“.

Das Medium wurde aus allen 24-Well-Platten abgesaugt und durch 500 µl des neuen Ansatzes ersetzt. Diese Ansätze inkubierten dann mindestens eine Stunde bei 37°C im Brutschrank, bevor die MNC hinzugegeben wurden.

Bei der Koinkubation wurden 500 µl aus dem entsprechenden MNC-Ansatz in das zugehörige Well gegeben. Ein kompletter Versuchsansatz kann in Abbildung 2-1 nachvollzogen werden. Erfolgte keine MNC Zugabe, wurden 500 µl „Starving Medium“ zugegeben.

Die Proben wurden für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände wie folgt:

In allen Proben wurden mit der 1000µl Pipette der Überstand abgenommen und in ein vorher beschriftetes und gekühltes (-20°C) 1,5 ml Cup geben. Die Cups wurden in einer vorgekühlten Tischzentrifuge mit 3000 RPM, 8', 4°C zentrifugiert.

Erneut wurde der Überstand aller Proben aus den Eppendorf-Cups® mit der Pipette abgezogen und in weitere vorher beschriftete und gekühlte 1,5 ml Eppendorf-Cups® geben.

Die Proben wurden bei -20°C eingefroren und an einem der folgenden Tage mittels Elisa untersucht.

Ein kompletter Versuchsansatz sieht wie folgt aus:

Well-Platte 1			Well-Platte 2			Well-Platte 3		
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
			MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
IL4	IL4	IL4	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
			IL4	IL4	IL4	IL4	IL4	IL4
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
IL10	IL10	IL10	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
			IL10	IL10	IL10	IL10	IL10	IL10
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
IL13	IL13	IL13	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
			IL13	IL13	IL13	IL13	IL13	IL13
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
IL4+IL10	IL4+IL10	IL4+IL10	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
			IL4+IL10	IL4+IL10	IL4+IL10	IL4+IL10	IL4+IL10	IL4+IL10
HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC	HUVEC			
IL10+IL13	IL10+IL13	IL10+IL13	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC	MNC
			IL10+IL13	IL10+IL13	IL10+IL13	IL10+IL13	IL10+IL13	IL10+IL13

Abbildung 2-1: Darstellung der Versuchsansätze aufgeteilt auf drei 24-Well-Platten

2.3 Proteinbestimmung mittels Elisa

Der zentrifugierte und zellfreie Überstand wurde mittels Elisa auf seine Konzentration an IL-1 β , IL-6 und PDGF-AB untersucht. Dazu musste der Überstand zuerst auf 1:100 verdünnt werden. Für diesen Schritt wurden zu 10 μ l des Überstandes 990 μ l Verdünnungslösung in neue Eppendorf-Cups gegeben.

Die ELISA wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (PDGF und IL-1 β Enzym-Immunoassay von R&D Systems, IL-6 Enzym-Immunoassay von DPC Biermann GmbH).

2.4 Statistik

Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser Test dient zur Berechnung des Signifikanzniveaus p bei unverbunden und nicht normal verteilten Stichproben. Als signifikant galten Werte mit $p < 0,05$.

Die statistischen Test und die Erstellung der Grafiken erfolgte mittels Excel Version 98 und SPSS® Version 10.0.7. Tests auf Normalverteilung fielen durchweg negativ aus, weswegen auf Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen verzichtet wird. Stattdessen werden zur deskriptiven Statistik Median und Quartile angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 PDGF – Freisetzung

Bei Koinkubation von HUVEC und MNC kommt es zu einer signifikant höheren PDGF-Freisetzung, im Vergleich zu einzeln inkubierten HUVEC ($p < 0,001$) oder MNC ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 3-1).

Die Freisetzung an PDGF durch mononukleäre Zellen liegt nahe der Nachweisgrenze. Nabelschnurendothelien setzen dagegen knapp halb so viel PDGF frei, wie das Zellgemisch in Koinkubation. Auch die Summe ($C_{HUVEC}(PDGF) + C_{MNC}(PDGF)$) der PDGF-Konzentrationen im Überstand der jeweils einzeln inkubierten Zelllinien liegt signifikant ($p < 0,001$) unter der Konzentration der Koinkubation ($C_{HUVEC+MNC}(PDGF)$).

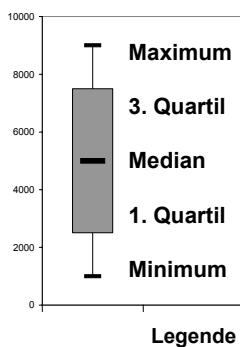
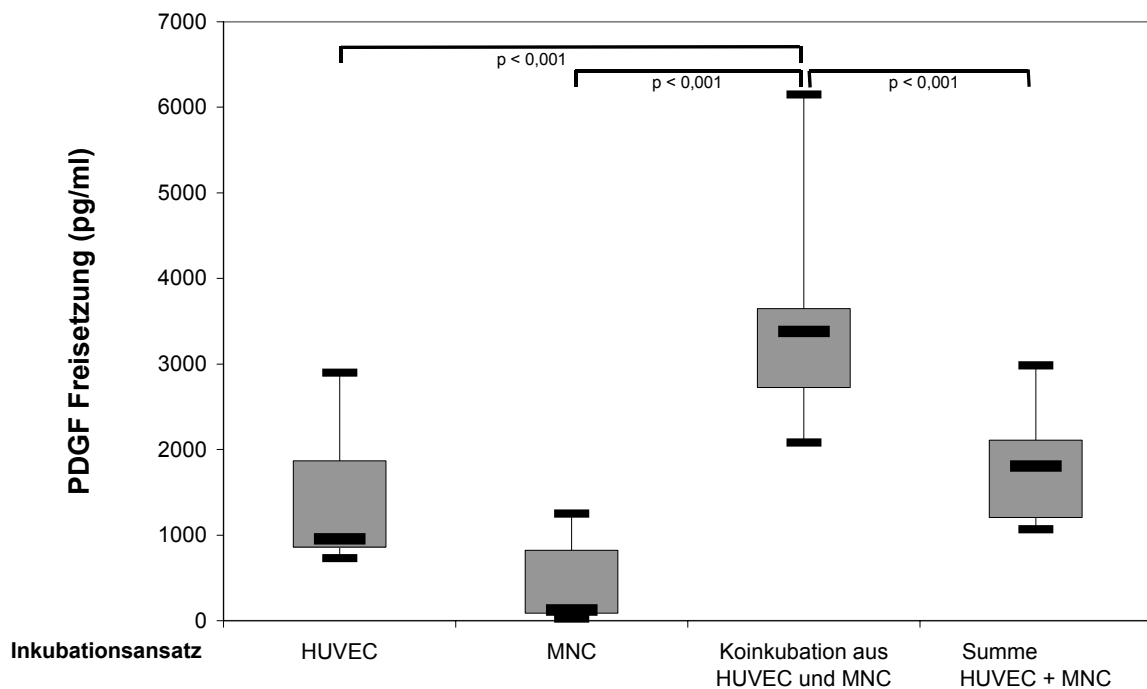


Abbildung 3-1: PDGF Freisetzung nach Einzel- und Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); n=11

Wird dem Medium der Koinkubation IL-4 oder IL-13 zugesetzt, lässt sich die Freisetzung an PDGF reduzieren. Bei Zugabe von 200ng/ml IL-4 sinkt die PDGF Konzentration um 18%. Diese Reduktion ist mit $p=0,024$ im Mann-Whitney-Test signifikant. Unter Zugabe von IL-13 tritt eine Suppression um 34% auf. Diese ist ebenfalls mit $p=0,003$ signifikant (siehe Abbildung 3-2).

Für IL-10 kann lediglich ein geringer Hemmeffekt gezeigt werden. Die PDGF-Konzentrationen nach IL-10 Zugaben liegen nach Abbildung 3-2 nur geringfügig unter den PDGF Konzentrationen ohne eine Interleukinzugabe. Dieser Unterschied, von 2.997pg/ml gegenüber 3.381pg/ml im Median, stellt sich nach statistischer Analyse als nicht signifikant heraus.

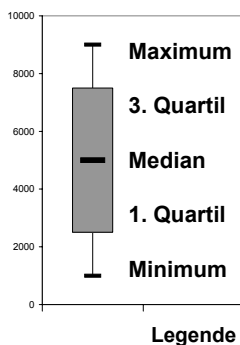
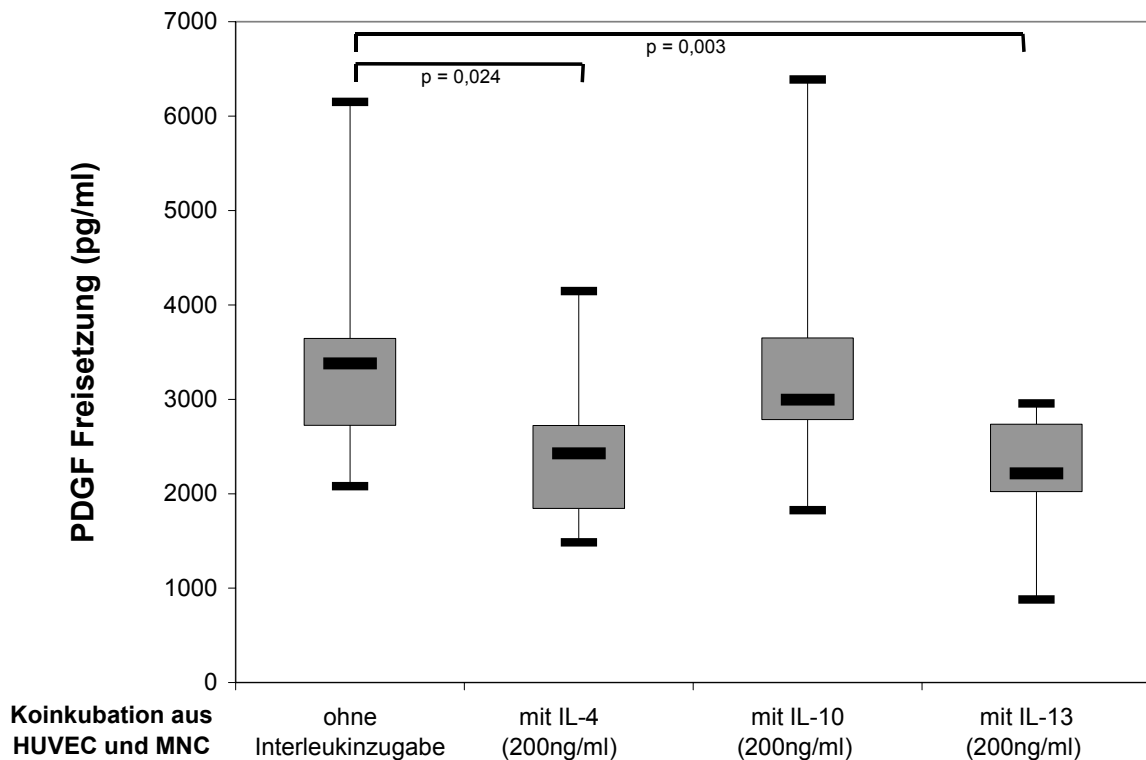


Abbildung 3-2: PDGF Freisetzung nach Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC) unter Einfluss der Zugabe von jeweils 200ng/ml Interleukin 4, 10 oder 13; $n = 11$

3.2 IL-1 β - Freisetzung

Nach 24stündiger Inkuabtion von MNC kann eine hohe Konzentration von IL-1 β im Überstand nachgewiesen werden. Im Median beträgt sie 2.471pg/ml. HUVEC setzen dagegen wenig IL-1 β frei, im Median 10pg/ml. In Koinkubation liegt die Konzentration von IL-1 β bei 940pg/ml. Diese ist somit geringer als die IL-1 β Konzentration, freigesetzt durch einzelnkubierte MNC (siehe Abbildung 3-3). Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

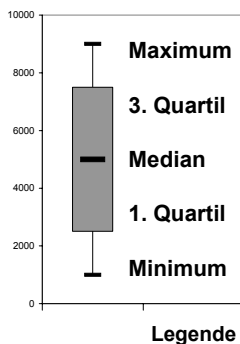
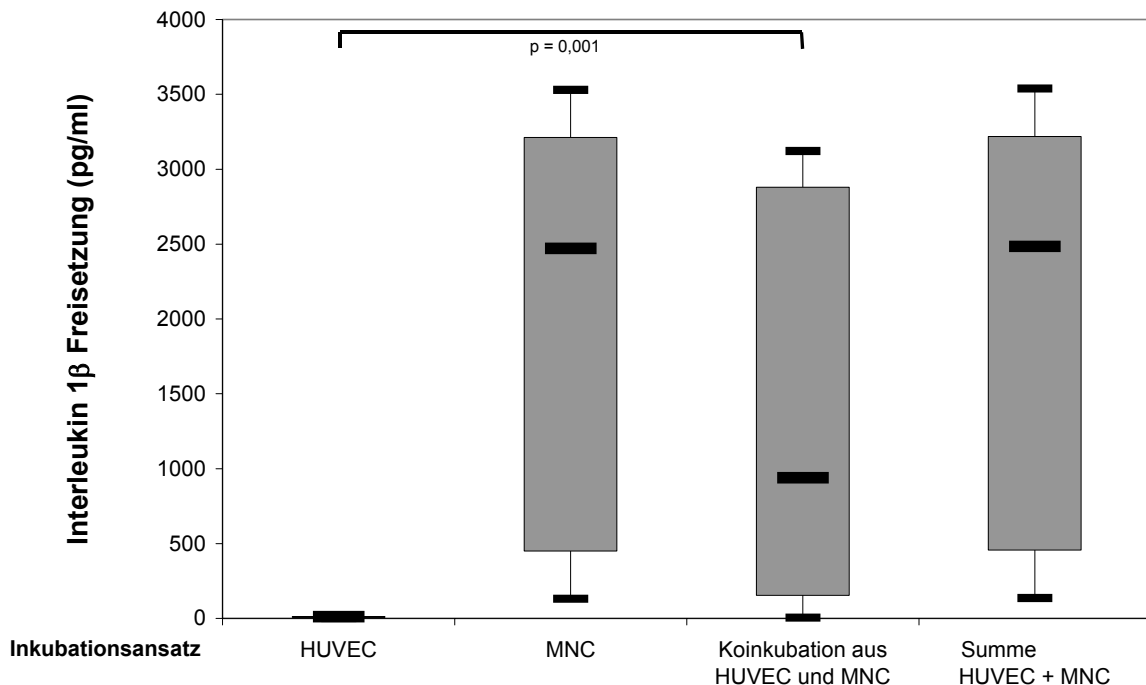


Abbildung 3-3: IL-1 β Freisetzung nach Einzel- und Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); n=11

Die Hemmung der IL-1 β -Freisetzung durch IL-4, IL-10 und IL-13 stellt sich in der Koinkubation dar, ist jedoch nicht immer signifikant nachweisbar (siehe Abbildung 3-4). In der Koinkubation wird die niedrigste IL-1 β Konzentration nach Zugabe von IL-10 erreicht. Der Unterschied zur Koinkubation ohne Interleukinzugabe wird mit $p=0,045$ als signifikant gewertet. Nach IL-4 und IL-13 Zugabe sinkt die Konzentration an IL-1 β ebenfalls (siehe Abbildung 3-4). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant mit: IL-4, $p=0,224$; IL-13, $p=0,147$.

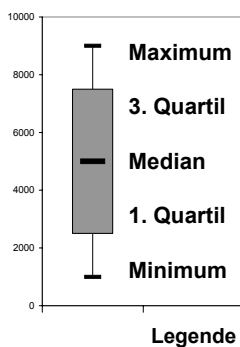
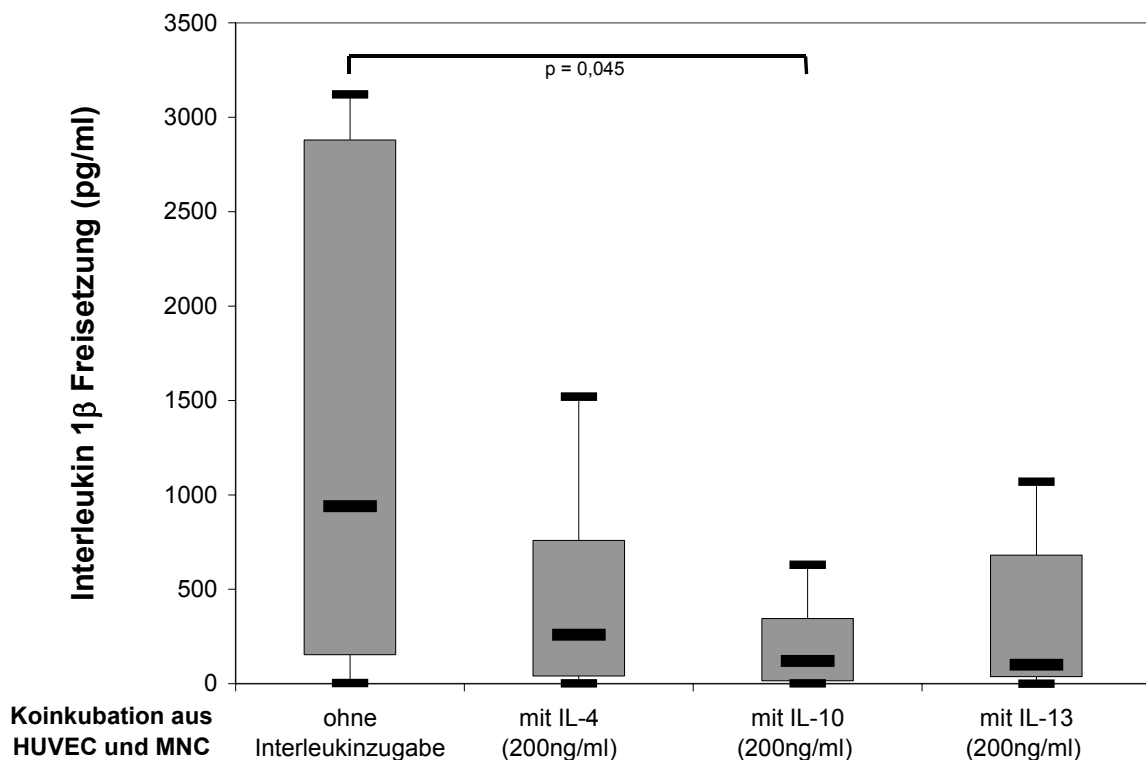


Abbildung 3-4: IL-1 β Freisetzung nach Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC) unter Einfluss der Zugabe von jeweils 200ng/ml Interleukin 4, 10 oder 13; $n = 11$

3.3 IL6 – Freisetzung

In Einzelinkubationen von HUVEC und MNC werden relativ geringe IL-6 Konzentrationen gemessen (siehe Abbildung 3-5). Nach Koinkubation dieser Zelllinien erhöhen sich diese Konzentrationen erheblich. Die Konzentrationen der Koinkubationen sind signifikant höher als die Summe der Konzentrationen einzelinkubierter Zellen ($p < 0,001$).

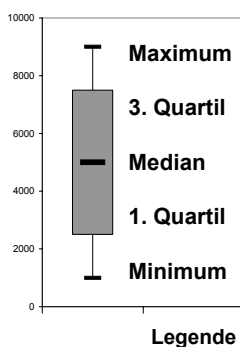
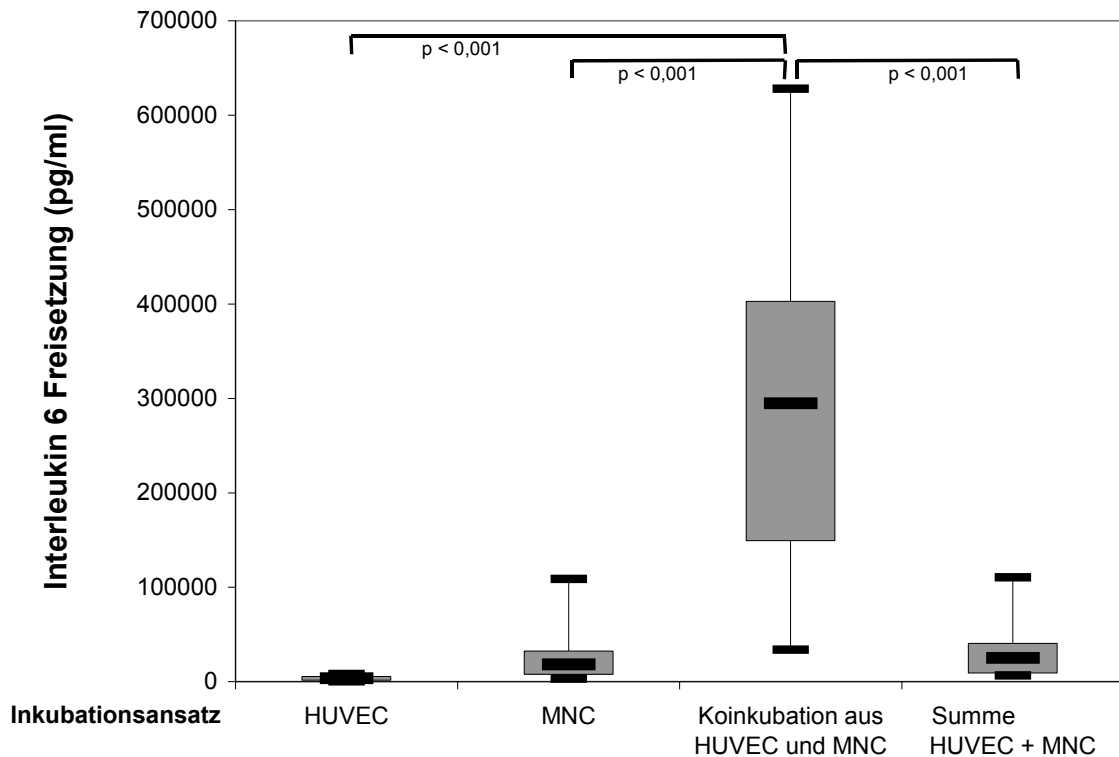


Abbildung 3-5: IL-6 Freisetzung nach Einzel- und Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); n=11

Alle getesteten Interleukine sind in der Lage, die Konzentration an IL-6 im Überstand der Koinkubationen zu senken (siehe Abbildung 3-6). Die Zugabe von 200ng/ml IL-4 bewirkt eine Reduktion der Konzentration von gelöstem IL-6 auf etwa ein Drittel, $p=0,020$. Auch Interleukin 13 stellt sich als Hemmstoff dar,

ersichtlich an $p=0,071$. Am deutlichsten vermag IL-10 die Menge an gelöstem IL-6 zu reduzieren. So wird eine Minderung des Medians unter IL-10-Zugabe auf ein Dreißigstel beobachtet, $p<0,001$.

Ähnlich wie in der Konzentrationscharakteristik von IL-1 β wird auch die Konzentration an IL-6 durch Zugabe von IL-10 am ausgeprägtesten gehemmt. Hier unterdrückt es signifikant stärker als die beiden Interleukine IL-4 ($p=0,013$) und IL-13 ($p=0,020$). Die unterschiedliche Hemmwirkung zwischen den Interleukinen IL-4 und IL-13 ist nicht signifikant.

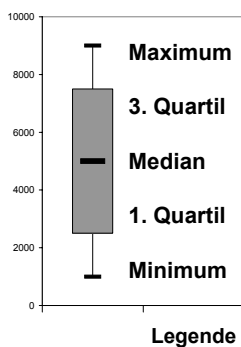
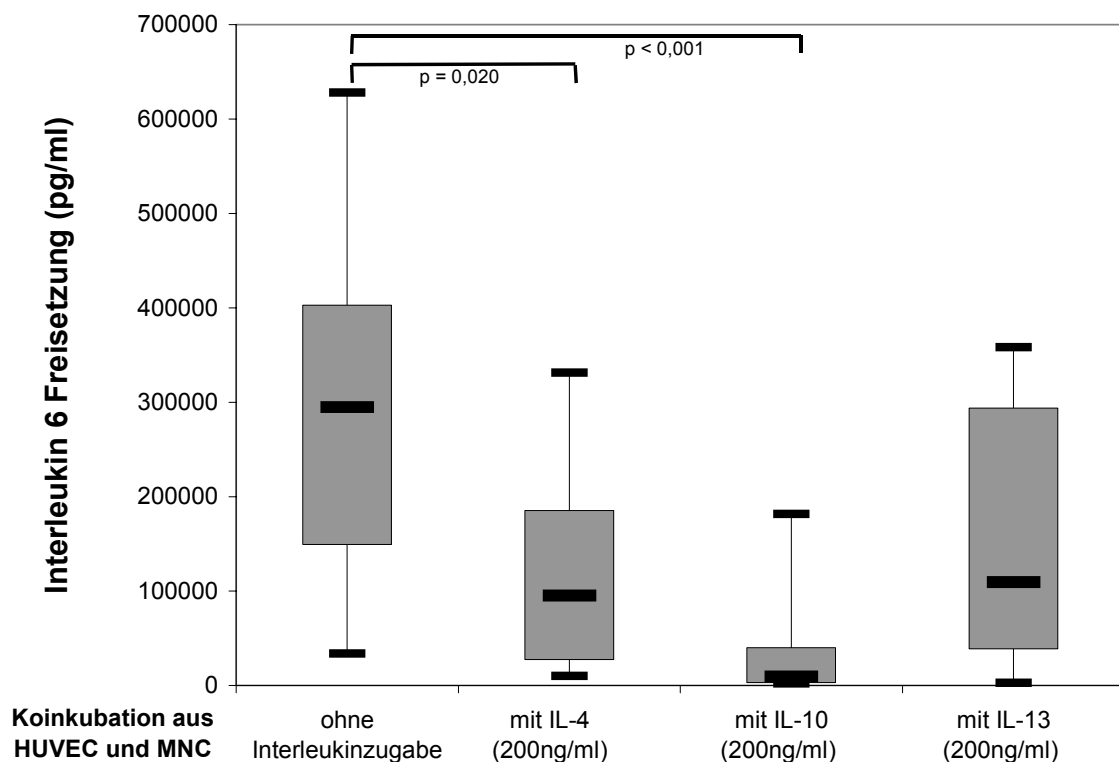


Abbildung 3-6: IL-6 Freisetzung nach Koinkubation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC) unter Einfluss der Zugabe von jeweils 200ng/ml Interleukin 4, 10 oder 13; $n = 11$

3.4 Kombination der Interleukine

In drei Versuchsreihen wird zusätzlich die Kombination aus IL-10 mit IL-4 oder IL-13 untersucht.

In keinem dieser Versuche kann eine maximale Hemmwirkung durch Kombination der Interleukine erreicht werden. In allen Versuchen erzeugt die Kombination aus IL-10 mit IL-4 bzw. IL-10 mit IL-13 ähnliche Zytokinkonzentrationen, wie sie durch alleinige Gabe von IL-10 erzielt werden.

Betrachtet man die PDGF-Freisetzung (siehe Abbildung 3-7), so wird die deutlichste Reduktion der Zytokinkonzentration durch IL-13 erreicht. Annähernd stark vermindert IL-4 die Konzentration des gelösten PDGF. Solitäres IL-10 hat bezüglich der Suppression der PDGF Konzentration etwa das gleiche Niveau wie die Kombination aus IL-4 mit IL-10. Die Kombination aus IL-10 mit IL-13 erzeugt in diesem Umfeld sogar die geringste Hemmwirkung.

Die Hemmwirkung der Interleukine und ihrer Kombinationen auf die IL-1 β Freisetzung ändert sich lediglich gering durch Kombination von Interleukinen (siehe Abbildung 3-8). Die Reduktion der Konzentration durch alle hinzugesetzten Interleukine ist deutlich zu erkennen. Dabei hemmen IL-4 und IL-13 ähnlich, aber weniger ausgeprägt als IL-10. Die Kombinationen aus IL-4 und IL-10, bzw. IL-10 und IL-13 hemmen auf gleich potentem Niveau wie solitäres IL-10.

Identisch dazu bewegen sich auch die Konzentrationen an freigesetztem IL-6, wie aus Abbildung 3-9 deutlich ersichtlich wird. Auch hier reduziert IL-10, solitär oder in Kombination mit anderen Zytokinen, am stärksten die IL-6-Konzentration.

Da sich in den drei Versuchsreihen kein Unterschied in der Hemmwirkung von solitärem IL-10 und den Kombinationen aus IL-10 mit IL-4 oder IL-13 ergaben, wurden auf weitere Versuche mit Interleukinkombinationen verzichtet.

PDGF Freisetzung

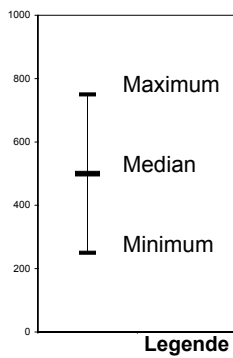
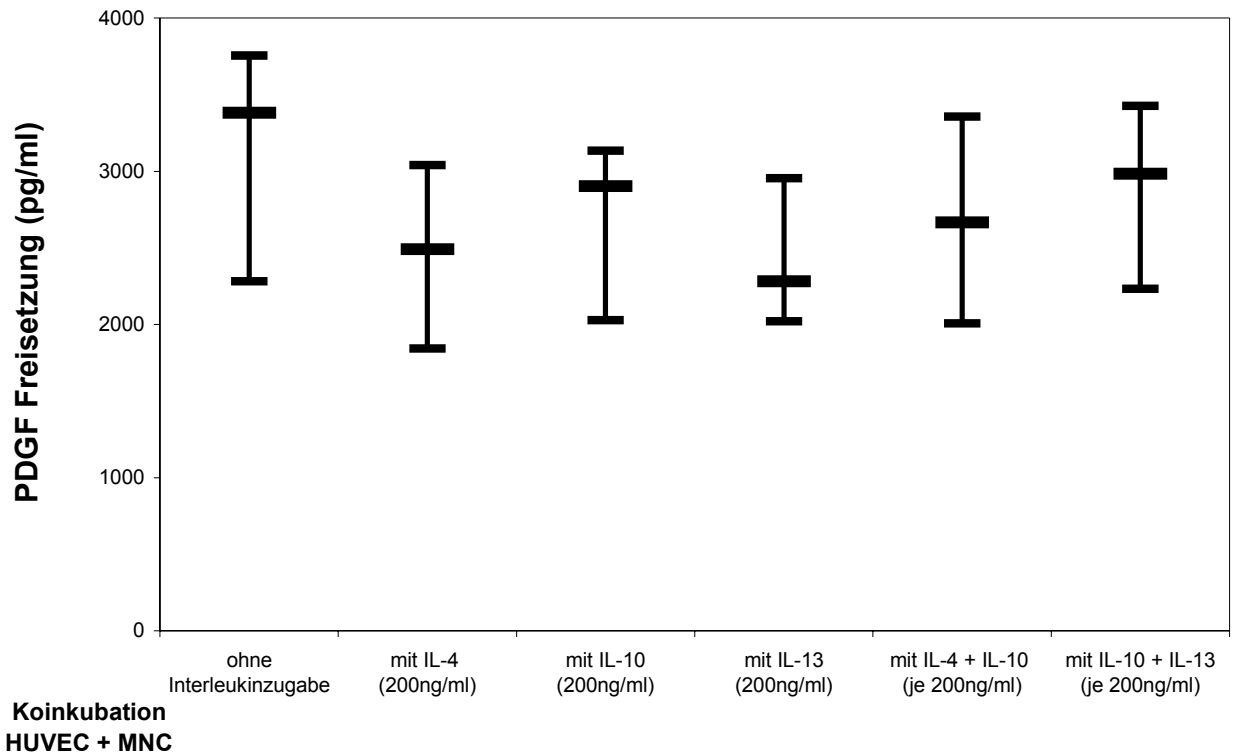


Abbildung 3-7: Hemmende Wirkung verschiedener Interleukin-kombinationen (jeweils c = 100ng/ml) auf die Freisetzung von PDGF in der Koinkubation aus „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); n = 3

IL-1 β Freisetzung

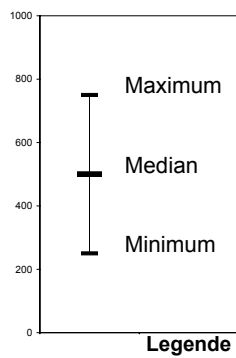
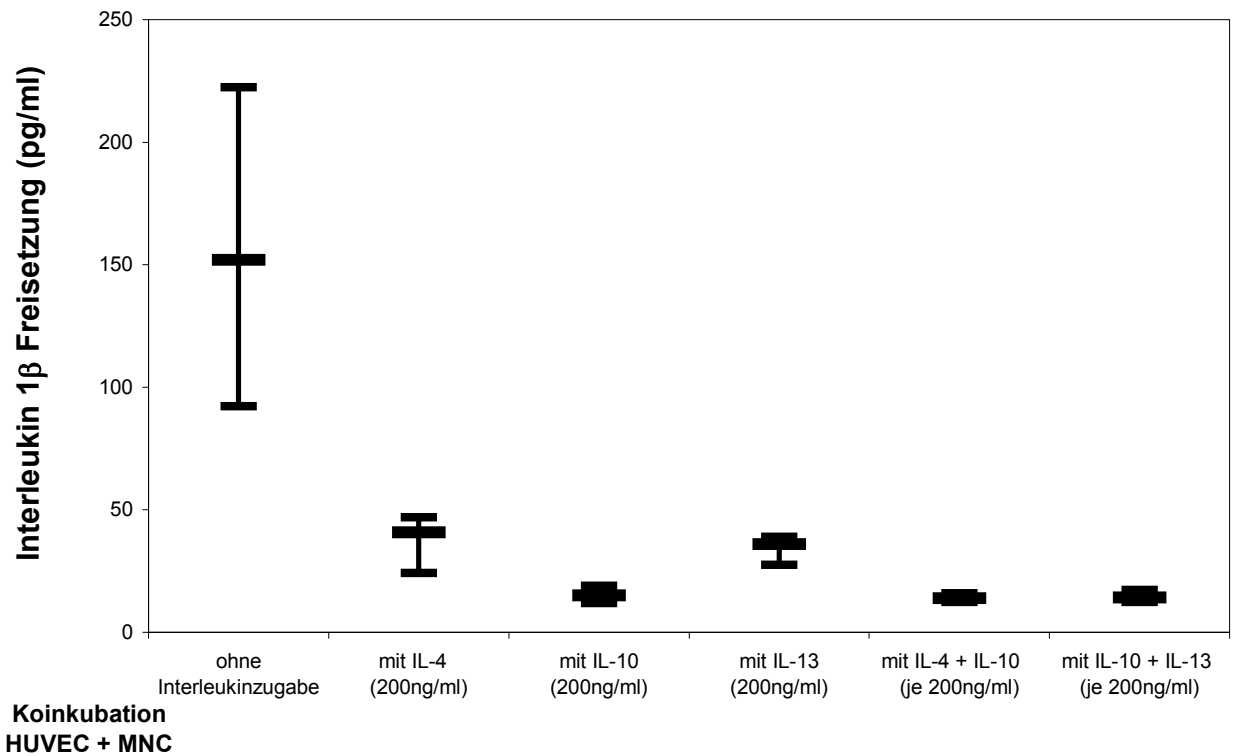
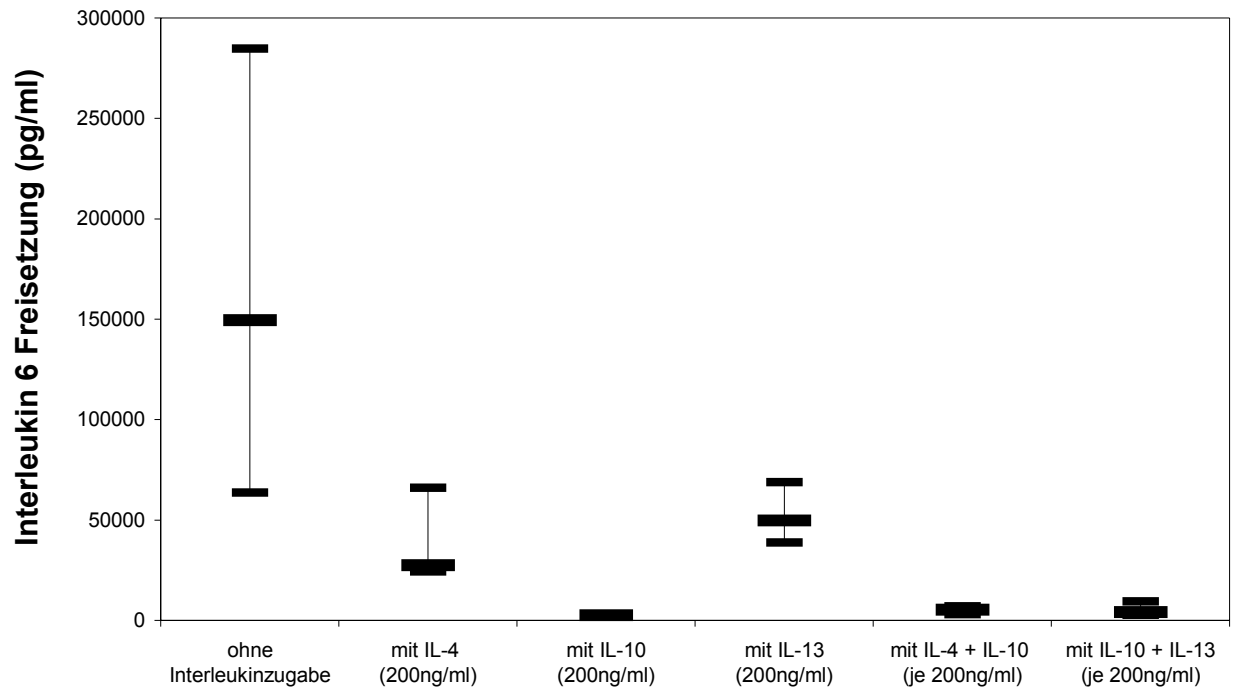


Abbildung 3-8: Hemmende Wirkung verschiedener Interleukin-kombinationen (jeweils c = 100ng/ml) auf die Freisetzung von Interleukin 1 β (IL-1 β) in der Koinkubation aus „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); n = 3

IL-6 Freisetzung



Koinkubation
HUVEC + MNC

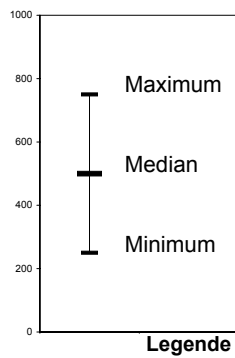


Abbildung 3-9: Hemmende Wirkung verschiedener Interleukin-kombinationen (jeweils $c = 100\text{ng/ml}$) auf die Freisetzung von Interleukin 6 (IL-6) in der Koinkubation aus „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und mononukleären Zellen (MNC); $n = 3$

4 Diskussion

Arteriosklerose und die mit ihr in Verbindung stehenden Herzerkrankungen stellen immer noch die häufigste Todesursache in Westeuropa und Nordamerika dar (Libby 1998). Restenose und Arteriosklerose haben zwar unterschiedlichen pathophysiologische Ursachen, sind jedoch beide Folge einer Entzündungsreaktion mit multifaktorieller Genese. Dementsprechend bestehen zur Zeit eine Vielzahl von unterschiedlichen Therapieansätzen (Stary 1994; Baer 1996; Napoli 1997).

Obwohl die Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose bereits sehr detailliert verstanden ist, gibt es bis heute noch keine medikamentöse Therapie, die so effektiv in den Pathomechanismus einzugreifen vermag, dass koronare Herzkrankheiten von ihrem ersten Platz in der Sterblichkeitsstatistik verdrängt werden (Lefkovits 1997).

Auch wenn man diesen gefäßokklusiven Mechanismus noch nicht bis ins letzte Detail verstanden hat, so herrscht doch allgemeiner Konsens darüber, dass hierbei eine Entzündungsreaktion eine deutliche Rolle spielt. An dieser Entzündungsreaktion, sind Endothelzellen, Myozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und weitere Leukozyten entscheidend beteiligt. Ablagerung von Lipiden, vor allem Cholesterin aus dem Blut in die Intima, führen zu einer Schädigung des Endothels. Monozyten migrieren durch das geschädigte Endothel, werden zu Makrophagen und phagozytieren Cholesterin. Dieses Cholesterin ist als wabige Struktur im Zytoplasma der Makrophagen sichtbar, weshalb sie auch Schaumzellen genannt werden (Oemar 1999). Eine Ansammlung von Schaumzellen unter dem Endothel wird als „Fatty-streak“ bezeichnet. In diesem „Fatty-streak“ führen PDGF und andere Zytokine zu der erhöhten Permeabilität des Endothels. Myozyten werden von PDGF, „Fibroblast-growth-factor-2“ und dem „Transforming-growth-factor- β “ zum Einwandern in den „Fatty-streak“ stimuliert. Die Schaumzellbildung aus Makrophagen wird weiter stimuliert durch oxydiertes LDL, MCSF, $\text{TNF}\alpha$ und IL-1. Die „Fibrous cap“ ist die Folge einer erhöhten Freisetzung von PDGF, IL-1, $\text{TGF}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ (Ross 1999). Wie wichtig IL-1 in der Entwicklung der Arteriosklerose / Restenose ist, zeigt die Studie von Shimokawa, Ito und Mitarbeitern. Wenn an Koronarien IL-1 β freisetzende Netze angebracht werden, stenosiert das Gefäß innerhalb einer

Woche um 40% (Shimokawa 1996). Für das mit IL-1 β in engem Zusammenhang stehende IL-6 ist erwiesen, dass erhöhte Serumspiegel nach Angioplastie als Prognosefaktor für eine spätere Restenose gelten (Hojo 2000; Suzuki 2000).

Wir haben somit Zytokine untersucht, die maßgebliche Botenstoffe in Arteriosklerose und Restenose sind.

Die durchgeführten Versuche fokussierten sich vor allem auf die Interaktion zwischen Endothelzellen und Mononukleären Zellen. Wie schon von Funayama und Mitarbeiter 1997 (Funayama 1998) beschrieben, erzeugt die einfache Koinkubation von Mononukleären Zellen und Endothelzellen eine Freisetzung von PDGF, eines der wichtigsten Zytokine bei der Entwicklung der Restenose, welches dort vor allem in Phase zwei und drei nach Oemar vorkommt (Oemar 1999). Im hiesigen Versuchsmodell wurde mit der Freisetzung von PDGF, auch IL-1 β und IL-6 aus dem selben Überstand mittels ELISA gemessen, da auch von diesen Zytokinen eine wichtige Rolle in der Genese der Restenose bekannt ist. Diese Koinkubation aus Mononukleären Zellen und Endothelzellen Reaktion diente als Ausgangsreaktion, welche in zusätzlichen Versuchsreihen durch Zugabe antiinflammatorischer Zytokine unterdrückt werden sollte.

Im Schwerpunkt der Untersuchung lag in Hemmung dieser Entzündungsreaktion durch körpereigene Zytokine. Es wurden hierzu die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 benutzt, deren entzündungshemmende Wirkungen aus vielen anderen Bereichen der Medizin wie zum Beispiel der Rheumatologie bekannt sind.

Da die Interleukine IL-4 und IL-13 in ihrer Wirkweise als ähnlich beschrieben sind, sich aber von der des IL-10 deutlich unterscheiden, wurden die Kombinationen der Interleukine IL-4 + IL-10 sowie IL-10 + IL-13 getestet.

Um valide Ergebnisse zu erzielen wurde auf immortalisierte Zelllinien verzichtet und stattdessen auf native humane Zellen zurückgegriffen, welche aus Vollblut gewonnen wurden. Als Endothelzellen wurden HUVEC verwendet, aus menschlichen Nabelschnüren gewonnene Endothelzellen, die sich vor dem Versuch maximal in ihrer 4. Passage befinden durften.

Am Morgen jedes Versuchstages wurde den Probanden Blut abgenommen, aus welchem mononukleäre Zellen mittels Ficoll®-Präparation gewonnen wurden. Da der Schwerpunkt der Untersuchungen in der Hemmung der Entzündungsreaktion

lag, wurde darauf verzichtet, die Monozyten via Percoll®-Präparation von den übrigen mononukleären Zellen zu separieren, da dieses zur einer Aktivierung der Monozyten führt. Der Anteil der kontaminierenden Zellen wurde mittels Cell-counter bestimmt und betrug in jedem Versuch unter 2%.

Wie auch schon von Funayama und Mitarbeitern 1997 (Funayama 1998) veröffentlicht, konnten in den durchgeführten Versuchen eine signifikant erhöhte Konzentration an **PDGF** in der Koinkubation gegenüber den Einzelinkubationen oder deren Summe festgestellt werden.

Die Zytokine IL-4 und IL-13 waren in der Lage, die Freisetzung an PDGF signifikant zu senken. Das Zytokin IL-10 zeigte, im Gegensatz zu seiner ausgeprägten Hemmwirkung der Freisetzung von IL-1 β und IL-6, nur eine geringe Hemmung der freigesetzten Menge an PDGF. Mit Blick auf einzelne Versuche zeigte sich, eine hohe Variabilität der IL-10 Wirkung. In einem Teil der Versuche konnte IL-10 die PDGF Konzentration deutlich senken; in anderen Versuchen wurde die Konzentration an PDGF durch IL-10 erhöht. Es konnte keine Ursache für diese inkonstante Wirkung gefunden werden. Der Stimulationseffekt stand weder in Zusammenhang mit den MNC Spendern noch den verwendeten HUVEC. Auch konnte keine Kontamination als Ursache für diese Reaktion verantwortlich gemacht werden, da die gemessenen Werte an IL-1 β oder IL-6 sich konstant verhielten, und auch die zur Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung durch LPS durchgeführten Tests stets negativ ausfielen. Die Ergebnisse vermögen folglich auch nicht klar zu sagen, dass IL-10 keinen Effekt auf die PDGF-Freisetzung hat.

Im Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen von Funayama und Mitarbeitern 1997 zeigt sich eine deutlich höhere basale Konzentration an PDGF im Überstand der einzelinkubierten HUVEC. So war bei Funayama die Konzentration nach 24 Stunden etwa 250pg/ml, im Gegensatz zu hier gemessenen 1.500pg/ml. Zum einen könnte der Grund darin zu finden sein, dass nur die Hälfte an Medium pro Well in einer 24-Well-Platte verwendet wurde. Zum anderen könnte auch ein anderer Elisa zu den höheren Werten geführt haben. So wurde bei Koinkubation etwa 3.500pg PDGF/ml gemessen, während bei Funayama nur etwa 1.000pg PDGF/ml gemessen wurden. Als Ursache könnte auch in Betracht gezogen werden, dass die verwendeten HUVEC durch einen unbekanntem Faktor stimuliert

wurden, und somit vermehrt PDGF freisetzen. Denkbar als Erklärung wäre auch eine reduzierte Viabilität der von Funayama verwendeten HUVEC.

Die **Interleukin 1 β** Konzentrationen wurden in Koinkubation aus HUVEC und MNC nicht vermehrt, sondern leicht vermindert gemessen, bezogen auf die Konzentrationen einzelinkubierter MNC. Damit verhielten sich die in Koinkubationen gemessenen Konzentrationen genau gegensätzlich zu den PDGF oder IL-6 Konzentrationen. Dort wurde in der Koinkubation eine Steigerung der Konzentrationen im Überstand gefunden.

Von großer Bedeutung wurde der Hemmeffekt der hinzugegebenen Interleukine betrachtet. Interleukin 10 reduzierte signifikant die Konzentration an IL-1 β bei separat inkubierten MNC sowie bei Koinkubation von MNC und HUVEC. Wie IL-10 vermochten auch IL-4 und IL-13 die Konzentration an gelöstem IL-1 β zu reduzieren. Diese Hemmung fiel jedoch weniger ausgeprägt aus.

Da alle drei Zytokine in der Lage waren, die IL-1 β Konzentration zu vermindern, stellt sich die Frage, ob es einen Unterschied im Hemmeffekt dieser drei Interleukine gibt. Nach oben gesehenen Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass IL-10 die IL-1 β Freisetzung am deutlichsten hemmt, ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Hemmwirkungen von IL-4 und IL-13 konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Sowohl HUVEC als auch MNC setzen **Interleukin 6** frei (Sironi 1989; Tosato 1990). IL-6 ist erhöht im Herzinfarkt und steht in Zusammenhang mit Entwicklung einer Restenose nach Angioplastie (Neumann 1995; Hojo 2000; Suzuki 2000; Ikeda 2001).

Bei den durchgeführten Versuchen sezernierten MNC oder HUVEC in separater Inkubation nur minimal IL-6. Die Menge an freigesetztem IL-6 in der Koinkubation aus HUVEC und MNC war etwa zwölfmal höher als die Summe der Mediane separat inkubierter HUVEC und MNC. Dieser Anstieg wird als ein Zeichen einer ablaufenden Entzündungsreaktion gewertet.

Diese Entzündungsreaktion ließ sich durch jedes der zugegebenen Interleukine hemmen. Die Hemmung durch IL-10 war hoch signifikant, wie auch die Hemmung durch IL-4 signifikant war. IL-13 hemmt, betrachtet man den Median, die IL-6

Freisetzung. Dieser Unterschied zur Kontrolle fällt jedoch nicht signifikant aus, lässt sich jedoch als Trend werten.

Für eine klinische Erprobung wird man sich gegebenenfalls auf nur eines der Interleukine beschränken müssen, da hier die Entwicklung aufwendig und teuer ist. Darum wurde untersucht, ob zwischen den Interleukinen signifikante Unterschiede in ihrer Hemmwirkung auf die IL-6 Freisetzung bestehen. Dabei stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der IL-4 und der IL-10 Wirkung sowie ein ebenfalls signifikanter Unterschied zwischen der IL-10 und der IL-13 Wirkung heraus. Zwischen den Reaktionen auf die Interleukine IL-4 und IL-13 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Somit geht hervor dass IL-10 nach unseren Versuchen der potenteste Hemmstoff auf die IL-6 Freisetzung ist.

Schon während der ersten Versuchsreihen kristallisierte sich heraus, dass sich die Zytokine IL-4 und IL-13 in ihrer Wirkung auf die Freisetzung der Entzündungsmediatoren ähneln, sich aber deutlich vom Wirkspektrum des IL-10 unterscheiden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass IL-4 und IL-13 teilweise am selben Rezeptor wirken. Dieser Rezeptor wird an Monozyten besonders häufig exprimiert (Chomarat 1998; Hart 1999).

Da wir nun die Hemmung auf zwei verschiedenen Wegen, den „IL-10 Weg“ und den „IL-4/13 Weg“, zeigen konnten, lag es nahe die Hemmwirkung einer Kombination dieser Zytokine zu testen. Deshalb wurden in einigen Versuchen Kombinationen aus IL-10 + IL-4 sowie IL-10 + IL-13 auf ihre Wirkung bezüglich der Zytokinfreisetzung untersucht.

In Betracht auf die Ergebnisse kann kein Unterschied festgestellt werden, zwischen Kombinationen aus IL-10 mit IL-4 oder IL-13 oder der solitären Zugabe von IL-10.

Um die klinische Relevanz obiger Ergebnisse beurteilen zu können, muss zuerst der Frage auf den Grund gegangen werden, ob mit PDGF, IL-1 β und IL-6 die richtigen Zytokine als Parameter für die Hemmung der Entzündungsreaktion bei Restenose untersucht wurden?

Natürlich spielen in der Entwicklung der Arteriosklerose und Restenose eine Vielzahl von Zytokinen, Oberflächenzymen und Zellen eine Rolle, die wir nicht alle untersucht werden konnten. Es wurden diese drei Zytokine zur Untersuchung

ausgewählt, da sie Botenstoffe sind, deren Bedeutung in Entzündungsreaktionen, vor allem post Angioplastie und in Verbindung mit Restenose, gesichert ist.

Nach koronarer Angioplastie werden erhöhte PDGF-mRNA Konzentrationen in den behandelten Koronarien gemessen (Ueda 1996). Von PDGF ist bekannt, dass es vor allem in der zweiten und dritten Phase der Restenose eine entscheidende Rolle spielt (Jawien 1992; Libby 1992; Nabel 1993).

Das Zytokin IL-1 β findet man ebenfalls in erhöhter Konzentration nach Angioplastie in Endothel-, Media- und Intimazellen (Chamberlain 1999). Das Anbringen von IL-1 β freisetzenden Netzen um Koronararterien von Schweinen ist in der Lage arteriosklerotische Veränderungen herbeizuführen (Shimokawa 1996). Das eng mit IL-1 β in Verbindung stehende IL-6 ist nach einem überstandenen Herzinfarkt im Serum deutlich erhöht (Miyao 1993). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem IL-6 nach Angioplastie und vermehrter Restenose nach 6 Monaten wurde beschrieben (Hojo 2000; Suzuki 2000; Ikeda 2001).

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von IL-1 β und IL-6 durch IL-10 am stärksten, aber auch durch IL-4 und IL-13 hemmen ließ. Die Konzentration von PDGF ließ sich von IL-4 und IL-13 signifikant hemmen.

Es kann vermutet werden, dass sich eine Restenoseentwicklung durch Supprimierung der Konzentrationen an IL-1 β , IL-6 oder PDGF vermindert. Wir konnten zeigen, dass durch Einsatz der körpereigenen Interleukine 4, 10 und 13 die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und PDGF supprimierbar sind. Es ist also denkbar, dass man durch Behandlung von Patienten mit den hier untersuchten Interleukinen die Restenosebildung reduzieren kann.

Soll dieses Konzept am Tiermodell getestet werden, wäre es aufgrund des deutlich größeren Aufwandes solcher Versuche empfehlenswert, diese nur mit einem, dem am stärksten hemmenden Zytokin durchzuführen. Hierzu wurde untersucht, welches der antiinflammatorischen Interleukine den stärksten Hemmeffekt zeigt:

IL-4 und IL-13 zeigen ähnliche Wirkcharakteristika. Beide hemmen im Gegensatz zu IL-10 die PDGF-Freisetzung. Sowohl IL-4 als auch IL-13 bewirken eine Suppression der Freisetzung von IL-1 β und IL-6. Diese ist jedoch deutlich ineffektiver, als die durch IL-10 bewirkte Suppression. Im direkten Vergleich

vermag IL-4 in der Tendenz stärker zu hemmen als IL-13, ohne dass dieser Unterschied jedoch signifikant wäre. Das weniger proinflammatorische IL-10 hemmt über einen anderen Wirkungsmechanismus und so vermag es die IL-1 β und IL-6 Konzentrationen am effektivsten zu reduzieren. Im Gegensatz zu IL-4 und IL-13 erweist sich IL-10 in der Supprimierung von PDGF als ineffektiv. Eine Empfehlung für weiterführende Untersuchungen mit IL-4 und IL-10 kann gegeben werden. Nicht ausgeschlossen werden kann auch, dass eine Kombination dieser beiden Zytokine *in vivo* den größten Hemmeffekt zeigt.

Das Ziel ist, die Bildung von Restenosen zu reduzieren. Hierzu müssen noch zahlreiche Fragen geklärt werden:

Es ist noch nicht geklärt, ob die Verminderung der Konzentrationen von PDGF, IL-1 β und IL-6 auch *in vivo* durch IL-4, IL-10 und IL-13 möglich ist. Weiter ist noch nicht sicher geklärt ob die Reduktion von PDGF, IL-1 β und IL-6 auch die Restenose vermindern kann. Versuche mit Antikörpern gegen IL-1 β und PDGF konnten jedoch bereits im Tierversuch die iatrogen induzierte Restenosebildung beim Schwein reduzieren (Shimokawa 1996). Eine Möglichkeit für weitere Versuche besteht darin interleukinhaltige Netze an Koronarien anzubringen, wie es Shimokawa, Ito und Mitarbeiter 1996 (Shimokawa 1996) gezeigt haben. Mit Hilfe von IL-4, IL-10 und IL-13 soll dabei ein Ausbleiben von Restenosen nach Reizungen der Koronarien erzielt werden. Zu bedenken ist, dass bei Shimokawa et al. auch die als Kontrolle fungierenden, unbeladenen Netze eine, wenn auch deutlich geringere, Stenosierung induzierten.

Um an den Koronarien eine möglichst hohe Konzentration, systemisch jedoch möglichst geringe Wirkungen zu erzielen, wäre eine lokale, intraluminale Therapie sinnvoll. Dabei kann davon profitiert werden, dass es sich bei den von in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen, im Gegensatz zu applizierten Antikörpern, um körpereigene Syntheseprodukte handelt deren DNA Sequenzen bekannt sind. Wäre es möglich in den Koronarien körpereigene Zellen zur Produktion beschriebener Zytokine zu stimulieren, wären die Möglichkeit von lokal hohen Konzentrationen der antiinflammatorischen Interleukine über einen längeren Zeitraum gegeben. Dieses könnte sich auf die Entwicklung der Restenose optimal auswirken. Eine lokale Gentherapie mittels Herzkatheter würde sich anbieten. Hierzu könnte Plasmide, Viren oder entsprechend vorbehandelte Endothelzellen in

direktem Anschluss an eine Herzkatheteruntersuchung in den Koronarien implantiert werden. Diese Zellen würden, im Gegensatz zu eingebrachten Fremdmaterialien, vor Ort die antiinflammatorischen Zytokine über einen längeren Zeitraum freisetzen ohne selbst eine Entzündung hervorzurufen oder zu triggern. Geeignete Carrier stehen zur Zeit noch nicht zur Verfügung, an ihrer Entwicklung wird jedoch vielerorts geforscht. Aufgrund unserer Forschungsergebnisse könnten folglich neue Therapiemöglichkeiten in der Behandlung der Restenose entwickelt werden.

Letztlich kann auch über eine Anwendung dieser Applikationsformen außerhalb der Kardiologie nachgedacht werden. Schließlich verhalten sich viele andere chronisch entzündliche Krankheiten wie Zirrhose, Rheumatoide Arthritis, Glomerulosklerose, Lungenfibrose und Pankreatitis bezüglich einer ablaufenden Entzündungsreaktion unter Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und PDGF ähnlich der Arteriosklerose (Ross 1999).

5 Zusammenfassung

An der Entstehung von Restenose nach Herzkatheterbehandlung sind Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) entscheidend beteiligt. Diese wurden als Marker einer entzündlichen Interaktion zwischen koinkubierten mononukleären Zellen (MNC) und menschlichen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht. Ziel war es, den Anstieg dieser Entzündungsmarker bei Koinkubation von HUVEC und MNC zu erfassen, und die Hemmung dieser entzündlichen Interaktion mittels der körpereigenen Zytokine Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 13 (IL-13) zu analysieren.

Hierzu wurden HUVEC bis zur maximal vierten Passage gezüchtet. Am Morgen jedes Versuchstages wurde Spendern Vollblut entnommen und die MNC mittels Ficoll Präparation gewonnen. Nach Zugabe der entsprechenden Interleukine erfolgte die Koinkubation. 24 Stunden nach Beginn der Koinkubation wurde die Konzentration an IL-1 β , IL-6 und PDGF der Überstände mittels ELISA gemessen. Es konnten gezeigt werden, dass die Konzentration an IL-6 und PDGF nach 24 stündiger Koinkubation signifikant gegenüber den einzelnkubierten Zellen ansteigt. Durch Zugabe von IL-4 kann die Freisetzung von IL-6 und PDGF in der Koinkubation signifikant gehemmt werden. IL-10 hemmt hochsignifikant die Freisetzung von IL-1 β und IL-6. IL-13 hemmt die PDGF Freisetzung.

Eine Kombination aus IL-4 + IL-10 oder IL-13 + IL-10 erzielt keine Steigerung der Hemmung von IL-1 β und IL-6 verglichen mit alleiniger Gabe von IL-10. Es ist also möglich durch körpereigene Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 eine Entzündungsreaktion, bei der IL-1 β , IL-6 oder PDGF freigesetzt werden, zu hemmen.

Alle untersuchten antiinflammatorischen Interleukine könnten in der Lage sein, die Restenoseentwicklung zu hemmen. Weitere Versuche sollen folgen um, die Wirkung von IL-4, IL-10 und IL-13 auf die Arteriosklerose- und Restenoseentwicklung zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L. and Lansdorp, P. M. (1987). "Production of hybridoma growth factor by human monocytes." *Eur J Immunol* 17(10): 1411-6.
- Baer, F. M. (1996). *Angiografie und Sondierung des Herzens und der herznahen Gefäße*. Klinische Kardiologie. Erdmann, E., Riecker G. Berlin - Heidelberg - New York, Springer Verlag: 199-203.
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H. and Pech, M. (1994). "PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors." *J Cell Biol* 125(4): 917-28.
- Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P. J., Barnes, P. J. and Chung, K. F. (1995). "Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL- 10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages." *J Immunol* 155(9): 4412-8.
- Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J. P., Velu, T. and Goldman, M. (1995). "Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells." *Eur J Immunol* 25(9): 2668-72.
- Callard R, G. A. (1994). *The Cytokine FactsBook*. San Diego, Academic Press Inc.
- Chamberlain, J., Gunn, J., Francis, S., Holt, C. and Crossman, D. (1999). "Temporal and spatial distribution of interleukin-1 beta in balloon injured porcine coronary arteries." *Cardiovasc Res* 44(1): 156-65.
- Chomarat, P. and Banchereau, J. (1998). "Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies." *Int Rev Immunol* 17(1-4): 1-52.
- di Giovine, F. S. and Duff, G. W. (1990). "Interleukin 1: the first interleukin." *Immunol Today* 11(1): 13-20.
- Dickensheets, H. L., Freeman, S. L., Smith, M. F. and Donnelly, R. P. (1997). "Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes." *Blood* 90(10): 4162-71.
- Dinarello, C. A. (1988). "Biology of interleukin 1." *Faseb J* 2(2): 108-15.
- Dinarello, C. A. (1988). "Interleukin-1." *Ann N Y Acad Sci* 546: 122-32.

- Donnelly, R. P., Dickensheets, H. and Finbloom, D. S. (1999). "The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes." *J Interferon Cytokine Res* 19(6): 563-73.
- Edelberg, J. M., Aird, W. C., Wu, W., Rayburn, H., Mamuya, W. S., Mercola, M. and Rosenberg, R. D. (1998). "PDGF mediates cardiac microvascular communication." *J Clin Invest* 102(4): 837-43.
- Evans, P. C. and Kilshaw, P. J. (2000). "Interleukin-13 protects endothelial cells from apoptosis and activation: association with the protective genes A20 and A1." *Transplantation* 70(6): 928-34.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* 170(6): 2081-95.
- Frangogiannis, N. G., Mendoza, L. H., Lindsey, M. L., Ballantyne, C. M., Michael, L. H., Smith, C. W. and Entman, M. L. (2000). "IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury." *J Immunol* 165(5): 2798-808.
- Funayama, H., Ikeda, U., Takahashi, M., Sakata, Y., Kitagawa, S., Takahashi, Y., Masuyama, J., Furukawa, Y., Miura, Y., Kano, S., Matsuda, M. and Shimada, K. (1998). "Human monocyte-endothelial cell interaction induces platelet-derived growth factor expression." *Cardiovasc Res* 37(1): 216-24.
- Galea, J., Armstrong, J., Gadsdon, P., Holden, H., Francis, S. E. and Holt, C. M. (1996). "Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(8): 1000-6.
- Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R. and Kolettis, G. J. (1987). "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." *N Engl J Med* 316(22): 1371-5.
- Halloran, M. M., Haskell, C. J., Woods, J. M., Hosaka, S. and Koch, A. E. (1997). "Interleukin-13 is an endothelial chemotaxin." *Pathobiology* 65(6): 287-92.
- Hart, P. H., Bonder, C. S., Balogh, J., Dickensheets, H. L., Donnelly, R. P. and Finlay-Jones, J. J. (1999). "Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13." *J Leukoc Biol* 66(4): 575-8.
- Hart, P. H., Hunt, E. K., Bonder, C. S., Watson, C. J. and Finlay-Jones, J. J. (1996). "Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on

- human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10." *J Immunol* 157(8): 3672-80.
- Haude, M., Erbel, R., Hafner, G., Heublein, B., Hoeppe, H. W., Franzen, D., Prellwitz, W., Lichtlen, P., Hilger, H. H. and Meyer, J. (1993). "Multicenter results of coronary implantation of balloon expandable Palmaz-Schatz vascular stents." *Z Kardiol* 82(2): 77-86.
- Hausmann D, M. A., Daniel WG (1999). *Koronare Herzkrankheiten*. Thiemes Innere Medizin TIM. Alexander K., D. W. G., Diener H.-C., Freund M., Köhler H. Matern S., Maurer H. H., Michel B. A., Nowak D., Risler T., Schaffner A., Scherbaum W. A., Sybrecht G. W., Wolfram G., Zeitz M. Stuttgart, New York, Thieme Verlag. 1. Auflage: 1096 -1122.
- Hehrlein, C., Gollan, C., Donges, K., Metz, J., Riessen, R., Fehsenfeld, P., von Hodenberg, E. and Kubler, W. (1995). "Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits." *Circulation* 92(6): 1570-5.
- Heldin, C. H. and Westermark, B. (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." *Physiol Rev* 79(4): 1283-316.
- Hojo, Y., Ikeda, U., Katsuki, T., Mizuno, O., Fukazawa, H., Kurosaki, K., Fujikawa, H. and Shimada, K. (2000). "Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis." *Heart* 84(1): 83-7.
- Horlitz, M., Sigwart, U. and Niebauer, J. (2001). "Statins do not prevent restenosis after coronary angioplasty: where to go from here?" *Herz* 26(2): 119-28.
- Ikeda, U., Ito, T. and Shimada, K. (2001). "Interleukin-6 and acute coronary syndrome." *Clin Cardiol* 24(11): 701-4.
- Jawien, A., Bowen-Pope, D. F., Lindner, V., Schwartz, S. M. and Clowes, A. W. (1992). "Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty." *J Clin Invest* 89(2): 507-11.
- Jenkins, J. K., Malyak, M. and Arend, W. P. (1994). "The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils." *Lymphokine Cytokine Res* 13(1): 47-54.
- Kastrati, A., Mehilli, J., Dirschinger, J., Pache, J., Ulm, K., Schühlen, H., Seyfarth, M., Schmitt, C., Blasini, R., Neumann, F. J. and Schomig, A. (2001).

- "Restenosis after coronary placement of various stent types." *Am J Cardiol* 87(1): 34-9.
- Kastrati, A., Schomig, A., Elezi, S., Schuhlen, H., Dirschinger, J., Hadamitzky, M., Wehinger, A., Hausleiter, J., Walter, H. and Neumann, F. J. (1997). "Predictive factors of restenosis after coronary stent placement." *J Am Coll Cardiol* 30(6): 1428-36.
- Kastrati, A., Schuhlen, H., Hausleiter, J., Walter, H., Zitzmann-Roth, E., Hadamitzky, M., Elezi, S., Ulm, K., Dirschinger, J., Neumann, F. J. and Schomig, A. (1997). "Restenosis after coronary stent placement and randomization to a 4-week combined antiplatelet or anticoagulant therapy: six-month angiographic follow-up of the Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen (ISAR) Trial [see comments]." *Circulation* 96(2): 462-7.
- Kereiakes, D. J., Grines, C., Fry, E., Esente, P., Hoppensteadt, D., Midei, M., Barr, L., Matthai, W., Todd, M., Broderick, T., Rubinstein, R., Fareed, J., Santoian, E., Neiderman, A., Brodie, B., Zidar, J., Ferguson, J. J. and Cohen, M. (2001). "Enoxaparin and abciximab adjunctive pharmacotherapy during percutaneous coronary intervention." *J Invasive Cardiol* 13(4): 272-8.
- Lefkovits, J. and Topol, E. J. (1997). "Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention." *Prog Cardiovasc Dis* 40(2): 141-58.
- Libby, P. (1998). *Cardiology. Harrison's Principal of Internal Medicine*. New York, McGraw-Hill Verlag: 1345.
- Libby, P., Schwartz, D., Brogi, E., Tanaka, H. and Clinton, S. K. (1992). "A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression." *Circulation* 86(6 Suppl): III47-52.
- Lindner, V., Lappi, D. A., Baird, A., Majack, R. A. and Reidy, M. A. (1991). "Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation." *Circ Res* 68(1): 106-13.
- Luscher, T. F., Oemar, B. S., Yang, Z. and Noll, G. (1996). "Molecular and cellular mechanisms of arteriosclerosis and restenosis: possibilities of gene therapy." *Z Kardiol* 85(7): 495-508.
- Minty, A., Ferrara, P. and Caput, D. (1997). "Interleukin-13 effects on activated monocytes lead to novel cytokine secretion profiles intermediate between

- those induced by interleukin-10 and by interferon-gamma." *Eur Cytokine Netw* 8(2): 189-201.
- Miyao, Y., Yasue, H., Ogawa, H., Misumi, I., Masuda, T., Sakamoto, T. and Morita, E. (1993). "Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction." *Am Heart J* 126(6): 1299-304.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Nabel, E. G., Shum, L., Pompili, V. J., Yang, Z. Y., San, H., Shu, H. B., Liptay, S., Gold, L., Gordon, D., Derynck, R. and et al. (1993). "Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10759-63.
- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. and Palinski, W. (1997). "Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions." *J Clin Invest* 100(11): 2680-90.
- Navarro, S., Debili, N., Bernaudin, J. F., Vainchenker, W. and Doly, J. (1989). "Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes." *J Immunol* 142(12): 4339-45.
- Neumann, F. J., Ott, I., Gawaz, M., Richardt, G., Holzapfel, H., Jochum, M. and Schomig, A. (1995). "Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction." *Circulation* 92(4): 748-55.
- Niebauer, J., Dulak, J., Chan, J. R., Tsao, P. S. and Cooke, J. P. (1999). "Gene transfer of nitric oxide synthase: effects on endothelial biology." *J Am Coll Cardiol* 34(4): 1201-7.
- Niebauer, J., Schwarzacher, S. P., Hayase, M., Wang, B., Kernoff, R. S., Cooke, J. P. and Yeung, A. C. (1999). "Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis." *Circulation* 100(17): 1830-5.
- Nikol, S. and Hofling, B. (1998). "Gene Therapy for Restenosis: Progress or Frustration?" *J Invasive Cardiol* 10(8): 506-514.

- Oemar, B. S. (1999). "Is interleukin-1 beta a triggering factor for restenosis? [editorial]." *Cardiovasc Res* 44(1): 17-9.
- Pietersma, A., Kofflard, M., de Wit, L. E., Stijnen, T., Koster, J. F., Serruys, P. W. and Sluiter, W. (1995). "Late lumen loss after coronary angioplasty is associated with the activation status of circulating phagocytes before treatment." *Circulation* 91(5): 1320-5.
- Raizner, A. E., Oesterle, S. N., Waksman, R., Serruys, P. W., Colombo, A., Lim, Y. L., Yeung, A. C., van der Giessen, W. J., Vandertie, L., Chiu, J. K., White, L. R., Fitzgerald, P. J., Kaluza, G. L. and Ali, N. M. (2000). "Inhibition of restenosis with beta-emitting radiotherapy: Report of the Proliferation Reduction with Vascular Energy Trial (PREVENT)." *Circulation* 102(9): 951-8.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* 362(6423): 801-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." *Am Heart J* 138(5 Pt 2): S419-20.
- Schwarzacher, S. P., Lim, T. T., Wang, B., Kernoff, R. S., Niebauer, J., Cooke, J. P. and Yeung, A. C. (1997). "Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty." *Circulation* 95(7): 1863-9.
- Serruys, P. W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., Emanuelsson, H., Marco, J., Legrand, V., Materne, P. and et al. (1994). "A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group." *N Engl J Med* 331(8): 489-95.
- Shimokawa, H., Ito, A., Fukumoto, Y., Kadokami, T., Nakaike, R., Sakata, M., Takayanagi, T., Egashira, K. and Takeshita, A. (1996). "Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor." *J Clin Invest* 97(3): 769-76.
- Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A. (1989). "IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells." *J Immunol* 142(2): 549-53.

- Sary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Circulation* 89(5): 2462-78.
- Stefano, G. B., Christensen, V. B., Tonnesen, E., Liu, Y., Hughes, T. K., Jr. and Bilfinger, T. V. (1997). "Interleukin-10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence." *J Cardiovasc Pharmacol* 30(1): 90-5.
- Suzuki, T., Ishiwata, S., Hasegawa, K., Yamamoto, K. and Yamazaki, T. (2000). "Raised interleukin 6 concentrations as a predictor of postangioplasty restenosis." *Heart* 83(5): 578.
- Tashiro, H., Shimokawa, H., Yamamoto, K., Nagano, M., Momohara, M., Muramatu, K. and Takeshita, A. (1995). "Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction." *Am Heart J* 130(3 Pt 1): 446-52.
- Tosato, G. and Jones, K. D. (1990). "Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes." *Blood* 75(6): 1305-10.
- Ueda, M., Becker, A. E., Kasayuki, N., Kojima, A., Morita, Y. and Tanaka, S. (1996). "In situ detection of platelet-derived growth factor-A and -B chain mRNA in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty." *Am J Pathol* 149(3): 831-43.
- Vadiveloo, P. K., Stanton, H. R., Cochran, F. W. and Hamilton, J. A. (1994). "Interleukin-4 inhibits human smooth muscle cell proliferation." *Artery* 21(3): 161-81.
- von der Leyen, H. E., Gibbons, G. H., Morishita, R., Lewis, N. P., Zhang, L., Nakajima, M., Kaneda, Y., Cooke, J. P. and Dzau, V. J. (1995). "Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1137-41.
- Waksman, R. (1998). "Intracoronary brachytherapy in the Cath Lab. Physics dosimetry, technology and safety considerations." *Herz* 23(6): 401-6.
- Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M. and Goldman, M. (1994). "Interleukin-10 inhibits B7 and

intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes." *Eur J Immunol* 24(4): 1007-9.

Yan, S. F., Tritto, I., Pinsky, D., Liao, H., Huang, J., Fuller, G., Brett, J., May, L. and Stern, D. (1995). "Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6." *J Biol Chem* 270(19): 11463-71.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem verehrten Doktorvater Herrn Professor Franz-Josef Neumann möchte ich danken für die Überlassung dieses interessante Themas und die gute Betreuung.

Herrn PD Melchior Seyfarth für ausführliche Korrektur dieser Arbeit

Meiner Freundin Theda Klaaßen für die unermüdliche Unterstützung beim Vollenden des schriftlichen Teils der Arbeit.

Allen nicht namentlich genannte Helfern, technischen Assistentinnen und mit mir im Labor arbeitenden Doktoranten für ihre Unterstützung des experimentellen Teils der Arbeit.

Meinen Eltern Juliane und Dr. Nikolaus ohne deren Unterstützung weder das Studium der Medizin noch die Vollendung dieser Arbeit möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Jörg Kampshoff

Adresse: Bruggwaldstrasse 16
CH 9008 St.Gallen

Geburtsdatum: 7. Mai 1976 in München

Schulbildung: 08/86 - 06/95 Ratsgymnasium Minden

weitere Ausbildung: 10/95 - 09/97 Universität Regensburg
10/97 – 11/01 Technische Universität München
10/98 – 10/00 Studentenvertreter der
medizinischen Fakultät der
Technische Universität München

Abschlüsse: 06/95 Abitur
11/01 Ärztliche Prüfung
08/03 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr: 1. Terial New York Hospital: Innere Medizin
2. Terial Klinikum rechts der Isar: Orthopädie
3. Terial UniversitätsSpital Zürich: Chirurgie

AiP: 02/02 – 07/03 Abteilung für Unfallchirurgie
Klinikum Universität Regensburg

Assistenzarzt: 08/03 – 01/04 Intensivstation – Klinik für Chirurgie
Klinikum Universität Regensburg

Seit 01/04 Klinik für Orthopädische Chirurgie
Kantonsspital St.Gallen (Schweiz)