

Aus dem
CharitéCentrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin
Medizinische Klinik für Kardiologie und Pulmologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. H.-P. Schultheiss

HABILITATIONSSCHRIFT

Pathophysiologie und Therapie der Koronaren Restenose

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Klaus Pels
aus Dortmund

eingereicht Oktober 2007

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

1. Gutachter Prof. Dr. V. Hombach/ Ulm
2. Gutachter Prof. Dr. H. Heinle/ Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	KORONARE RESTENOSE	3
1.2	ARTERIELLES REMODELING	5
1.3	NEOINTIMAFORMATION	9
1.4	PATHOPHYSIOLOGISCHE ROLLE DER ADVENTITIA	10
1.5	ANGIOGENESE VON VASA VASORUM UND INFLAMMATION	11
1.6	THERAPIEANSÄTZE BEI DER KORONAREN RESTENOSE	13
1.7	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	14
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	18
2.1	GEFÄßWANDREAKTION NACH KORONARER INTERVENTION	18
2.1.1	Kinetik histomorphometrischer Veränderungen	18
2.1.2	Angiogenese von Vasa Vasorum und arterielles Remodeling	24
2.1.3	Zellproliferation und Inflammation	27
2.2	KOMPLEXE TIERVERSUCHSMODELLE: GRUNDLAGE DER UNTERSUCHUNG THERAPEUTISCHER OPTIONEN BEI KORONARER RESTENOSE	32
2.3	LOKALE THERAPIE DER KORONAREN RESTENOSE	37
2.3.1	Angiogene Gentherapie und Neointimabildung	37
2.3.2	Angiogene Gentherapie und arterielles Remodeling	45
2.4	SYSTEMISCHE THERAPIE DER KORONAREN RESTENOSE	59
2.4.1	Thienopyridintherapie: Einfluss auf Proliferation/Inflammation	59
2.4.2	Thienopyridintherapie: Einfluss auf Thrombenbildung	67
3	ZUSAMMENFASSUNG	72
4	LITERATUR	75
5	DANKSAGUNG	85
6	ERKLÄRUNG	87

1. Einleitung

1.1 Koronare Restenose

Unter koronarer Restenose versteht man die erneute Lumeneinengung eines Koronararterien-Segments nach einer zuvor erfolgreich durchgeführten perkutanen koronaren Intervention (PCI), wie beispielsweise der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA), Rotablation, Atherektomie, Laserangioplastie, Stentimplantation oder der intrakoronaren Strahlentherapie (= Brachytherapie). Die koronare Restenose stellt das wesentlichste klinische Problem in der interventionellen Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) dar, welche weltweit die Haupttodesursache der Menschen ist. Die mit der KHK verbundene Morbidität und Mortalität und die Vielzahl der therapeutischen Interventionen mit den daraus resultierenden Belastungen für die Patienten sowie dem volkswirtschaftlichen Schaden (Kosten von ca. 5.000,00 € PCI mit einem Stentanteil von 80-90% aller PCI betragen ca. 750 Millionen Euro) begründen das große Interesse und die Notwendigkeit, zugrunde liegende molekulare Mechanismen zu erforschen und effektivere Therapiemöglichkeiten zu suchen. Die Restenoserate nach PCI lag initial bei ca. 40-50% und konnte zuletzt durch den Einsatz von sogenannten medikamentenbeschichteten Stents je nach Patientenrisikoprofil und Koronarmorphologie auf 10-20% gesenkt werden.

Die Restenose ist nach konventioneller PTCA auf ein komplexes Zusammenspiel von elastischen Rückstellkräften (recoil) (Block 1990), Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Myofibroblasten (Neointimaformation) und lumenreduzierendem Umbau der Gefäßwand (negativem Remodeling) zurückzuführen (Rosanio et al. 1999; Mintz et al. 1996). Die in-Stent-Restenose (ISR) hingegen ist allein durch die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix auf der luminalen Seite bzw. zur luminalen Seite des Stents bedingt.

Die derzeit auf dem Markt befindlichen Stents, unter ihnen vor allem die „drug-eluting stents“ (DES), sind zwar in der Lage die Restenoserate deutlich zu senken, aufgrund ihrer hohen Kosten und der limitierten Langzeitergebnisse, sowie der gegenüber den unbeschichteten Metallstents (sogenannter „bare metal stents“ = BMS) erhöhten Inzidenz von Spätkomplikationen ist ihr Einsatz jedoch noch nicht bei jedem Patienten und auch nicht bei jeder Art von Läsion sinnvoll (Faxon 2002). Darüber hinaus ist bis heute noch nichts über eventuelle kummulative (Neben-)Effekte bei Mehrfachimplantation solcher Stents bekannt.

Unzählige Studien haben sich in den letzten Jahren mit der Pathophysiologie und der therapeutischen Prävention der Neointimaformation nach PTCA/Stentimplantation befasst (Califf et al. 1991; Franklin & Faxon 1993; Asahara et al. 1995; Lincoff et al. 1997; Axel et al. 1997; Gradus-Pizlo et al. 1995; Shi et al. 1994), während die (Patho-)Physiologie des Remodelings weitgehend unbeachtet blieb. Jahrelang wurde postuliert, dass die Neointimahyperplasie die Hauptrolle in der Restenoseentstehung spielt (Liu et

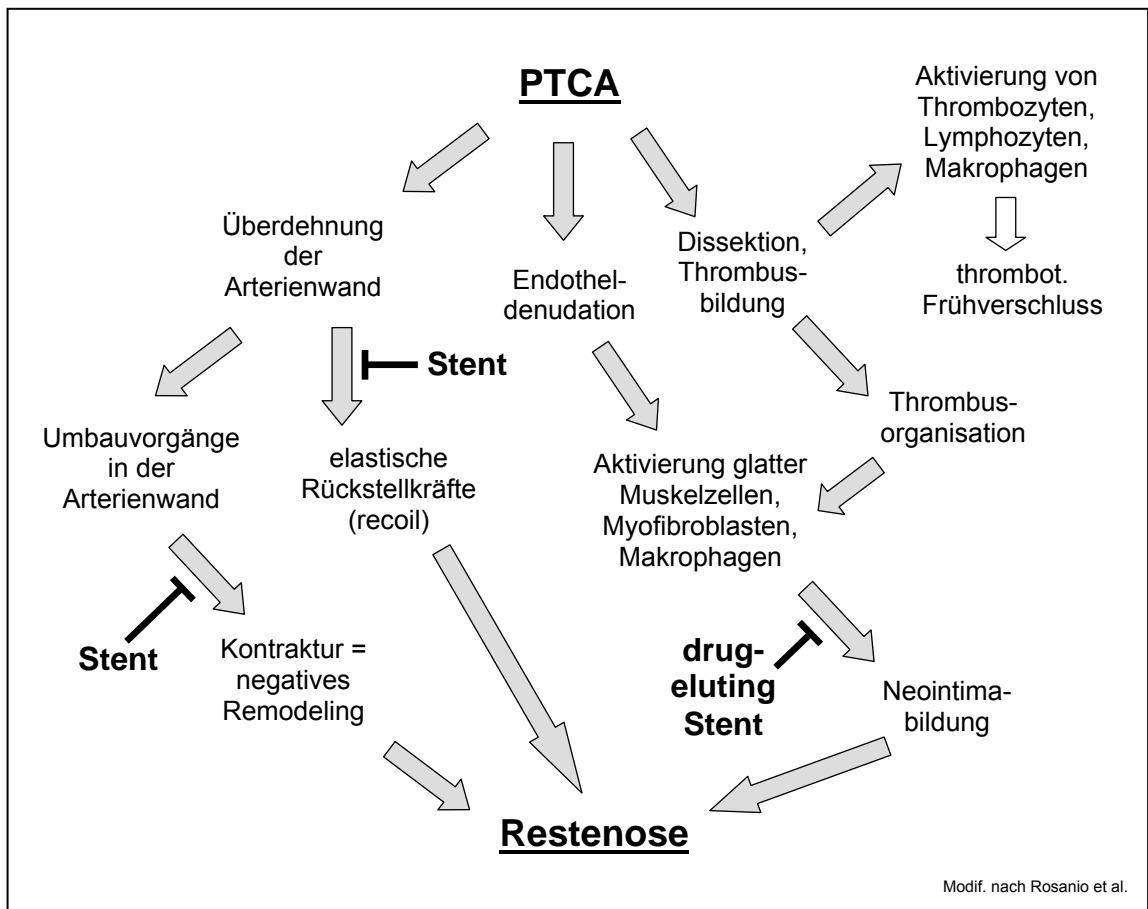


Abb. 1: Restenose-Mechanismen nach PTCA und Angriffspunkte für Stents

al. 1989; Gravanis & Roubin 1989). Tierexperimentelle und klinische IVUS-Studien (IVUS = intravaskulärer Ultraschall) zeigten jedoch, dass die Restenose nach PTCA hauptsächlich durch negatives Remodeling verursacht wird (Post et al. 1994; Andersen et al. 1996; Mintz et al. 1996; Isner 1994; Kakuta et al. 1994; Lafont et al. 1995). Durch den Einsatz der Stents schien dieser Pathomechanismus der Restenose vernachlässigbar. Erste Ergebnisse mit sogenannten „Dritte- und Vierte-Generation-Stents“, den bioabsorbierbaren bzw. degradierbaren Stents zeigen hingegen, dass das arterielle Remodeling nach Implantation dieser neuesten Stents die Ergebnisse bezüglich der Restenose bedeutsam beeinflusst.

1.2 Arteriellles Remodeling

Über viele Jahre wurde angenommen, die Entstehung von arteriosklerotischen de-novo-Läsionen sei einzig und allein auf das Plaqueswachstum zurückzuführen. Heute weiß man, dass dieser Vorgang komplexer ist und vom Gleichgewicht zwischen Plaqueswachstum und der Fähigkeit der Arterienwand sich auszudehnen bzw. sich zusammenzuziehen, bestimmt wird. Durch Vergrößerung des Gefäßdurchmessers bzw. der Lamina elastica externa-Fläche (LEEF) kann sich die Arterienwand an einen wachsenden Plaque anpassen, so dass es weder funktionell noch angiographisch zur Ausbildung einer signifikanten Stenose kommt. Dieses Phänomen kann auch bei dauerhaft erhöhtem Blutfluss beobachtet werden, bei dem sich die Arterienwand den veränderten Strömungsverhältnissen anpassen kann (Gibbons & Dzau 1994; Langille 1993).

Ausmaß und Richtung des Gefäßwandremodelings (also der Veränderung der Gefäßwandarchitektur) können variieren: sie reichen von der beschriebenen kompensatorischen Vergrößerung des Gefäßquerschnitts („compensatory enlargement“ oder „positives Remodeling“) über die Reduktion des Gefäßdurchmessers („negatives Remodeling“) (Pasterkamp et al. 1997) bis hin zum kompletten Ausbleiben einer Anpassungsreaktion („failure of enlargement“). Welche Faktoren die Art des Remodeling bestimmen ist ungeklärt. Die Tatsache, dass innerhalb einer einzigen Arterie alle Ausprägungen von positivem bis hin zu negativem Remodeling vorkommen, legt jedoch nahe, dass lokale Faktoren für das Remodeling wesentlich

bedeutsamer sind als allgemeine Faktoren wie Geschlecht und Alter oder koronare Risikofaktoren wie das Rauchen. Basierend auf post mortem Autopsieuntersuchungen, stellten (Glagov et al. 1987) die Hypothese auf, dass positives Remodeling dazu diene, drohenden Lumenverlust durch Plaquewachstum zu verhindern, dass dieser Kompensationsmechanismus aber nur greife bis eine Stenose 40 % betrage und gleichzeitig nicht mehr als 30 – 40 % der möglichen Lumenfläche durch den Plaque stenosierte seien.

Ob sich ein Gefäß der Plaquelast anpasst oder nicht, hängt von mehreren Faktoren ab. Ein Faktor könnte die Lokalisation des Plaques im Gefäß sein, da beispielsweise die Fähigkeit einer Koronararterie zu positivem Remodeling von proximal nach distal abnimmt (Burke et al. 2002). Ein weiterer Faktor könnte sein, wie der Plaque im Gefäß angeordnet ist - konzentrisch oder exzentrisch. Arteriosklerotische Plaques sind häufiger exzentrisch als konzentrisch in der Gefäßwand lokalisiert (Glagov & Zarins 1983). Exzentrische Plaques neigen eher zu „compensatory enlargement“ als konzentrische (Birgelen von et al. 1998). Bei exzentrischen Plaques ist der gesunde Teil der Arterienwand zu endothelabhängiger Vasodilatation in der Lage. Dies führt wiederum auf Dauer zu strukturellen Veränderungen in der Tunica media der Arterienwand. Konzentrische Läsionen ohne gesunde Wandabschnitte sind dazu nicht in der Lage und durchlaufen stattdessen eine Verkleinerung des Gefäßquerschnitts (Varnava & Davies 2001; Birgelen von et al. 1998). Darüberhinaus scheint die Zusammensetzung des Plaques für das Remodeling von Bedeutung zu sein: Plaques mit Einblutungen oder inflammatorischen Zellherden, mit großen Lipidkernen oder Makrophageninfiltration führen eher zu positivem Remodeling als Plaques, die überwiegend bindegewebig zusammengesetzt sind (Burke et al. 2002). Ein weiterer Faktor scheint die Geschwindigkeit des Plaquewachstums zu sein (Varnava 1998): nach einer subklinisch verlaufenen Koronarthrombose wächst der Plaque vermutlich so schnell, dass die Arterienwand nicht ausreichend Zeit zur Reorganisation hat (bis zu 70 % der hochgradigen Stenosen kommen an der Stelle einer abgeheilten Plaqueruptur und Thrombose vor) (Davies 1998).

Für die Entstehung einer hochgradigen Stenose bedarf es eines komplexen Zusammenspiels aus Plaquewachstum, -größe, -lokalisierung, und -zusammensetzung und der ab einem kritischen Stenosegrad limitierten

Fähigkeit der Arterie zu positivem Remodeling (Davies 1998).

Die Pathophysiologie der Stenoseentstehung nach einer Katheterintervention (Restenose) unterscheidet sich in einigen Teilprozessen von der langsam entstehenden Arteriosklerose, das arterielle Remodeling ist jedoch auch hier maßgeblich am Langzeitergebnis beteiligt (Mintz et al. 1996; Casscells et al. 1994). Im Unterschied zur Arteriosklerose wird nach Katheterintervention überwiegend negatives Remodeling beobachtet (Post et al. 1994; Andersen et al. 1996; Mintz et al. 1996; Isner 1994; Kakuta et al. 1994; Lafont et al. 1995). Es handelt sich wahrscheinlich auch hier um eine nicht ausreichende Anpassungsreaktion der Arterienwand auf die durch den Ballon verursachte Verletzung (Endothelabrasion, Ruptur der Lamina elastica interna (LEI), bis zur Ruptur der LEE). Diese Verletzungen induzieren eine physiologische Gewebeantwort als Wundheilungsreaktion mit intramuraler Thrombusbildung, -organisation und konsekutiver Neointimaformation (Kakuta et al. 1994). Die an der geschädigten Stelle eingeströmten Plasma-Lipoproteine werden im Gewebe zu ihren Oxidationsprodukten umgewandelt, und oxidierte Lipoproteine bzw. die beinhalteten Lipide können die endothelabhängige Relaxation vermindern (Lafont et al. 1995). Darüber hinaus bewirkt die nach Ballonverletzung der Gefäßwand induzierte Wundheilungsreaktion strukturelle Veränderungen im Sinne einer Fibrosierungsreaktion, die durch zunehmende Steifigkeit der Gefäßwand ein positives Remodeling inhibiert. Die Ballondilatation provoziert in der Adventitia eine 3 bis 7 Tage andauernde Proliferationsantwort von hauptsächlich Fibroblasten und Myofibroblasten, die verstärkt Kollagen, Elastin und Glucosaminoglykane produzieren (Scott et al. 1995; Doornekamp et al. 1995; Sibinga et al. 1997; Karim et al. 1995). Das vermehrte Kollagen führt zur Kontraktur (negatives Remodeling) der Arterie nach Gefäßwandverletzung (siehe hierzu nachfolgende Abbildung 2).

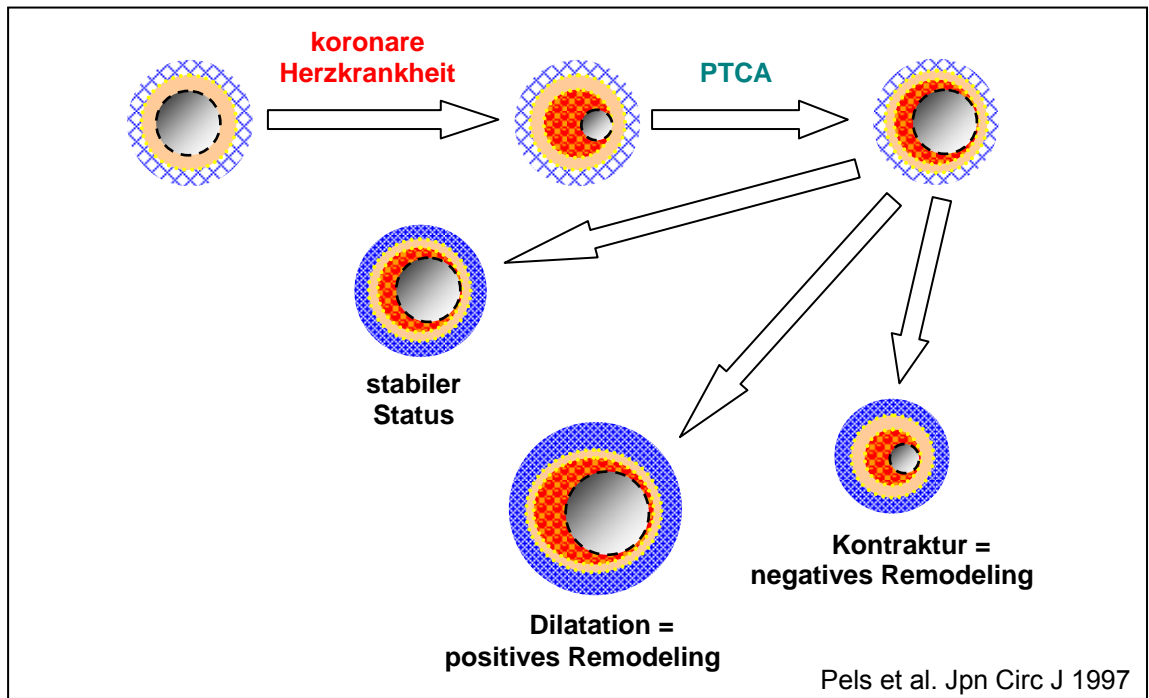


Abb. 2: Remodeling als Reaktion der Gefäßwand auf eine Ballondilatation

1.3 Neointimaformation

Die Neointimabildung stellt eine der beiden pathophysiologischen Säulen der koronaren Restenose nach Katheterintervention dar. Nach alleiniger Ballondilatation ist sie für 1/3 des Lumenverlustes verantwortlich, während das arterielle negative Remodeling die übrigen 2/3 verursacht (Post et al. 1994; Kakuta et al. 1994; Mintz et al. 1996 und 2002). Nach koronarer Stentimplantation ist die sogenannte in-Stent-Restenose jedoch ausschliesslich auf die Neointimaformation zurückzuführen. Die zellulären und molekularen Triggermechanismen, die zu dieser Neointimaformation führen sind komplex und sowohl die Pathogenese der koronaren Arteriosklerose wie auch der koronaren Restenose findet ihren Ursprung in der von dem Pathologen Russel Ross formulierten "response-to-injury" Hypothese (Ross and Glomset 1973; Ross 1990). In dieser Hypothese geht Ross davon aus, daß die Gefäßwandläsion die spezielle Form einer protektiven, entzündlich-fibroproliferativen Antwort auf verschiedene Arten der Arterienwandschädigung ist. In Abhängigkeit von der Art und Dauer der Schädigung wird aus dem protektiven Mechanismus ein Krankheitsprozeß. Die zahlreichen verschiedenen Formen der Schädigung des Endothels und der arteriellen Wandzellen beginnen mit einer entzündlichen Antwort an spezifischen Stellen des arteriellen Systems. An dieser entzündlichen Antwort sind Monozyten und T-Lymphozyten, die sich an das Endothel anheften und in die Arterienwand eindringen, beteiligt. An diesen Stellen differenzieren sich viele der Monozyten zu Makrophagen. Während ihrer Aktivierung exprimieren die Makrophagen eine Reihe unterschiedlicher Gene, einschließlich der für die Synthese der Zytokine und der Wachstumsregulationsmoleküle verantwortlichen Gene. Makrophagen und die sie begleitenden T-Lymphozyten unterliegen einer Replikation innerhalb der Arterienwand. Konsekutiv kommt es durch diese aktivierten Leukozyten zu einer Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die zu einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und (Myo)fibroblasten innerhalb der arteriellen Intima führen können. Diese Ereignisse kumulieren in den Gefäßläsionen, die unterschiedliche Stadien dieser speziellen inflammatorisch-fibroproliferativen Antwort darstellen. Der Gewinnung dieser Erkenntnisse liegen Arbeiten an koronaren Gefäßplaques in Tiermodellen, wie auch Arbeiten an menschlichen Koronarplaques, zugrunde. Eine erste Erklärung für die

Neointimabildung liefert das im Kleintierversuch der Ratte entwickelte "Drei-Wellen-Modell". In der ersten Welle kommt es zu einer Replikation glatter Muskelzellen (SMC) innerhalb der Media. Die zweite Welle beinhaltet die Migration dieser SMC in die Intima. In der dritten Welle proliferieren die SMC innerhalb der Intima. Voraussetzung für diese Prozesse ist die, über Wachstumsfaktoren und Interleukine (platelet derived growth factor A und B (PDGF), basic fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor β (TGF β), Angiotensin II (A II), insulin-like growth factor (IGF), Interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF alpha)) vermittelte Zellinteraktion von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Myofibroblasten, T-Lymphozyten und Makrophagen.

1.4 Pathophysiologische Rolle der Adventitia

In den Ursprüngen der Restenoseforschung ging man davon aus, dass die Neointimabildung der entscheidende Pathomechanismus bei der Entwicklung einer Restenose sei und dass die wichtigsten damit verbundenen Prozesse in den Gefäßwandschichten der Intima und Media stattfinden würden. Bei tierexperimentellen Untersuchungen und bei post mortem-Untersuchungen an humanen Koronararterien wurde daher sogar meist die Gefäßwandaussenschicht der Adventitia wegpräpariert. Wie zuvor ausführlich unter 1.2 beschrieben, zeigen tierexperimentelle und humane Studien die Bedeutung des arteriellen Remodeling für die Restenoseentstehung auf. Neue experimentelle wie auch klinische Studien dokumentieren die besondere Bedeutung der Adventitia in der „response to injury“ nach koronarer Katheterintervention. So wurde im Schweinmodell der Ballonangioplastie von Koronararterien gezeigt, dass die Adventitia auf zweierlei Wegen zur Lumenstenosierung beiträgt. Zum einen als Ursprungskompartiment für Zellen die proliferieren und in Richtung Lumen migrieren und somit zur Bildung einer Neointima beitragen. Zum anderen durch Veränderung der Zellorientierung und strukturelle Veränderungen der Matrix in der Adventitia (adventitielle Fibroblasten synthetisieren unmittelbar nach Ballondilatation Prokollagen Typ I), die zu einer mechanischen Kontraktur der Gefäßwand führen (Scott et al 1996, Shi et al 1996A,1996B). Diese Arbeiten zeigten erstmalig, dass sowohl

molekulare wie auch zellphänotypische Veränderungen in der Adventitia für den Restenoseprozeß von entscheidender Bedeutung sind. Darüber hinaus stellt die Adventitia den Ursprungsort von Vasa vasorum gesunder Koronararterien dar. Dieser Tatsache kommt eine besondere Bedeutung bei der lokalen Beteiligung der Koronararterie im Rahmen systemischer Veränderungen (z.B. inflammatorischer Reaktionen) aber auch bei der lokalen Therapie der Restenose zu.

1.5 Angiogenese von Vasa vasorum und Inflammation

Arterielle Vasa vasorum (Vv) sind Mikrogefäße, die der Ernährung der Arterienwand dienen. Vasa vasorum erster Ordnung entspringen direkt aus einer Arterie und verlaufen in deren Längsrichtung; aus ihnen wiederum oder aus kleineren Seitenästen der Arterie entspringen die Vasa vasorum zweiter Ordnung und verlaufen zirkulär zu ihrem Ursprungsgefäß. Da sie nicht über einen Plexus mit anderen Gefäßen verbunden sind, können sie als funktionelle Endarterien bezeichnet werden (Gossl et al. 2003). Gesunde Koronararterien besitzen ein kleines Netz von Vasa vasorum in der Adventitia zur Versorgung der äußeren Schichten der Arterienwand mit Sauerstoff und Nährstoffen, ihr Verschluss oder ihre Entfernung führt zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen (Barker et al. 1993). Andererseits kann in arteriosklerotisch veränderten Koronararterien ein dichtes Vv-Geflecht beobachtet werden (Barger et al. 1984). Ob diese Neovaskularisation der Plaquebildung vorausgeht oder ihr folgt, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, es ist aber wahrscheinlich, dass durch die unter dem Plaque herrschenden hypoxischen Verhältnisse, welche Makrophagen zur Produktion angiogener Faktoren veranlassen (Knighton et al. 1983), eine Neovaskularisation von Vv induziert wird. Diese Neovaskularisation von Vv tritt auch als Folge einer Gefäßwandverletzung auf. Kwon et al. beobachteten 28 Tage nach PTCA von Schweinekoronarien ein dichtes Gefäßnetz von Vasa vasorum zweiter Ordnung in der Adventitia, das in dieser Form beim unverletzten Gefäß nicht auftrat (Kwon et al. 1998). Welche Wachstumsfaktoren bei der Angiogenese der Vv involviert sind ist unbekannt, es ist jedoch davon auszugehen, dass die im Zusammenhang mit physiologischen Angiogeneseprozessen (Embryogenese,

Hautwundheilung oder Ovulation) und pathologischen Angiogeneseprozessen (Tumor- und Metastasenbildung, rheumatoide Arthritis, Retinopathie oder Psoriasis) bekannten angiogenen Wachstumsfaktoren auch für die Vv-Angiogenese bedeutsam sind. Hierzu gehören Angiogenin, transforming growth factor- α (TGF α), transforming growth factor- β (TGF β) und tumor necrosis factor (TNF) (Houck et al. 1991), allerdings kann keiner dieser Wachstumsfaktoren direkt die Endothelzellproliferation induzieren. Basic und acidic fibroblast growth factor (bFGF bzw. aFGF) und platelet derived growth factor (PDGF) sind dazu *in vitro* in der Lage, doch ist ihre Wirkung nicht auf Endothelzellen beschränkt. Sie wirken hingegen auf eine Reihe von Zelltypen (Tischer et al. 1991) und sind von Ereignissen wie Zelltod oder -verletzung abhängig, da sie aufgrund des Mangels an einer hydrophoben Signalsequenz nicht von den Zellen sezerniert werden können (Houck et al. 1991).

Eine Schlüsselrolle kommt bei vielen Angiogeneseprozessen dem 1971 erstmals von Folkman et al. aus Tumorgewebe isolierten und 1983 von Senger et al als vascular permeability factor beschriebenen (Folkman et al. 1971, Senger et al. 1983) vascular endothelial growth factor (VEGF) zu. Keck und Mitarbeiter, sowie Leung und Mitarbeiter identifizierten 1989 VEGF als endothelspezifischen Angiogenesefaktor, der von den Endothelzellen direkt sezerniert werden kann (Keck et al. 1989; Leung et al. 1989). Neben der angiogenen Aktivität mit Steigerung der endothelialen Proliferation, Migration und Permeabilität hat VEGF auch vaskuloprotektive Eigenschaften: VEGF reduziert die Neointimabildung nach Stentimplantation in peripheren Arterien und weist einen indirekten antithrombotischen Effekt auf (Van Belle et al. 1997), der vermutlich dadurch zustande kommt, dass die Reendothelialisierung einer verletzten Gefäßwand durch VEGF beschleunigt und dadurch ihre Thrombogenität reduziert wird.

Zur VEGF-Familie gehören VEGF-A, -B, -C, -D und -E sowie der placenta derived growth factor (PlGF). Bislang sind von VEGF-A 5 Isoforme identifiziert worden, die durch posttranskriptionelles alternatives Exon-Spleißen entstehen und nach der Länge der resultierenden Aminosäureketten benannt werden. Alle Isoforme besitzen ein Signalpeptid, so dass die direkte Sezernierung von intakten Zellen möglich ist. VEGF wird von einer ganzen Reihe von Zellen

produziert, unter ihnen Endothelzellen, Myofibroblasten, neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Aus *in vitro*-Versuchen mit Monozyten weiß man auch, dass die Regulation des VEGF von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B (NF κ B) abhängt (Kiriakidis et al. 2003). Dies ist auch ein typischer Signalweg für Interleukine (IL-1/-6/-8), Matrixmetalloproteinasen (MMP-2/-9), und Adhäsionsmoleküle wie vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) und intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). NF κ B selbst wird wiederum durch ein Vielzahl von Faktoren aktiviert, unter anderem durch IL-1, tumor necrosis factor α (TNF α), Lektine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), physikalische Noxen (z.B. γ -Strahlung), vom Komplementsystem, durch Hypoxie und oxidiertes Low-density-Lipoprotein (ox-LDL) (De Martin et al. 2000). Hier zeigt sich eine zentrale Verbindung der Angiogenese mit der Inflammation, der wie unter 1.2 und 1.3 ausgeführt eine besondere Bedeutung bei beiden Schlüsselprozessen der Restenosepathophysiologie zukommt.

1.6 Therapieansätze bei der koronaren Restenose

Seit Einführung der koronaren Ballonangioplastie 1977 durch Andreas Grüntzig (Gruentzig et al. 1979) sind eine Vielzahl verschiedener Substanzen zur systemischen Therapie der koronaren Restenose untersucht worden (Hermans et al. 1991). Mit keiner dieser Substanzen konnte eine wirksame Prävention der koronaren Restenose erreicht werden, was zum Teil auf die inakzeptablen Nebenwirkungen bei der zur Restenoseprävention erforderlichen systemischen Konzentration zurückzuführen war. Einzig für die Gruppe der Statine konnte zunächst tierexperimentell und später auch klinisch mit Hilfe des intravaskulären Ultraschalls eine Regression der Koronarsklerose gezeigt werden (Nissen et al. 2005), ein direkter Einfluss auf die Restenose kann hiervon aber auch nicht abgeleitet werden. Daher gilt für die Therapie der koronaren Restenose wie für die meisten Therapieformen, wann immer möglich und sinnvoll, sollten Medikamente oder sonstige Substanzen eher lokal als systemisch verabreicht werden, da so zum einen sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen am Zielort erreicht und zum anderen Nebenwirkungen von eventuell toxischen Substanzen reduziert werden können (Lehmann et al.

2000).

Nicht medikamentöse Verfahren oder kathetertechnische Interventionen ohne lokale Abgabe „antirestenotischer Substanzen“ (Laserangioplastie, koronare Atherektomie, Rotablation) zur Therapie der koronaren Restenose haben ebenfalls keine befriedigenden, der alleinigen Ballondilatation überlegenen Ergebnisse erzielen können. Mit Einführung der Koronarstents Anfang der 90iger Jahre wurde die Restenoserate zwar bei der Behandlung von de novo-Stenosen gesenkt, doch zeigte sich das Problem der in-Stent-Restenose als noch schwieriger zu lösen. Einzig das Verfahren der intrakoronaren Strahlentherapie (Brachytherapie) wurde erfolgreich zur Behandlung der koronaren in-Stent-Restenose eingesetzt (Terstein et al 2000) und wird bis heute in den internationalen Leitlinien als effektive Therapie zur Behandlung der in-Stent-Restenose empfohlen. Letztendlich handelt es sich aber auch bei diesem Verfahren um eine lokale Applikation von antirestenotisch/antiproliferativ wirksamen beta- oder gamma-Strahlen. Die intrakoronare Brachytherapie wird jedoch nach Einführung der Medikamente freisetzenden Stents (DES) wegen des mit diesem Verfahren verbundenen enormen Aufwandes (Beteiligung von Strahlentherapeuten etc.) kaum mehr eingesetzt. Aktuell gelten die DES als das Verfahren der Wahl bei der Behandlung von de-novo-Stenosen, wie auch bei der Behandlung von Restenosen oder in-Stent-Restenosen. Wie bei der Brachytherapie zeigen sich aber auch bei den DES Komplikationen wie das späte Auftreten von Thrombosen (Costa et al. 1999, Pfisterer et al 2006) und das Fehlen von Langzeitergebnissen zur Dokumentation einer sicheren und effektiven Therapie als problematisch.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

1. Das Verständnis über die Pathophysiologie der koronaren Restenose begründete sich anfänglich auf Ergebnisse des Ballondenudationsmodells in peripheren Arterien der Ratte, wobei die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Gefäßmedia und die daraus resultierende Neointimaformation die Grundlage der daraus abgeleiteten “response to injury” Hypothese bildeten. Darauf folgende klinische Interventionsstudien

unter Einsatz verschiedener Pharmaka und Katheter zeigten jedoch, dass die auf dem Rattenmodell basierenden Daten nicht auf die klinische Situation übertragbar und komplexere Modelle mit Untersuchungen von Koronararterien erforderlich waren. Um das augenscheinlich vielschichtige Problem der Restenoseentstehung nach koronarer Intervention experimentell möglichst nah an der klinischen Situation beim Patienten untersuchen zu können, wurde von uns ein neues Modell der koronaren Ballonangioplastie am Hausschwein etabliert. Hiermit sollte zunächst die Frage nach weiteren Pathomechanismen - neben der Neointimabildung - und deren zeitliche Abläufe beantwortet werden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die „response to injury“ nach Anwendung antiproliferativer Katheterverfahren wie der intrakoronaren Brachytherapie Unterschiede im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation aufweist:

- (a) Durchführung eines neuen „double injury“ Ballonangioplastiemodells an Koronararterien von Hausschweinen zur Untersuchung der Bedeutung des arteriellen Remodelings für die Restenoseentstehung.
 - (b) Untersuchung der histomorphometrischen Veränderungen, insbesondere der Adventitiafläche, und deren Auswirkungen auf das Remodeling von vorgeschädigten (double injury) gegenüber unverletzten (single injury) Koronararterien.
 - (c) Untersuchung der Histomorphometrie von Koronararterien nach Ballondilatation und antiproliferativer intrakoronarer Bestrahlung unter besonderer Berücksichtigung der möglichen Spätauswirkungen im Langzeitverlauf.
 - (d) Untersuchung von Proliferation und Inflammation auf zellulärer Ebene nach Ballondilatation und antiproliferativer intrakoronarer Bestrahlung, sowie deren molekulare/transkriptionelle Regulation. Analyse der Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix im Zusammenhang mit arteriellem Remodeling.
2. In Analogie zur Wundheilungsreaktion der Haut stellte sich die Frage, ob in Koronararterien nach Verletzung durch eine Ballonkatheterdilatation die Induktion einer Mikrogefäßangiogenese zu beobachten ist, ob die

Koronargefäße wie bei der Hautwundheilung eine Vernarbungsreaktion durchlaufen und welche Bedeutung die Mikrogefäße hierbei besitzen.

- (a) Es sollte daher im Koronarangioplastiemodell untersucht werden, ob und in welchem Kompartiment der Koronararterienwand eine Angiogenese von Mikrogefäßen (Vasa vasorum) stattfindet, in welchem zeitlichen Ablauf diese Angiogenese stattfindet und ob es im Verlauf zu einer Regression der Vasa vasorum kommt.
 - (b) Die Rolle von Mikrogefäßen der Koronargefäße bei der Entwicklung eines atherosklerotischen Plaques wurde in Tiermodellen und in post mortem-Analysen intensiv erforscht, der Einfluss dieser Vasa vasorum auf die Entstehung einer Stenose oder Restenose nach koronarer Intervention war jedoch unbekannt. Es sollte mittels digitaler Bildanalyse histologischer Koronargefäßquerschnitte von einfach und zweifach dilatierten Koronararterien untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Neointimaformation, dem arteriellen Remodeling und einer Vasa vasorum Angiogenese bzw. Regression besteht.
3. Das Schweinemodell gilt zur Untersuchung der Pathogenese der koronaren Restenose aufgrund einer dem menschlichen Herzen ähnlichen Anatomie und Koronarmorphologie als das klinisch relevanteste Tiermodell. Eine Limitation dieses präklinischen Modells ist das fehlende Vorliegen von erkrankten Gefäßen, wie sie bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und unterschiedlichen koronaren Risikofaktoren zu finden sind. Ziel der Versuche war es, beim Hauschwein durch dietätische und medikamentöse Maßnahmen ein komplexes Atherosklerosemodell für präklinische kardiologisch-interventionelle Experimente zu etablieren.
 4. Die Auswirkungen angiogener Wachstumsfaktoren auf die Vasa vasorum-Angiogenese im Zusammenhang mit der koronaren Ballondilatation und deren möglicher therapeutischer bzw. schädigender Effekt bei der Behandlung der koronaren Restenose sind bislang nicht untersucht worden. Die Koinzidenz von zunehmender Vaskularisation der Adventitia mit einer zeitlich parallel verlaufenden Koronardilatation suggeriert, dass eine lokale angiogenetische Therapie in diesem Zusammenhang das arterielle Remodeling nach koronarer Ballondilatation günstig beeinflussen kann. Auf

der anderen Seite ist eine Zunahme der Neointima bei zunehmender Neointimavaskularisation denkbar.

Es sollte daher mittels lokalem (peri)adventitiellem Gentransfer des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die biologische Reaktion der Gefäßwand nach koronarer Ballondilatation im Schweinmodell moduliert werden und:

- (a) der Einfluss des lokalen VEGF-Gentransfers auf die Vasa vasorum (Mikrogefäß)-Angiogenese in der balloninduzierten Neointima und die Neointimaläsionsentwicklung untersucht werden.
 - (b) die Bedeutung des lokalen VEGF-Gentransfers für die adventitielle Mikrogefäß-Angiogenese und das arterielle Remodeling, sowie die (patho)physiologischen Wirkmechanismen der lokalen VEGF-Gentherapie analysiert werden.
5. Der positive Effekt einer oralen antithrombotischen Therapie mit Thienopyridinen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und nach Koronarintervention auf die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse ist bekannt. Ungeklärt ist, welche Wirkmechanismen diesem Effekt zu Grunde liegen, und ob es nicht wie bei der Statintherapie zu sogenannten pleiotropen Effekten kommt. Darüber hinaus ist unklar, ob sich eine Langzeittherapie günstig auf die nach Koronarintervention auftretenden pathophysiologischen Prozesse auswirkt.
- (a) Im Schweinmodell sollte daher untersucht werden, ob eine Thienopyridintherapie neben der antithrombotischen Wirkung auch lokale Auswirkungen auf die inflammatorische und proliferative Reaktion der Gefäßwand nach koronarer Ballonangioplastie sowie auch nach zusätzlicher antiproliferativer intrakoronarer Brachytherapie hat.
 - (b) Es sollte untersucht werden, ob eine Langzeittherapie gegenüber einer kurzfristigen Therapie mit Thienopyridinen den Restenoseprozess nach koronarer Ballondilatation und auch nach zusätzlicher antiproliferativer intrakoronarer Brachytherapie beeinflusst. Hierbei sollten sowohl histomorphometrische als auch zelluläre Veränderungen und deren molekulare Regulationsmechanismen analysiert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Gefäßwandreaktion nach koronarer Intervention

2.1.1. Kinetik histomorphometrischer Veränderungen

Histomorphometrische Veränderungen nach koronarer Ballonangioplastie

Tierexperimentelle sowie klinische Studien konnten mit Hilfe des intravaskulären Ultraschalls zeigen, dass Neointimaformation und das arterielle Gefäßwandremodeling die zentralen Ursachen der Gefäßlumenverengung im Restenoseprozess nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) sind (Post et al. 1994, Andersen et al. 1996, Mintz et al. 1996). Während die Neointimaformation nach Ballondilatation in Kleintiermodellen intensiv untersucht wurde, waren die für die Kontraktur oder Dilatation nach koronarer Angioplastie verantwortlichen (patho)physiologischen Prozesse (auf histomorphologischer und molekularer Ebene) nur unvollständig verstanden. Es ist wahrscheinlich, dass in der Wundheilungsphase nach katheterinduzierter Gefäßverletzung Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix die Gefäßwandarchitektur entscheidend mitbestimmen. Welche morphometrischen Faktoren hierbei von Bedeutung sind und in welchem zeitlichen Ablauf diese stattfinden, war unbekannt. Um diesen Fragen nachzugehen etablierten wir als erste Arbeitsgruppe das Schweineangioplastiemodel der „double injury“ am Ottawa Heart Institute. In diesem Modell wurde eine Kontrollarterie, eine einfach dilatierte und eine doppelt dilatierte Koronararterie eines jeden Tieres untersucht. Hierzu wurde 2 Wochen nach initialer Ballonangioplastie von zwei Koronararterien eine der beiden dilatierten Gefäße an gleicher Stelle erneut dilatiert, dabei wurden die gleiche Ausrüstung und Medikamente (z.B. Ballonkatheter, Heparin etc.), die im klinischen Herzkatheterlabor Einsatz finden, verwendet. Ausgehend von der Hypothese, dass das arterielle Remodeling nicht in allen Koronararterien nach Ballonverletzung auftritt und dass die balloninduzierte Neoadventitiabildung den Remodelingprozess beeinflusst, wurden die Koronararterien zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 7, 14 und 28 Tage) nach Gefäßverletzung untersucht, um die morphometrischen Veränderungen der Arterienwand im zeitlichen Verlauf analysieren zu können.

Bereits am dritten Tag nach Intervention zeigte sich eine Zunahme der Adventitiafläche (Neoadventitia), dieser folgte am Tag 7 und 14 die Bildung einer Neointima (vor allem im Bereich der Mediaruptur) in den einfach und doppelt dilatierten Gefäßen. Im Vergleich zu den einfach dilatierten Koronargefäßen war die Neoadventitiafläche am Tag 14 in den doppelt dilatierten Gefäßen deutlich größer, was durch eine ausgeprägte Fibrosierung bedingt war.

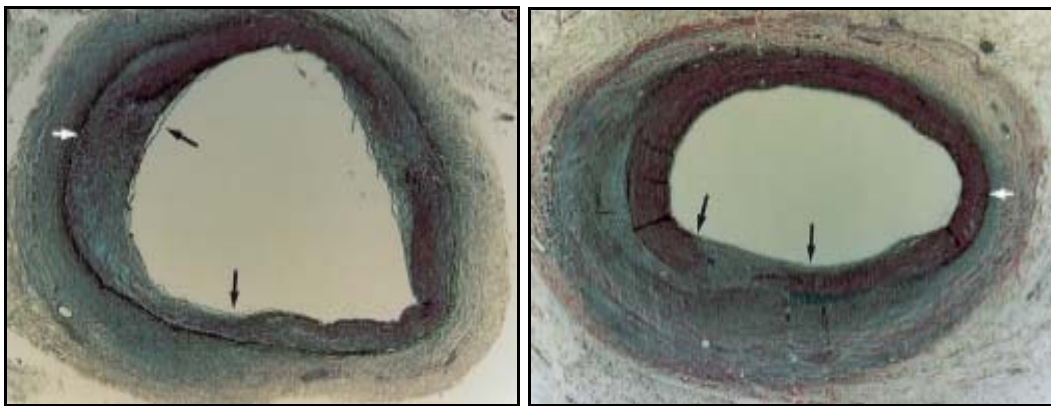


Abb. 3 Koronargefäßquerschnitte 14 Tage nach einfacher (linke Bildhälfte) und doppelter (rechte Bildhälfte) Ballondilatation. Weißer Pfeil = Grenze zwischen Media und Adventitia (Lamina Elastica Externa); schwarzer Pfeil = Bereich der Mediaruptur (aus Labinaz, Pels et al. Cardiovasc Res 1999)

Die beschriebenen histologischen Veränderungen gehen in den einfach dilatierten Gefäßen mit einem deutlichen Lumenverlust einher, der zu 2/3 auf eine Reduktion der Lamina Elastica Externa-Fläche (negatives Remodeling) zurückzuführen ist. Bei den doppelt dilatierten Gefäßen hingegen findet kein Remodelingprozess statt, in diesen Gefäßen ist der Lumenverlust einzig auf die Neointimabildung zurückzuführen. Interessanterweise ist die erste Veränderung nach einfacher oder doppelter Ballondilatation eine Zunahme der Neoadventitiafläche und diese geht dem negativen Remodeling und auch der Neointimabildung voraus. Entsprechend unserer Ausgangshypothese konnten wir zeigen, dass tatsächlich nicht jedes Gefäß stereotyp nach einer Ballondilatation ein negatives Remodeling durchmacht. Vorgeschädigte Gefäße mit ausgeprägter Fibrosierung, wie bei den zweifach dilatierten Gefäßen zu beobachten, verhalten sich wie ein biologischer Stent, der eine weitere

Kontraktur der Arterienwand verhindert. Unsere Arbeit konnte zeigen, dass das negative Remodeling (Reduktion der Lamina Elastica Externa-Fläche) und der resultierende Lumenverlust der einfach dilatierten Gefäße zwischen Tag 3 und 14 nach Intervention stattfindet. Während dieses Zeitintervalls konnten wir eine Kollagenablagerung und Ansammlung alpha-Aktin-positiver Zellen in der Neoadventitia beobachten, sodass davon auszugehen ist, dass diese strukturellen Gefäßwandveränderungen eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese des arteriellen Remodelings spielen.

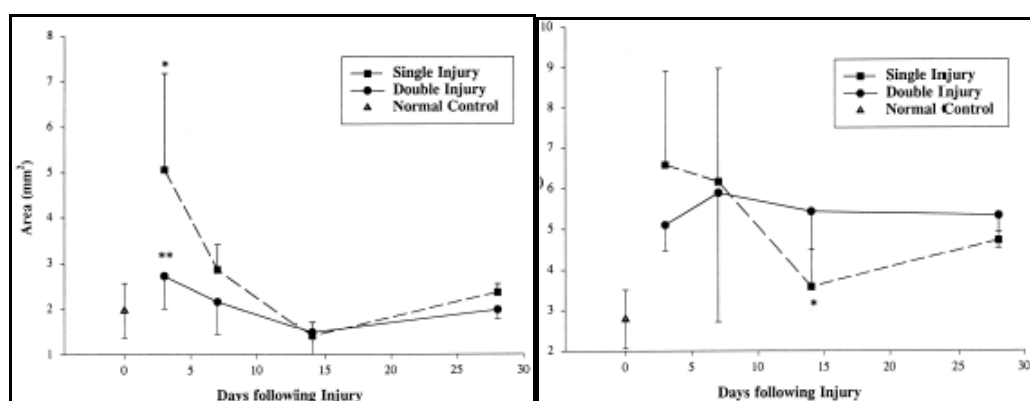


Abb. 4 Lumenfläche (linke Bildhälfte) und Lamina Elastica Externa-Fläche (rechte Bildhälfte) im zeitlichen Verlauf nach einfacher/doppelter Ballondilatation von Koronargefäßen (aus Labinaz, Pels et al. Cardiovasc Res 1999)

Das von uns beobachtete Zeitfenster der morphometrischen Gefäßwandveränderungen nach Katheterintervention stellt insofern eine wichtige Determinante für therapeutische Maßnahmen zur Restenose-therapie dar, als dass ein längerer Therapiezeitraum als nur wenige Tage nach Intervention erforderlich ist. In Vorversuchen konnten andere Arbeitsgruppen (Scott et al. 1996; Shi et al. 1996A,1996B) zeigen, dass viele der neoadventitiellen Zellen Myofibroblasten sind, die zwischen Gewebekompartimenten migrieren, Kollagen synthetisieren und eine Gewebekontraktur bewirken können, wie bei der Hautwundheilung beschrieben. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen und unterstreichen die Bedeutung der Adventitia für die Pathogenese von Neointimabildung und negativem arteriellen Remodeling.

Histomorphometrische Veränderungen nach koronarer Ballonangioplastie in Kombination mit intrakoronarer Brachytherapie

Die Einführung von koronaren Stents führte zu einer Verringerung der Restenoserate, brachte aber das Problem der in-Stent-Restenose mit sich. Bis Mitte der neunziger Jahre fand sich keine therapeutische Möglichkeit, die proliferative Reaktion der Neointimaformation nach Stentimplantation zu verhindern. So hielt die bereits seit vielen Jahren zur Behandlung von "proliferativen Erkrankungen" (z.B. bei Tumoren und Hautkeloiden) eingesetzte Strahlentherapie Einzug in die interventionelle Kardiologie. Systeme zur intrakoronaren Bestrahlung von Restenosen mit Quellen, die β - und γ -Strahlen emittieren, wurden eingesetzt. Klinische Studien zeigten, dass die der Ballondilatation von Nativgefäßen und von in-Stent-Restenosen folgende Brachytherapie die Neointimabildung reduzierte und die Restenoserate um ca. 70% senken konnte (Teirstein et al. 1997, Waksman et al. 2000A, 2000B). Trotz einer Studie mit gutem Langzeitergebnis 3 Jahre nach intrakoronarer Brachytherapie (Teirstein et al. 2000) mehren sich Hinweise auf Spät komplikationen im Langzeitverlauf. Sowohl die intrakoronare Brachytherapie als auch Medikamente-freisetzende Stents besitzen antirestenotische Effekte aufgrund ihrer zytostatischen Wirkmechanismen, die kardiovaskuläre Pathologie zu späten Zeitpunkten nach Anwendung dieser Therapieformen ist jedoch unzureichend verstanden. Unsere Arbeitsgruppe führte daher experimentelle Arbeiten zur Untersuchung der Langzeiteffekte und möglicher Spät komplikationen nach antiproliferativer Betabestrahlung im Anschluss an eine Ballonangioplastie von Koronararterien im Schweinmodell durch. Wir untersuchten 2 Tierversuchsgruppen zum Vergleich von Früh- und Späteffekten nach perkutaner koronarer Ballonangioplastie (PTCA) bzw. kombinierter PTCA und intravaskulärer Brachytherapie (PTCA+IVBT) 2 Wochen und 3 Monate im Anschluss an die Katheterintervention. Die Lumenfläche war 14 Tage nach Intervention in beiden Gruppen ähnlich, wobei es zu keinem Lumenverlust gegenüber den nicht behandelten Kontrollgefäßen kam (das heißt, der initial durch die Ballondilatation erzielte Lumengewinn hatte sich in beiden Behandlungsgruppen auf Kontrollniveau reduziert). 3 Monate nach

Intervention zeigte sich aber in der PTCA+IVBT-Gruppe ein gegenüber der PTCA-Gruppe signifikanter Lumenverlust (Deiner et al. 2007A). Dieser Lumenverlust war hauptsächlich auf eine Abnahme der Lamina Elastica Externa-Fläche (EELA) zurückzuführen. Während im frühen Verlauf die Neointimaausbildung (hier von uns als kombinierte Intima und Media definiert = I+M) tendenziell in der PTCA+IVBT-Gruppe geringer ausgeprägt war und somit gegenüber der PTCA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu komplett inhibiert war, zeigte sich im Langzeitverlauf ein spätes „Aufholphänomen“ mit einer zum 3-Monats-Zeitpunkt deutlichen Zunahme der Neointima (I+M) gegenüber der Kontrollgruppe und geringer ausgeprägt auch gegenüber der PTCA-Gruppe. Allerdings war keiner der Unterschiede bezüglich der Neointima statistisch signifikant. Bezieht man jedoch die Neointimafläche auf die jeweilige Gefäßgröße (hier wurde die EELA als Maßstab gewählt), so zeigte sich ein signifikanter Unterschied (64% in der PTCA+IVBT-Gruppe gegenüber 34% in der PTCA-Gruppe). Auffällig waren die Unterschiede in der Adventitiafläche, wo die antiproliferative Strahlentherapie bereits nach 14 Tagen zu einer gegenüber der PTCA-Gruppe deutlichen Zunahme führte, dieser Unterschied war nach 3 Monaten signifikant und geht zeitlich dem negativen Remodeling in der PTCA+IVBT-Gruppe voraus (Deiner et al. 2007A). Unsere Ergebnisse zeigen in Einklang mit anderen Arbeitsgruppen (Zalewski und Shi 1997, Wilcox et al. 1996, Deiner et al. 2007A), dass die Adventitia auch, oder vielleicht sogar besonders nach Anwendung sogenannter antiproliferativer Katheterverfahren für die Pathophysiologie der Restenose von entscheidender Bedeutung ist. Das ausgeprägte Adventitiawachstum zu einer frühen Phase nach intrakoronarer Bestrahlung könnte als Trigger für das später einsetzende negative Remodeling und die späte Neointimaformation fungieren und eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des späten Lumenverlustes nach lokaler antiproliferativer Strahlentherapie spielen. Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass es sowohl qualitative als auch zeitliche Unterschiede in der biologischen Antwort der Koronararterienwand in Abhängigkeit vom gewählten therapeutischen Verfahren gibt (antiproliferative Therapie wie IVBT oder DES versus mechanische Therapie wie Ballonangioplastie oder unbeschichteter Stent).

Originalarbeiten

- Labinaz, M., **Pels, K.**, Hoffert, C., Aggarwal, S., and O'Brien, E.R. The time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Cardiovasc.Res.* 41(1):255-266, 1999.
- Deiner, C., Loddenkemper, C., Rauch, U., Rosenthal, P., Pauschinger, M., Schwimmbeck, P.L., Schultheiss, H.P., **Pels, K.** Mechanisms of late lumen loss after antiproliferative percutaneous coronary intervention using beta irradiation in a porcine model of restenosis. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 8:94-98, 2007.

2.1.2. Angiogenese von Vasa Vasorum und arterielles Remodeling

Gesunde Koronararterien besitzen normalerweise keine Mikrogefäße mit Ausnahme eines kleinen Netzes von Vasa vasorum der Adventitia, die zumeist ihren Ursprung in periadventitiellen Arterien haben (Shimamoto 1968, Kumamoto et al. 1995). Nach der ersten Lebensdekade tritt eine Angiogenese dieser Vasa vasorum nur während der Atherogenese auf und bereits vor über einem Jahrhundert beschrieb Köster das vermehrte Vorhandensein von Vasa vasorum der Arterienwand arteriosklerotischer im Vergleich zu normalen Koronararterien (Koester 1876). Andere Arbeitsgruppen griffen diese Beobachtung wieder auf und zeigten in Langzeittierexperimenten einen Kausalzusammenhang zwischen der Zunahme von Plaquegefäßen und dem Wachstum arteriosklerotischer Plaques (Barger et al. 1984, Heistad und Armstrong 1986, Williams et al. 1988). Die angiogene Antwort auf eine akute Verletzung der Arterienwand könnte aber im Gegensatz zur Angiogenese des chronischen Prozesses der Arteriosklerose eine ganz andere Funktion besitzen. Welche Rolle die Angiogenese von Mikrogefäßen, die in so vielen Geweberemodelingprozessen während des Heilungsvorganges nach Verletzung bedeutsam ist, in der Gefäßwandreaktion nach Ballondilatation spielt und ob sie den Restenoseprozess beeinflusst, war ungeklärt. Unsere Arbeitsgruppe führte daher im von uns etablierten „double injury“-Angioplastiemodell eine Studie zur Untersuchung der Vasa vasorum-Angiogenese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ballondilatation (1 Stunde, 3, 7, 14 und 28 Tage) durch. Hier zeigte sich, dass die Mikrogefäßdichte in der Adventitia ein Maximum nach 3 Tagen erreichte und drei und sieben Tage nach Intervention im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgefäßen signifikant erhöht war. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten war bereits eine Regression dieser Mikrogefäße zu verzeichnen (Pels et al. 1999). Wir konnten mittels Endothelzellproliferationsanalyse auch zeigen, dass es sich hierbei um einen aktiven angiogenen Prozess handelt (maximale adventitielle Endothelzellproliferationsindices wurden mit 12% am Tag 3 nach Intervention dokumentiert). Ergänzend untersuchten wir quantitativ die mRNA-Expression des angiogenen Schlüssel molekuls VEGF.

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die VEGF₁₆₅-Expression zweier Koronargefäße 1 Stunde nach Ballondilatation und die Quantifizierung der VEGF₁₆₅-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

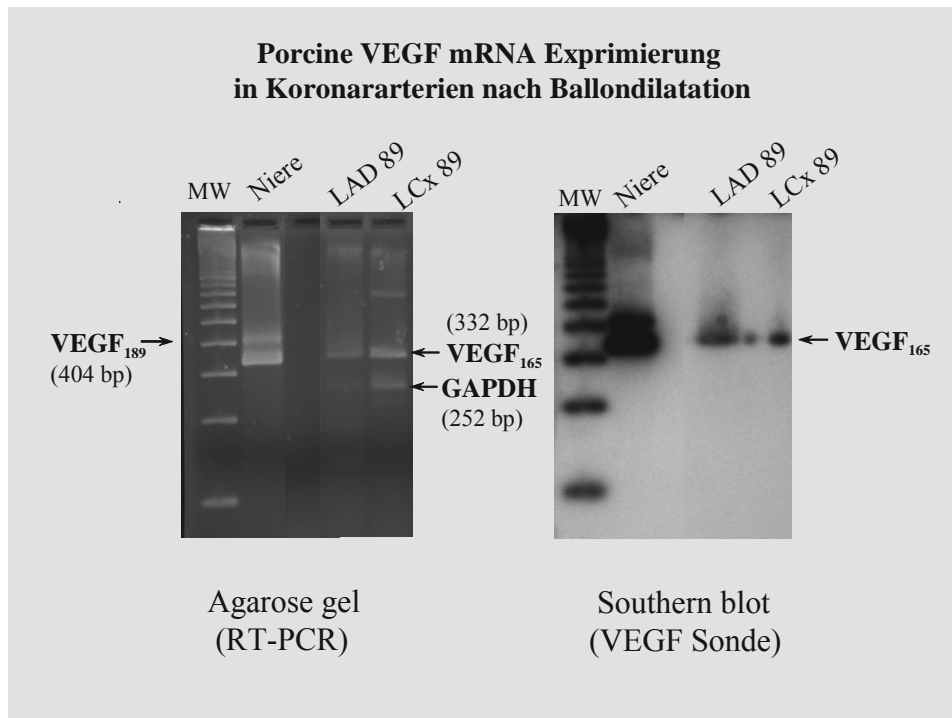


Abb. 5 Koronare VEGF mRNA-Expression nach koronarer Ballondilatation

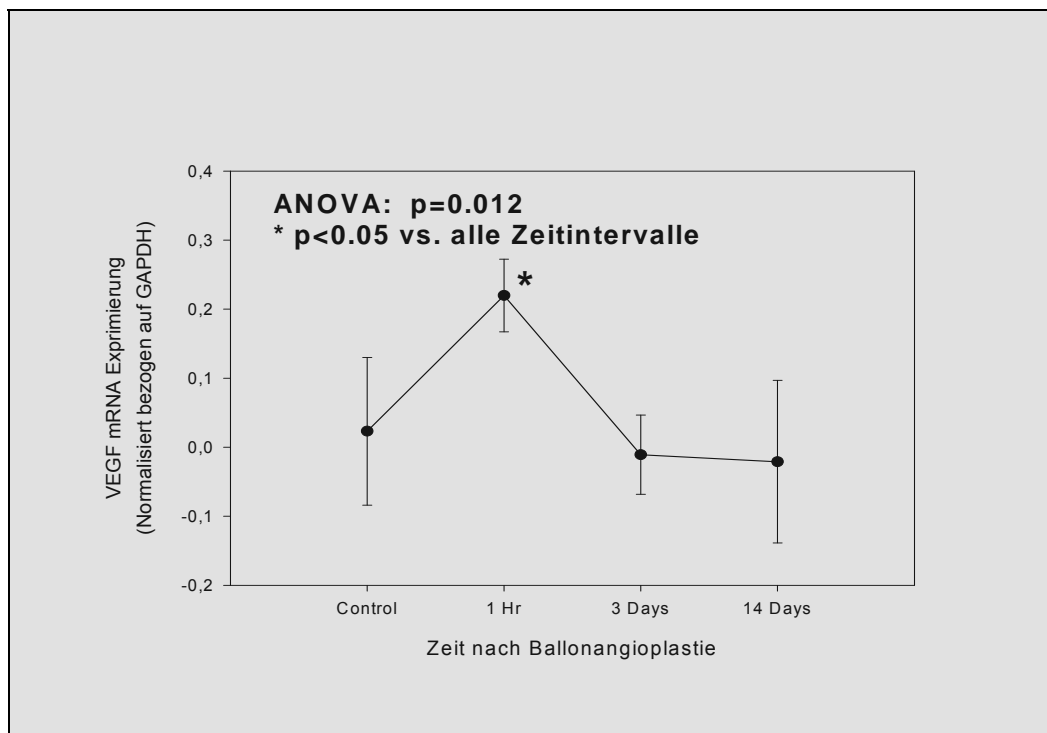


Abb. 6 Koronare VEGF mRNA-Expression (Quantifizierung)

Zeitgleich mit der ab Tag 7 beobachteten Regression der Mikrogefäße kam es zu einer Abnahme der Lamina Elastica Externa-Fläche (= negatives Remodeling) und der Lumenfläche (Pels et al 1999). Unsere Arbeit war die erste experimentelle Studie, die die adventitielle Mikrogefäßangiogenese nach koronarer Ballonangioplastie untersuchte und konnte zeigen, dass eine positive Korrelation nach Ballondilatation zwischen Lumenfläche und adventitieller Mikrogefäßdichte besteht. Auch wenn auf dem Boden dieser Daten kein kausaler Zusammenhang bewiesen werden kann, lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die Mikrogefäßregression eine funktionelle Komponente der Arterienwandkontraktur und des Remodelings nach Ballondilatation ist, und die Arterienwundheilung sich diesbezüglich wie eine Sonderform der klassischen Hautwundheilung verhält.

Originalarbeiten

- **Pels, K.**, Labinaz, M., Hoffert, C., and O'Brien, E.R. Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty: Correlation with arterial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(2): 229-238, 1999.

2.1.3 Zellproliferation und Inflammation

Wie unter 2.1.1 ausgeführt, stellt die Therapie der In-Stent-Restenose weiterhin ein relevantes klinisches Problem dar. Die intrakoronare Bestrahlung wurde Mitte der neunziger Jahre als neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung von in-Stent-Restenosen bei koronarer Herzkrankheit eingeführt, und ihre Effektivität die Restenoserate zu senken in klinischen Untersuchungen belegt (Teirstein et al. 1997, Waksman et al. 2000A, 2000B). 2002 wurden die ersten Ergebnisse der Behandlung primärer Gefäßläsionen mit Rapamycin freisetzenden Stents mit 0% Restenose präsentiert. In der Folge wurden verschiedene Medikamenten-beschichtete Stents (=DES) in den Markt eingeführt und zunehmend zur Behandlung der koronaren Restenose eingesetzt. Ein schwerwiegender Nachteil sowohl der intrakoronaren Strahlentherapie als auch der DES ist das Auftreten von thrombotischen Spätkomplikationen in der antiproliferativ behandelten Koronararterie, die in bis zu 8% der Fälle nach Brachytherapie und in bis zu 2,5% der Fälle nach DES-Implantation auftraten. Das späte Auftreten von akuten Koronarthrombosen, insbesondere nach Absetzen der antithrombotischen Therapie mit Thienopyridinen (Clopidogrel), begründet die erhöhte Mortalität nach Anwendung der anti-proliferativen Behandlungsverfahren und seit der Beobachtung dieser letalen Komplikationen ist die Skepsis bezüglich einer uneingeschränkten Anwendung dieser zur Restenosereduktion sehr effektiven Verfahren gewachsen (Virmani et al. 2004; Pfisterer et al. 2006; Stone et al. 2007). Die Pathophysiologie der späten Stentthrombose nach Anwendung antiproliferativer Verfahren erscheint komplex, eine verzögerte Wundheilungsreaktion der Koronararterienwand, eine erhöhte Gewebsthrombogenität und allergische/inflammatorische Reaktionen werden als mögliche Faktoren postuliert. Jede intrakoronare Ballondilatation/Stentaufdehnung oder Strahlenapplikation bedingt eine in Abhängigkeit vom verwendeten Inflationsdruck bzw. Strahlendosis mehr oder minder ausgeprägte Gefäßverletzung. Diese löst eine „response to injury“-Reaktion mit Regulations-/Transkriptionfaktoren-vermittelter Zellproliferation, Inflammation, Zellmigration und veränderter Komposition der extrazellulären Matrix mit konsekutiver Neointimabildung und arteriellem Remodeling aus (Farb et al. 1999). Die von uns durchgeführte Studie sollte zum einen die inflammatorische Reaktion und

zum anderen die proliferative Antwort der Gefäßwand sowie deren molekulare/transkriptionelle Regulation nach mechanischer koronarer Intervention (PTCA) und kombinierter PTCA + antiproliferativer Strahlentherapie untersuchen. Hierzu wurde bei 39 Schweinen in je einem Koronargefäß eine PTCA und in je einem Koronargefäß eine PTCA mit anschließender Brachytherapie durchgeführt. Die Koronargefäße dieser Tiere wurden 1, 14 und 28 Tage nach Intervention histomorphometrisch, immunhistologisch und molekularbiologisch analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass die Brachytherapie zwar initial (Tag 1 nach Intervention) die Zellproliferation hemmt, jedoch zu den späteren Zeitpunkten (Tag 14 und 28 nach Intervention) kein signifikanter Unterschied mehr zwischen PTCA und Brachytherapiegruppe bezüglich der Zellproliferationsinhibition besteht (Deiner et al. 2007B, siehe Seite 47). Somit demonstrieren unsere Ergebnisse als wichtige Beobachtung, dass die Brachytherapie nicht zu einer kompletten Inhibierung der Proliferation führt, sondern zu einer temporären Verzögerung der Proliferation. Es gibt experimentelle Hinweise, dass eine solche verzögerte Proliferationsreaktion möglicherweise durch Inflammation getriggert werden kann (Voisard et al. 2001, Ma und O'Brien 2004). In Bezug auf diese Hypothese stellten wir dann auch als einer der Hauptbefunde dieser experimentellen Arbeit fest, dass es in der Brachytherapiegruppe im Vergleich zur PTCA-Gruppe zu einer späten verstärkten inflammatorischen Reaktion mit gesteigerter T-Zell- und Makrophageninfiltration der Koronararterienwand kam. Während in der PTCA-Gruppe die T-Zell-Anzahl nach Tag 14 und die Makrophagenanzahl bereits nach dem ersten Tag post Intervention nahezu auf Kontrollwerte sank, stieg die Anzahl der T-Zellen nach Brachytherapie kontinuierlich bis zu Tag 28 an und auch die Makrophagenanzahl blieb bis zu Tag 28 deutlich gegenüber der PTCA- und Kontrollgruppe erhöht.

Die prolongierte späte Inflammationsreaktion nach Brachytherapie bestätigte sich auch in der Analyse der Transkriptionsfaktoren nuclear factor kappa B (NFκB) und activator protein-1 (AP-1). Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Inflammation, Proliferation und Migration (Abid et al. 2005) und zeigten im electrophoretic mobility shift assay eine erhöhte Aktivität in den Koronargefäßen nach Brachytherapie im Vergleich zu Kontroll-

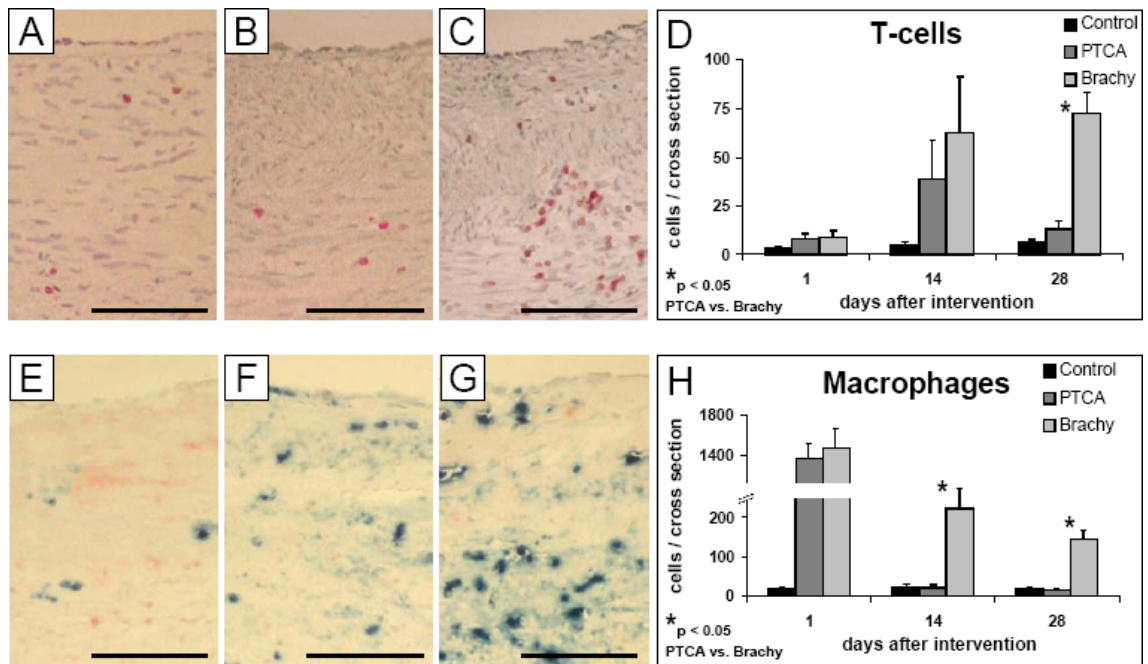


Abb. 7 Immunhistochemische Färbung von T-Zellen (A-C) und Makrophagen (E-F) von Kontrollgefäßen (A,E), Koronargefäßen nach PTCA (B,F) und nach Brachytherapie (C,G). Quantifizierung der T-Zell- und Makrophagenanzahl (D,H) in Kontroll- und Behandlungsgruppen zur unterschiedlichen Zeitpunkten nach Intervention (aus Deiner et al. Cardiovasc Res 2007)

gefäßen und Gefäßen nach PTCA zu allen untersuchten Zeitpunkten bis zu 28 Tage nach Intervention (Deiner et al. 2007B). Die unvollständige und nur initial beobachtete Proliferationsinhibition und protrahierte späte Inflammation nach Brachytherapie führten im Vergleich zur PTCA zu einem späten Lumenverlust, der hauptsächlich durch negatives arterielles Remodeling bedingt war. Interessanterweise konnten wir in den Koronargefäßen nach koronarer Brachytherapie im Vergleich zu den Kontrollgefäßen und den Gefäßen nach PTCA eine Überexpression von MMP-9, einer Matrixmetalloproteinase, die eine Schlüsselrolle bei arteriellem Remodeling spielt (Galis et al. 2002) und durch NFκB und AP-1 reguliert wird, nachweisen.

Wenngleich sich ein Kausalzusammenhang auf dem Boden unserer Ergebnisse nicht herleiten lässt, ist dennoch wahrscheinlich, dass eine NFκB und AP-1 vermittelte Aktivierung von MMP-9 am späten negativen Remodeling und dem konsekutiven Lumenverlust nach Brachytherapie beteiligt ist.

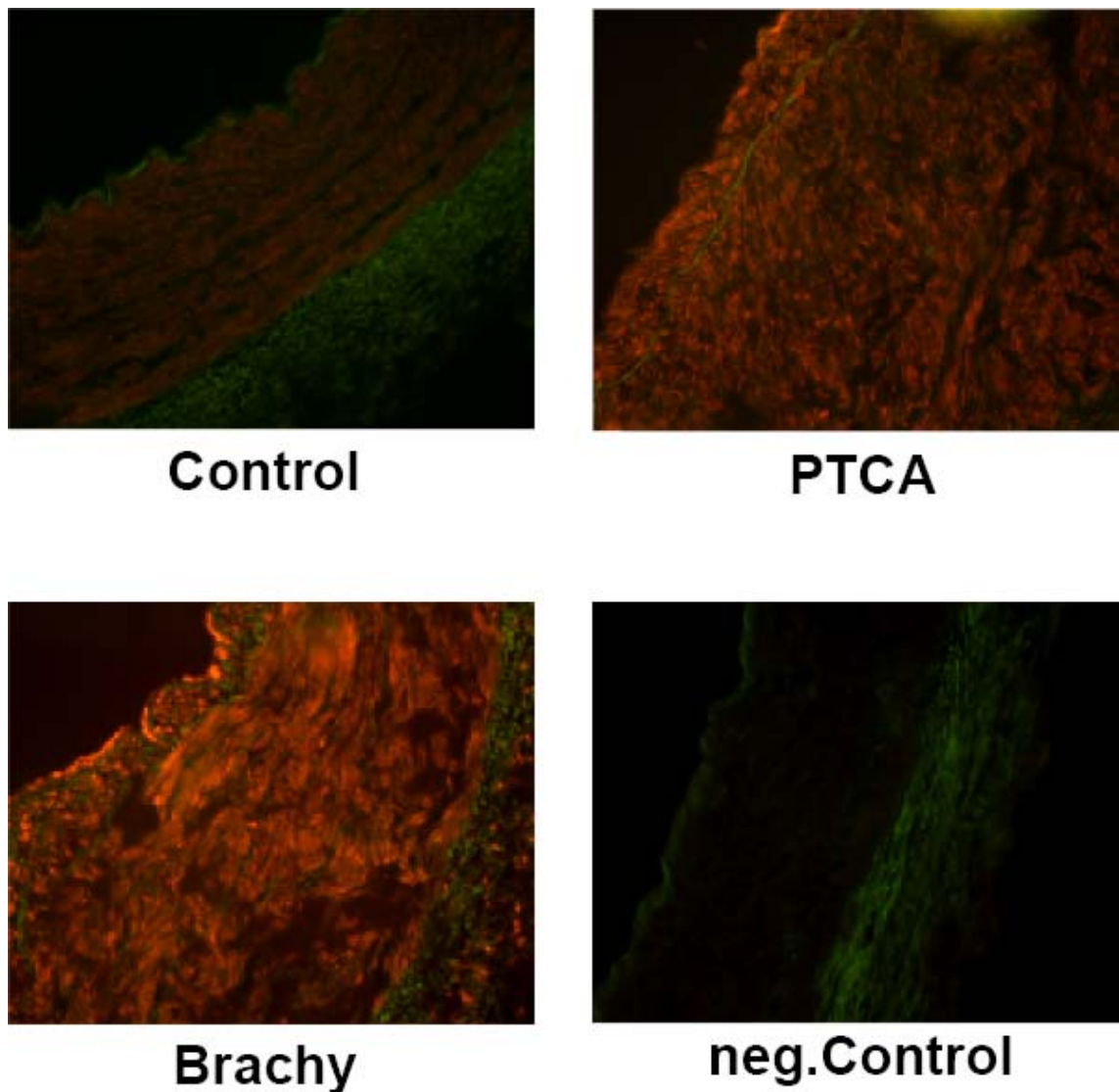


Abb. 8 Repräsentative immunohistochemische Färbung von MMP-9 (rote Färbung) 28 Tage nach Intervention (Hintergrundautofluoreszenz zeigt die elastischen Membranen).

Wir haben in dieser Studie Veränderungen in der Thrombozytenfunktion bzw. -aktivierung und Thrombenbildung nach Brachytherapie nicht untersucht. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Thrombozyten an den beobachteten Veränderungen beteiligt waren. Thrombozyten sind an der NFκB-Aktivierung beteiligt, was in unserer Studie mit einer prolongierten Inflammation verbunden war, NFκB ist wiederum in die Regulation von tissue factor involviert, und könnte hierüber ebenfalls zu einer verspäteten Erhöhung der Thrombogenität nach Brachytherapie und vielleicht auch nach DES-Implantation führen.

Unsere Ergebnisse könnten somit einen neuen Pathomechanismus und

eventuell einen neuen Therapieansatz für die nach antiproliferativen Katheterverfahren beobachteten Komplikationen wie Spätthrombose oder später Restenose darstellen (letztere wurde zuletzt häufiger für die Brachytherapie beschrieben).

Originalarbeiten

- Deiner, C., Shagdarsuren, E., Schwimmbeck, P.L., Rosenthal, P., Lodenkemper, C., Rauch, U., Pauschinger, M., Dietz, R., Schultheiss, H.P., Dechend, R., **Pels, K.** Nf-kappa b and AP-1 activation is associated with late lumen loss after porcine coronary angioplasty and antiproliferative beta-irradiation. *Cardiovasc Res.* 75(1):195-204, 2007.

2.2 Komplexe Tierversuchsmodelle: Grundlage der Untersuchung therapeutischer Optionen bei koronarer Restenose

Das Großtiermodell des Hausschweins ist für die experimentelle Kardiologie aufgrund einer dem menschlichen Herzen ähnlichen Anatomie und Koronarmorphologie das am besten geeignete Modell für die Untersuchung der Pathophysiologie der koronaren Restenose. Im Unterschied zum Kaninchenmodell und zu Kleintiermodellen sind beim Hausschwein und beim Menschen die Koronararterien muskulär und nicht elastisch (Bayes-Genis et al. 2000), was von erheblicher Bedeutung für die „response to injury“-Reaktion der Gefäßwand nach Katheterintervention ist. Eine wesentliche Limitation des präklinischen Hausschweinmodells ist jedoch das fehlende Vorliegen von atherosklerotisch erkrankten Gefäßen bei den zumeist jungen Tieren, wie sie bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und unterschiedlichen koronaren Risikofaktoren vorliegt. Sowohl die Untersuchungen der Pathomechanismen als auch die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zur Behandlung der koronaren Restenose im Tiermodell hängen in ihrer Wertigkeit von der Voraussagekraft im Vergleich zur humanen Situation ab. Daher wird aufgrund des fehlenden Vorliegens einer KHK bei Schweinen die Bedeutung der Ergebnisse experimenteller Untersuchungen im Schweinemodell zum Teil kritisch beurteilt. Unser Ziel dieser Versuche war es daher, bei dem von uns bereits etablierten Koronarangioplastiemodell am Hausschwein durch dietätische und medikamentöse Maßnahmen ein komplexes Atherosklerosemodell für präklinische kardiologisch-interventionelle Experimente zu entwickeln. Wir gingen bei diesem Versuchsansatz davon aus, dass Schweinekoronararterien unter den Bedingungen einer Hyperglykämie und Hyperlipoproteinämie dieselben arteriosklerotischen Veränderungen durchmachen, wie dies bei Koronargefäßen von Menschen der Fall ist. Hierzu wurden insgesamt 10 Tiere untersucht, von denen vier Schweine zwei verschiedene fettreiche Diäten (2% Cholesterin + 17% Kokusnussfett bzw. 4% Cholesterin + 17% Kokusnussfett) und zwei der Tiere mit der 4%igen Cholesterindiät zusätzlich eine Gesamtdosis von 150 mg/Kg Streptozotocin intravenös zur Induktion einer Hyperglykämie erhielten. 6 Tiere erhielten eine Kontrollnormaldiät und alle Tiere mit Ausnahme eines Schweines der 2% Cholesterin und 17% Kokusnussfett-Diät (8 Wochen) wurden 13 Wochen

nachbeobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung von Blutglukose und Lipidparametern. Der Mittelwert für die über den gesamten Beobachtungszeitraum zweimal wöchentlich bestimmten Lipidparameter ist für die 3 verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrollgruppe, Gruppe Cholesterinreiche Diät und Gruppe High-Cholesterin Diät plus Streptozotozin) in der folgenden Grafik zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die lipidreiche Diät zu einer deutlichen Erhöhung von LDL- und Gesamtcholesterin und Triglyceriden im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, wobei es keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Gruppe Cholesterinreiche Diät und der Gruppe High-Cholesterin Diät plus Streptozotozin gab.

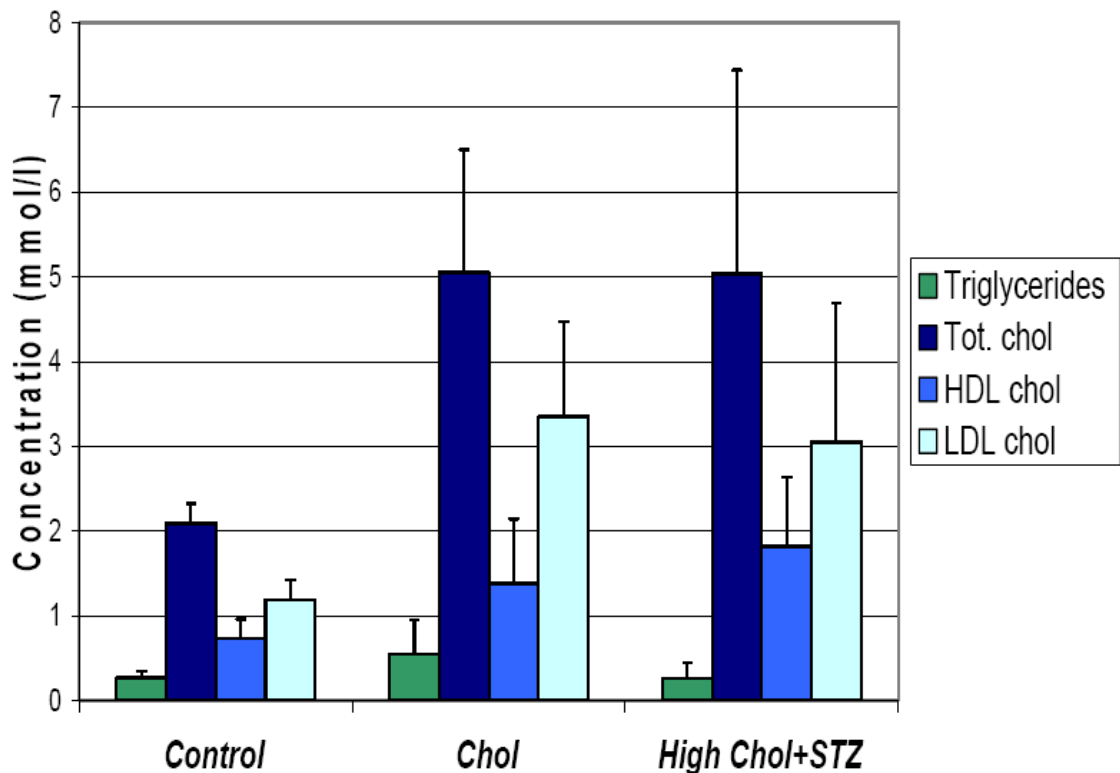


Abb. 9 Cholesterin- und Tryglyceridmittelwerte der drei Versuchsgruppen nach zweimaliger Bestimmung über 13 Wochen (aus Artinger et al. Can J Cardiol 2007).

Die verschiedenen Blutglukosewerte vor und nach jeder Streptozotozininjektion (1-3 A oder B), am Tag 4-7 nach der ersten Injektion und danach wöchentlich sind für die beiden Tiere der Gruppe High-Cholesterin Diät plus Streptozotozin ebenfalls grafisch zusammengefasst und zeigen, dass die

Streptozotocininjektionen bei einem Tier bis auf einen kurzfristigen Abfall der Blutglukose keine Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert induzierten, bei einem anderen Tier zu einem temporären (bis zur Woche 7), aber keinem dauerhaften Blutglukoseanstieg führten.

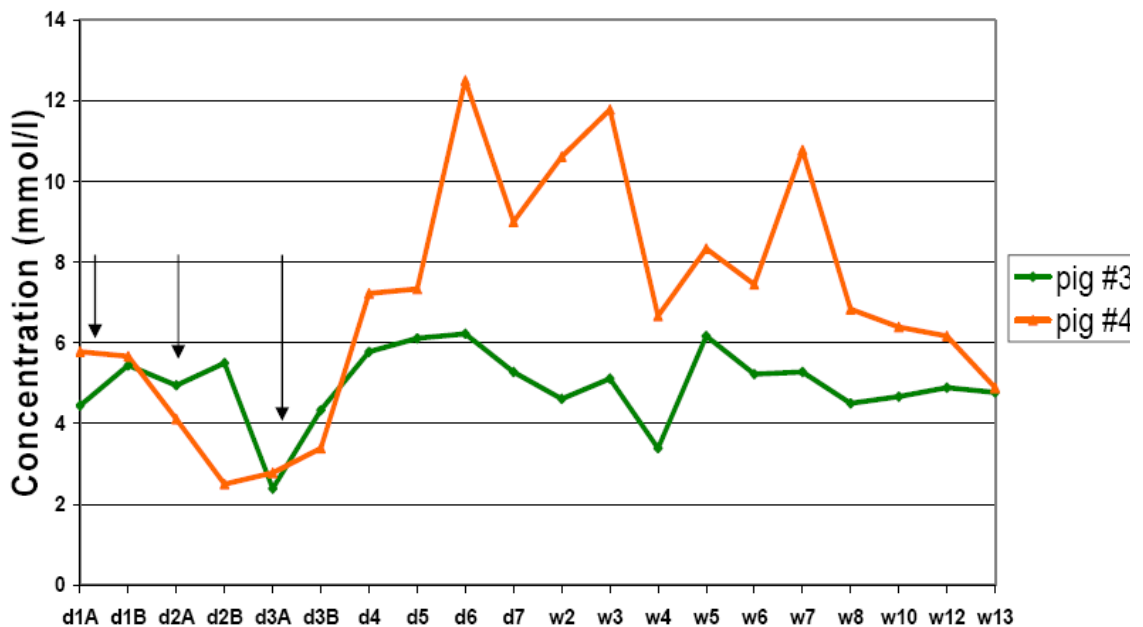


Abb. 10 Blutglukosewerte vor und nach Streptozotocininjektion (siehe Pfeil), 4-7 Tage und dann wöchentlich nach der ersten Injektion bei zwei Versuchstieren der Gruppe High-Cholesterin Diät plus Streptozotocin (aus Artinger et al. Can J Cardiol 2007).

Histologische Untersuchungen der Koronararterien beider Gruppen mit fettreicher Diät zeigten Läsionen mit einer diskreten Neointima und Schaumzellen (siehe Koronargefäßübersicht auf der linken Seite der folgenden Abbildung), die mutmaßlich aus den immunhistologisch identifizierten Makrophagen (siehe blaufärbte Zellen) hervorgehen. Es fand sich kein Unterschied in der Histologie zwischen Gruppe Cholesterinreiche Diät und der Gruppe High-Cholesterin Diät plus Streptozotocin, bei beiden war die Makrophageninfiltration der Arterienwand auf die innere, lumenwärts gerichtete Zellschicht beschränkt, im Gegensatz zu den Koronargefäßen der Kontrollgruppe, wo sich überhaupt keine Makrophagen in der nicht verdickten Arterienwand ohne Neointima fanden.

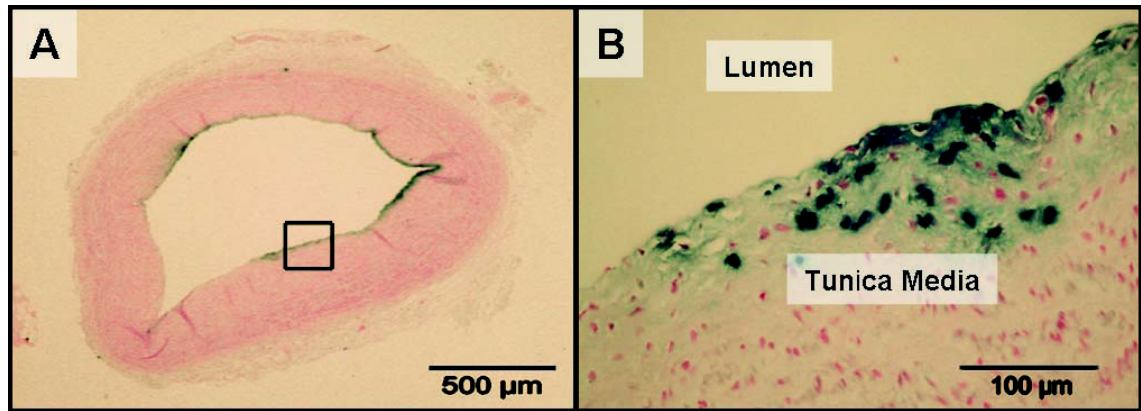


Abb. 11 Immunhistochemische Färbung (blau) von Makrophagen eines Koronargefäßquerschnittes einer rechten Koronararterie 13 Wochen nach High-Cholesterin Diät und Streptozotocininjektion (rechte Hälfte zeigt einen vergrößerten Ausschnitt –siehe Viereck der linken Bildhälfte; aus Artinger et al. Can J Cardiol 2007).

Zusammengefasst konnte nach den beschriebenen diätetischen-medikamentösen Maßnahmen im Schweinemodell trotz deutlicher Erhöhung der Blutlipidparameter in den Gruppen mit fettreicher Diät keine fortgeschrittene koronararteriosklerotische Läsion mit signifikanter Lumenstenosierung induziert werden. Es zeigten sich in beiden Gruppen nach fettreicher Diät/Streptozotocininjektion Frühstadien einer atherosklerotischen Läsion ohne wesentliche Lumenstenosierung. Darüber hinaus induzierte die Streptozotocininjektion, im Gegensatz zu den Beschreibungen in Kleintiermodellen in der Literatur, keine dauerhafte Hyperglykämie und führte auch nicht zu einer Veränderung des Lipidprofils. Die Gründe für die fehlende Induktion progredienter Koronarläsionen nach lipidreicher Ernährung im Gegensatz zu Kleintiermodellen könnten neben den speziesspezifischen Unterschieden in einer unterschiedlichen Disposition verschiedener arterieller Gefäße einer Spezies (Koronargefäße, periphere Arterien wie Arteria carotis oder Arteria iliaca, Aorta etc.) eine Atherosklerose zu entwickeln, begründet sein. So zeigte sich beispielweise in einer Arbeit mit Minischweinen, die bis zu 50 Wochen eine cholesterinreiche Diät erhielten, dass eine fortgeschrittene Atherosklerose an bestimmten arteriellen Gefäßen (Mesenterialarterien, abdominelle Aorta) nicht aber an Koronararterien dieser Tiere festzustellen war (Reitman et al. 1982). Interessant ist auch die Diskrepanz bezüglich einer Induktion von Hyperglykämie mittels Streptozotocin zwischen Kleintiermodellen

und dem Minischwein bzw. Hausschwein. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet hierfür die Arbeit von Dufrane et al., die zeigte, dass beim Hausschwein im Vergleich zu Primaten und Ratten eine niedrigere Expression des GLUT2-Transporters, der für die Streptozotozinempfindlichkeit der pankreatischen Betazellen mitverantwortlich ist, vorliegt (Dufrane et al. 2006).

Unterschiedliche Arbeiten haben gezeigt, dass die Dauer der cholesterinreichen Diät mit dem Schweregrad der atherosklerotischen Gefäßveränderungen wie auch beim Menschen zusammenhängt. Unsere Tiere hatten nach lipidreicher Diät aber bereits nach 13 Wochen ein Gewicht von ca. 84 kg erreicht, weitere Wochen oder gar Monate der Diät und danach eine vaskuläre Intervention mit erneuter Nachbeobachtung sind allein technisch bei zu hohem Gewicht so gut wie unmöglich.

Somit können wir aus unseren Daten schlussfolgern, dass das Hausschweinmodell nicht als Ausgangsmodell mit fortgeschrittenen, hochgradig stenosierten arteriosklerotischen Koronarläsionen für weitere Untersuchungen in der interventionellen kardiovaskulären Forschung geeignet ist.

Originalarbeiten

Artinger S, Deiner C, Loddenkemper C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, **Pels K**. Complex porcine model of atherosclerosis: Induction of early coronary lesions after long term hyperlipidemia without sustained hyperglycemia. *Can J Cardiol* 2008, in press.

2.3. Lokale Therapie der Koronaren Restenose

2.3.1 Angiogene Gentherapie und Neointimabildung

Eine Angiogenese von Mikrogefäßen der inneren Gefäßwand von Koronararterien tritt nur während der Atherogenese auf und seit längerer Zeit wird postuliert, dass diese Mikrogefäße an der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung und der koronaren Restenose beteiligt sind. Der vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein für die postnatale Angiogenese essentielles proangiogenes Zytokin, das zur Stimulation von Kollateralgefäßbildung in der Behandlung der ischämischen Herzerkrankung eingesetzt wurde. Trotz des in klinischen Studien gezeigten therapeutischen Nutzens einer lokalen VEGF-Therapie zur Behandlung der ischämischen Herzerkrankung (Isner und Losordo 1999), haben tierexperimentelle Studien potentielle unerwünschte Nebenwirkungen (Assoziation von Neovaskularisation im Plaque und Plaquewachstum) aufgezeigt und Zweifel an der Sicherheit der VEGF-Therapie hervorgerufen (Moulton et al 1999, Celetti et al. 2001A). In einer Studie (hypercholesterinämisches Kaninchenmodell) zeigte sich ein direkter Kausalzusammenhang zwischen VEGF-Gabe und Plaquewachstum, nach einer einmaligen intramuskulären Injektion von VEGF-Protein kam es zu einer Zunahme der Aortenplaquegröße (Celetti et al. 2001B) .

Es stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse der erwähnten experimentellen Kleintierstudien von klinischer Relevanz und auf klinische Studien übertragbar sind. Bislang wurde in Phase I und II-Studien einer lokalen (koronarer und periphervaskulärer) VEGF-Gentherapie bei nachgewiesener Therapieeffizienz keine Zunahme von Koronarläsionen beobachtet (Laitinen et al. 2000; Mäkinen et al. 2002). Die in diesen klinischen Studien gewählte Therapieform unterscheidet sich aber vom Versuchsaufbau der zuvor genannten Tierexperimente. Daher untersuchten wir den Effekt einer lokalen (peri)adventitiellen VEGF₁₆₅-Gentherapie nach ballonvermittelter Läsionsinduktion, vergleichbar mit der Therapiemodalität der erfolgreichen humanen Angiogenese-Gentherapiestudien. Hierbei wurde der Einfluss der VEGF-Gentherapie auf die Mikrogefäß-Angiogenese in der Koronarläsion von Intima/Media und die Koronarläsionsentwicklung (Läsionsgröße) 3, 14 und 28

Tage nach Ballondilatation im Schweinmodell untersucht.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Versuchsaufbau und die koronarmorphologischen Veränderungen nach Ballondilatation und lokaler VEGF-Therapie mittels Nadelinjektionskatheter.

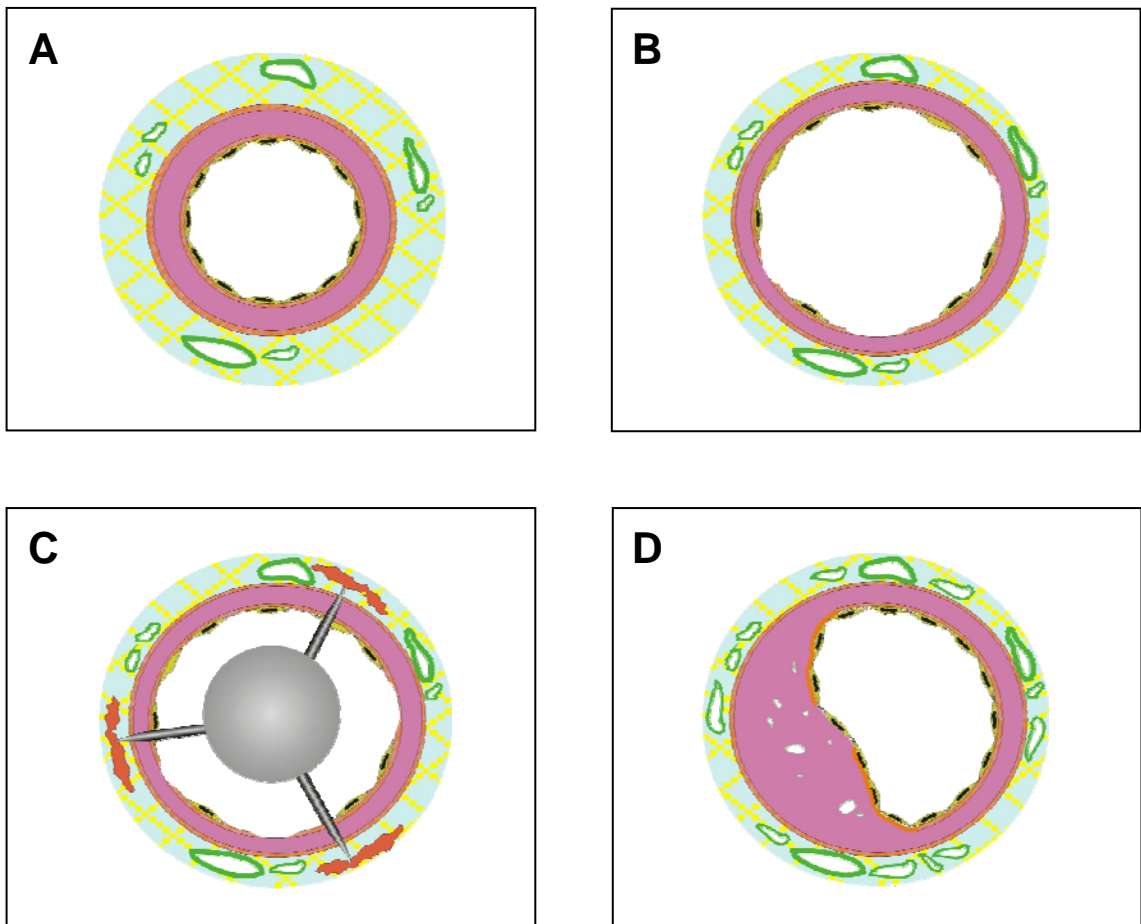


Abb. 12 A) Aufbau einer gesunden Koronararterie von innen nach außen: Tunica Intima (Endothel), Lamina elastica interna, Tunica Media, Lamina elastica externa, Adventitia mit vereinzelt Vasa vasorum. B) Koronararterie nach Ballondilatation: partielle Denudation des Endothels, Ruptur der Lamina elastica und teilweise auch Media. C) Nadel-Injektionskatheter in Position zur Injektion des Plasmid-Liposomen-Gemischs in die Adventitia des dilatierten Gefäßabschnittes. D) Reaktion der Gefäßwand auf die Verletzung mittels Ballonkatheter: Proliferation von Intima und Media (Neointimabildung), Vasa vasorum-Angiogenese in Neointima und Adventitia.

Zunächst führten wir zum Nachweis eines erfolgreichen VEGF-Gentransfers mittels Nadelinjektionskatheter eine RT-PCR durch (siehe folgende Abb.13).

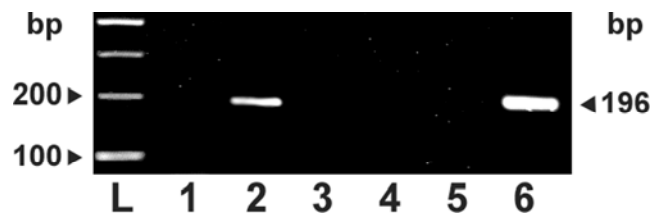


Abb. 13 VEGF Transgenexpression in porcinen Koronararterien 3 Tage nach Ballondilatation und Transfer mittels Nadelinjektionskatheter.

Das transfizierte VEGF₁₆₅ konnte in den VEGF-behandelten (Reihe 2, 196 bp amplifiziertes Fragment), nicht aber in den LacZ-behandelten Gefäßen (Reihe 3) nachgewiesen werden. Reihe 1 zeigt die Kontroll-PCR ohne vorangehende reverse Transkription. Reihe 6 zeigt die positive Kontrolle mit dem VEGF-Plasmid. Reihe 4 und 5 sind Negativkontrollen: RT-PCR eines VEGF-behandelten Gefäßes bei Weglassen des 5' oder 3' Primers.

Die in der Abbildung 14 dargestellten Gefäßquerschnitte zeigen repräsentativ die charakteristischen histomorphologischen Gefäßveränderungen 28 Tage nach PTCA und VEGF (A) bzw. LacZ (B)-Gentransfer. Bei beiden Gefäßen ist eine Ruptur der Lamina elastica interna zu erkennen, die Gefäßläsion mit kombinierter Intima und Media unterscheidet sich zwischen beiden Behandlungsgruppen nicht wesentlich.

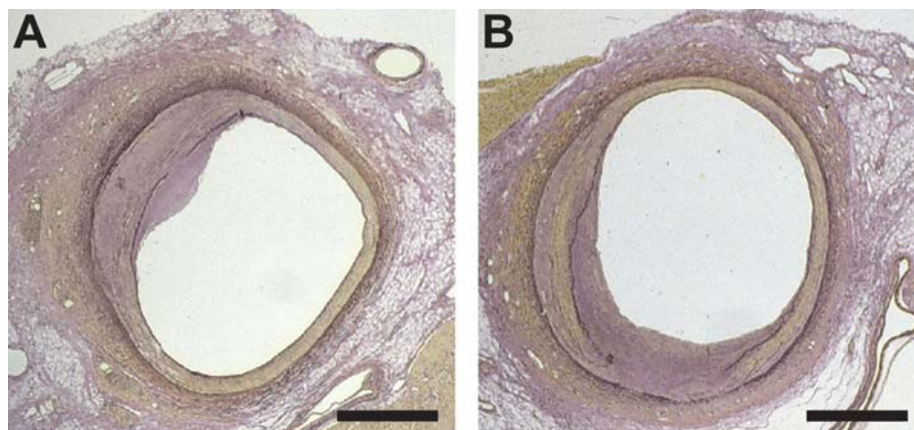


Abb. 14 Histomorphologie VEGF- und LacZ-Gen transfizierter Koronararterien (Elastica von Gieson-Färbung; aus Pels et al. Cardiovasc. Res. 2003)

Die digitale quantitative Bildanalyse der Intima+Media-Läsionsfläche der Gefäße beider Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Koronarintervention bestätigt die histomorphologische Einschätzung. Zu keinem Zeitpunkt nach Intervention unterscheidet sich die Läsionsfläche (Intima und Media) zwischen VEGF-Gen- und Kontrollgen-behandelten Gefäßen signifikant, wenngleich sich 28 Tage nach Intervention ein Trend zur geringeren Läsionsfläche in der VEGF-Gruppe zeigt. Darüber hinaus zeigt die Bildanalyse, wie zu erwarten, dass es in beiden Behandlungsgruppen mit der Zeit (3, 14 und 28 Tage nach Intervention) zu einem signifikanten Anstieg der Intima+Media-Läsionsfläche im Vergleich zu den nicht dilatierten Gefäßen kommt.

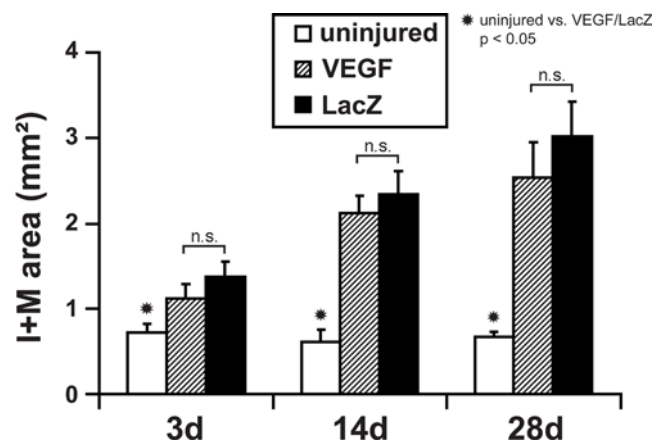


Abb. 15 Intima + Media-Fläche nach Ballondilatation und VEGF- / LacZ-Gentransfer (* nicht dilatierte Kontrollgefäße vs VEGF/LacZ p<0,05; aus Pels et al. Cardiovasc. Res. 2003)

Neben der möglicherweise durch VEGF-Gentransfer induzierten Zunahme der Gefäßläsion/Verdickung, wollten wir untersuchen, ob sich nach lokalem (peri)adventitiellem VEGF-Gentransfer die mit der Läsionszunahme im Zusammenhang stehende Läsionsvaskularisierung der Intima-Media verändert. Hierzu wurden die Gefäßquerschnitte zunächst mit einem Antikörper gegen den Endothelzellmarker „von Willebrand Faktor“ immunhistochemisch gefärbt, um eine Darstellung der Mikrogefäße in den verschiedenen Gefäßkompartimenten zu ermöglichen und anschließend eine genaue quantitative Bildanalyse der Mikrogefäßangiogenese durchführen zu können. Die Untersuchung aller Gefäßsegmente beider Behandlungsgruppen zu den verschiedenen

Zeitpunkten nach Intervention ergab, dass bis zu Tag 14 nach Intervention keine Mikrogefäßangiogenese in der Intima+Media-Läsion auftrat und erst am Tag 28 eine regelmäßige Intima+Media-Vaskularisation in beiden Behandlungsgruppen zu sehen war. Diese Intima+Media-Vaskularisation war jedoch nur gering ausgeprägt und es war kein wesentlicher Unterschied im Ausmaß der Vaskularisation zwischen VEGF und LacZ-Kontrollgruppe erkennbar. Vergleicht man jedoch die Vaskularisierung der Adventitia beider Behandlungsgruppen, so zeigen die folgenden repräsentativen Fotografien der Adventitia nach immunhistochemischer Endothelzellsfärbung (rote Färbung) eine deutliche Zunahme der Mikrogefäßangiogenese in den VEGF-Gen (A) im Vergleich zu Kontrollgen (B) behandelten Gefäßen.

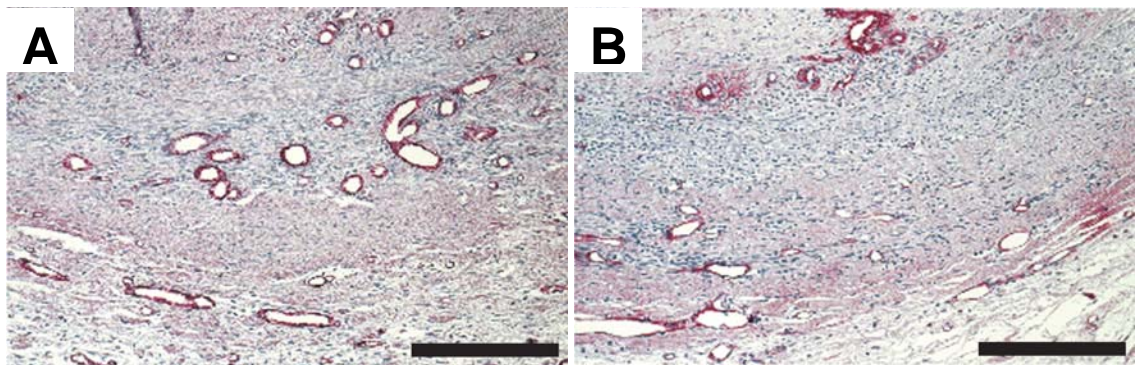


Abb. 16 Adventitiamikrogefäßangiogenese 28 Tage nach Ballondilatation und VEGF-/LacZ-Gentransfer (von Willebrand Faktor-Antikörper Immunhistochemie von Endothelzellen)

Zum quantitativen Vergleich der Intima+Media-Neovaskularisation beider Behandlungsgruppen führten wir eine Bildanalyse verschiedener Parameter der Mikrogefäßangiogenese durch. Zum einen analysierten wir die Mikrogefäßanzahl in der Intima+Media-Läsion und darüber hinaus die Mikrogefäßdichte, da die Anzahl allein nicht notwendigerweise die relative Intima+Media-Vaskularisierung bei zunehmender Intima+Media-Fläche nach Intervention widerspiegelt. Bei beiden Parametern zeigte sich 28 Tage nach Intervention kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Da VEGF neben der Angiogenese auch die Vasodilatation vermittelt, wurde von uns der Mikrogefäßgrößenindex berechnet. Dieser war in der VEGF-Gruppe größer, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

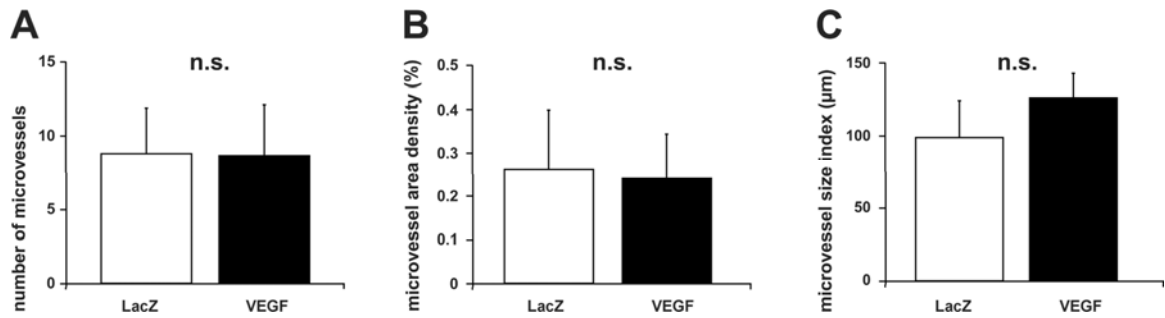


Abb. 17 Intima + Media Mikrogefäßbildanalyse 28 Tage nach Ballondilatation und VEGF-/LacZ-Gentransfer (A: Mikrogefäßanzahl, B: Mikrogefäßdichte, C: Mikrogefäßgrößenindex; aus Pels et al. Cardiovasc. Res. 2003)

Ein wesentlicher Prozess der Angiogenese ist die Endothelzellproliferation, sodass wir bei allen Gefäßen in denen Intima+Media-Angiogenese zu beobachten war, die Anzahl der proliferierenden Endothelzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Endothelzellen ($\times 100 =$ Proliferationsindex in %) bestimmten. Der Proliferationsindex in der Intima+Media-Läsion lag bei den VEGF behandelten Gefäßen bei 7-22 % und bei den Kontrollgen-behandelten Gefäßen bei 18-24 %, sodass auch die Endothelzellproliferationsaktivität in der Intima+Media-Läsion beider Behandlungsgruppen vergleichbar war.

Fasst man unsere Studienergebnisse zusammen, lässt sich sagen, dass der lokale (peri)adventitielle VEGF₁₆₅-Gentransfer in unserem Modell der balloninduzierten koronaren Läsionsbildung zu keiner der zuvor diskutierten „unerwünschten Nebenwirkungen“ geführt hat, die biologische Wirksamkeit der lokalen VEGF-Therapie (gesteigerte Adventitiavaskularisierung im VEGF-Arm) jedoch nachgewiesen werden konnte. Weder die Intima+Media-Läsionsvaskularisierung noch die Intima+Media-Läsionsfläche nahm in den VEGF-behandelten Gefäßen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Im Gegenteil, für die Intima+Media-Läsionsfläche zeigte sich sogar ein Trend zur geringen Läsionsfläche in der VEGF-Gruppe. Unsere Ergebnisse liefern somit ein „(patho)physiologisches Korrelat“ zu den bisherigen klinischen Erfahrungen in Phase I und II-Studien der lokalen VEGF-Gentherapie zur therapeutischen Angiogenese. In diesen wurde in der Folgezeit nach Gentherapie keine

Akzeleration der zu Grunde liegenden Koronaratherosklerose beobachtet. Auf der anderen Seite stehen unsere Ergebnisse auch nicht im Widerspruch zu den zuvor genannten tierexperimentellen Studien, betonen aber, dass das experimentelle Studiendesign und das gewählte Tiermodell entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse sind. Die in den o.g. experimentellen Studien beobachteten schädlichen Auswirkungen einer VEGF-Therapie wurden zum einen im Kleintiermodell an peripheren Gefäßen oder der Aorta gezeigt, oder zeigten sich nach systemischer Gabe von VEGF-Protein. Neben bekannten spezifischen Unterschieden bei den Tierspezies und den Unterschieden der „response to injury“-Reaktion von peripheren und koronaren Gefäßen scheint der Modus der VEGF-Applikation (lokal versus systemisch) und die Dosierung (in unserer Studie wurden mit den klinischen Studien vergleichbare Gendosierungen eingesetzt) von entscheidender Bedeutung für die VEGF-Wirkung (schädlich oder therapeutisch wirksam) zu sein. Darüber hinaus bleibt unklar, ob die Vaskularisierung in den unterschiedlichen Gefäßkompartimenten (Intima+Media und Adventitia) nicht auch eine unterschiedliche biologische Bedeutung hat. Die adventitielle Vaskularisation ist in den Kleintierstudien nicht untersucht worden, nur die Zunahmen der Neointima-Läsionsgröße und der Läsionsvaskularisation wurden gezeigt.

Abschließend können wir auf dem Boden unserer Studienergebnisse schlussfolgern, dass ein lokaler Gentransfer von geringen Konzentrationen an VEGF₁₆₅ in die äußeren Kompartimente von Koronararterien sicher und ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu sein scheint. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die Koronararterien in unserem Modell zwar Läsionen nach Ballondilatation (mit vielen Charakteristika einer koronaren Herzkrankheit: Zellproliferation und Migration, inflammatorische Reaktion und intramurale Thrombusbildung) aufweisen, es sich bei diesen Gefäßen aber dennoch nicht um atherosklerotisch veränderte Koronararterien (mit kalzifizierten oder lipidreichen Plaques) handelt. Letzteres könnte natürlich den biologischen Effekt von VEGF beeinflussen. Darüber hinaus ist zur Beurteilung einer sicheren Therapie eine Langzeitnachbeobachtung sowohl in experimentellen als auch in klinischen VEGF-Gentherapiestudien zu fordern.

Originalarbeiten

- **Pels, K.,** Deiner, C., Coupland, S.E., Noutsias, M., Sutter, A.P., Schultheiss, H.-P., Yla-Herttuala, S., Schwimmbeck, P.L. Effect of adventitial VEGF₁₆₅ gene transfer on vascular thickening after coronary artery balloon injury. *Cardiovasc. Res.* 60:664-672, 2003.

2.3.2 Angiogene Gentherapie und arterielles Remodeling

Das arterielle Remodeling spielt nicht nur eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Restenose nach koronarer Ballonangioplastie, sondern ist auch nach Implantation von Stents für die Restenosepathophysiologie von Bedeutung (Restenose in den stentnahen Referenzsegmenten, Remodeling als Prädiktor für das Ausmaß der Neointimaformation nach bare metal-Stentimplantation). In Analogie zur Hautwundheilung sind Fibrosierung (mit gesteigerter Ansammlung extrazellulärer Matrix) und Veränderungen des Kollagen- und Elastingehaltes wichtige Pathomechanismen des arteriellen Remodelings. Eine wesentliche Determinante der Hautwundheilung, nämlich die Mikrogefäßangiogenese und –regression, wurde bislang im Zusammenhang mit der arteriellen Wundheilung kaum untersucht, und ihre Bedeutung für die Pathogenese des Remodeling ist nahezu unverstanden. Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich in Vorversuchen untersucht, ob nach einer koronaren Ballondilatation eine adventitielle Angiogenese in Koronararterien auftritt, und wie diese die Läsionsbildung bzw. die Lumengröße und somit den Restenoseprozess beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen wie unter 2.1.2 ausführlich beschrieben, dass in der Frühphase nach PTCA eine Vasa vasorum-Angiogenese in der Adventitia stattfindet, gefolgt von einer später einsetzenden Regression dieser adventitiellen Mikrogefäße. Die Mikrogefäßregression korrelierte mit negativem Remodeling und Koronarstenosierung (Pels et al. 1999). Wenngleich ohne nachgewiesenen Kausalzusammenhang spekulativ, legen die Ergebnisse dennoch nahe, dass eine therapeutische Modulation der Mikrogefäßangiogenese bzw. –regression zu einer Prävention oder Reduzierung des negativen Remodelings und damit auch der Gefäßstenosierung führen könnte. Ziel dieser Experimente war daher zum einen die Stimulation der adventitiellen Mikrogefäßangiogenese bzw. die Prävention der Mikrogefäßregression nach koronarer Ballondilatation, und zum anderen die Überprüfung der Hypothese, dass sich dadurch tatsächlich das negative Remodeling und die Gefäßstenosierung inhibieren lassen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, über welche Mechanismen Mikrogefäße eine Modulation des Remodelings bewirken.

Bei insgesamt 20 Tieren wurde an 4 unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 7, 14 und 28 Tage) nach PTCA und intrakoronarem VEGF₁₆₅- bzw. LacZ-Gentransfer mittels Nadelinjektionskatheters die Koronargefäßsegmente untersucht.

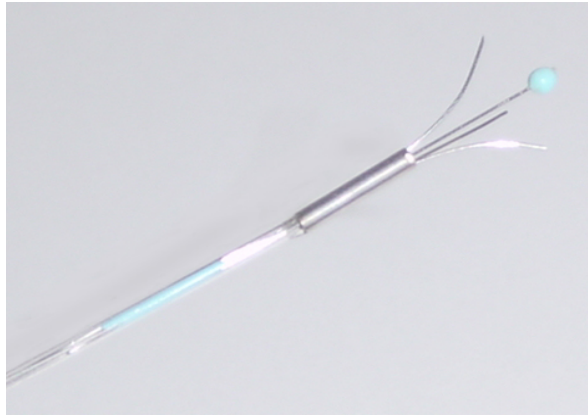


Abb. 18 Spitze des Nadelinjektionskatheters mit den drei Kanülen im ausgefahrenen Zustand wie bei Injektion in die Koronararterienwand.

Zur Beurteilung der Vergleichbarkeit hinsichtlich des balloninduzierten Gefäßtraumas der VEGF- und Kontrollplasmid-behandelten Gefäße wurde ein „injury score“ berechnet. Hier zeigte sich, dass das Ausmaß der Gefäßverletzung in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar war (1.70 ± 0.11 in der VEGF-Gruppe und 1.76 ± 0.09 in der LacZ-Gruppe, $p = n.s.$).

Die Effizienz des durchgeführten VEGF₁₆₅-Gentransfers und die Lokalisation der VEGF₁₆₅-Expression wurde mittels RT-PCR, in Situ-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. Die VEGF₁₆₅-Transgen-Expression war wie in der folgenden Abbildung 19 dargestellt in der RT-PCR mit für das Transgen spezifischen Primern von Tag 1 bis zu Tag 14 nach PTCA und lokalem Gentransfer in den VEGF-behandelten Koronargefäßen nachweisbar. Die VEGF₁₆₅-Transgen-Expression war in keinem der LacZ-Gen behandelten Gefäße und in keinem unbehandelten/nicht verletzten Gefäß nachweisbar.

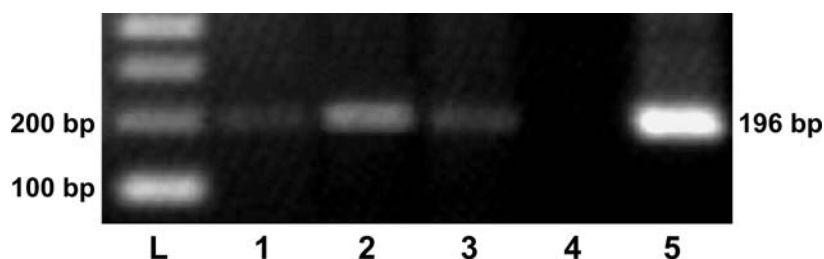


Abb. 19 VEGF₁₆₅-Expression in VEGF₁₆₅ transfizierten Koronararterien mittels RT-PCR. Amplifiziertes Fragment mit 196 Basenpaaren in Reihe 1 am Tag 1 nach Intervention, Reihe 2: 7 Tage nach Intervention, Reihe 3: 14 Tage nach Intervention. Reihe 4: keine nachweisbare Amplifikation/Expression 28 Tage nach Intervention. Reihe 5 zeigt die Positivkontrolle mit dem VEGF-Plasmid, und L die DNA-Größenmarkierung.

Bis zu 14 Tage nach PTCA und VEGF₁₆₅-Gentransfer wurde VEGF mRNA mit Hilfe der in Situ Hybridisierung in Endothelzellen und Perizyten der neoadventitiellen Mikrogefäße sowie in Zellen in unmittelbarer Nähe zu diesen Mikrogefäßen nachgewiesen, wobei die Expression 7 Tage nach VEGF-Gentransfer am stärksten war (dargestellt durch dunkle Körner in der folgenden Abbildung 20 A). In LacZ-transfizierten Gefäßen fand sich hingegen zu keinem Zeitpunkt nach Gentransfer eine VEGF mRNA-Expression in der in Situ-Hybridisierung. Konsekutiv zeigte sich in der Immunhistochemie eine VEGF-Protein-Expression bis zu Tag 28 nach VEGF-Gentransfer in den gleichen Zellen, in denen eine VEGF-mRNA-Expression zu sehen war. Die VEGF-Protein-Expression war 14 Tage nach VEGF-Gentransfer am stärksten (dargestellt durch Rotfärbung in Abbildung B). Im Gegensatz dazu wurde in den LacZ-transfizierten Gefäßen nur 7 Tage nach Intervention in einzelnen Zellen nahe der Mikrogefäße der Neoadventitia VEGF-Protein-Expression beobachtet.

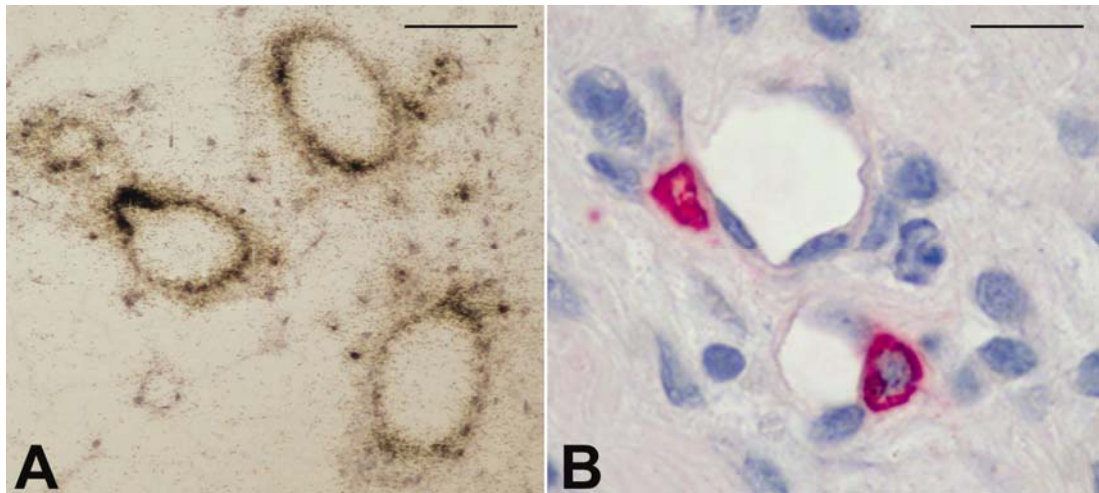


Abb. 21 **A** In Situ-Hybridisierung mit einer ^{35}S -UTP-markierten Sonde für VEGF-mRNA einer VEGF-transfizierten Koronararterie 7 Tage nach PTCA und Gentransfer (Balken = 80 μm). **B** Immunhistochemische Färbung mit einem VEGF-Antikörper zum Nachweis von VEGF-Protein 14 Tage nach PTCA und VEGF-Gentransfer

Nachdem wir zeigen konnten, dass in unserem Modell der lokale periadventitielle VEGF₁₆₅-Gentransfer zu einer VEGF-Überexpression in der Neoadventitia, insbesondere in den Mikrogefäßen und deren Proximität führte, untersuchten wir den biologischen Effekt dieser Überexpression. Die histomorphologische/immunhistologische Untersuchung der Koronararterienquerschnitte beider Behandlungsgruppen zeigte sowohl 14 als auch 28 Tage nach PTCA und Gentransfer eine verstärkte Mikrogefäßneovaskularisation der Neoadventitia von VEGF-behandelten Koronargefäßen.

Die quantitative Bildanalyse zeigte dann, dass bis zu 7 Tagen nach Intervention in den dilatierten Gefäßen, unabhängig vom transfizierten Gen, ein Anstieg der neoadventitiellen Mikrogefäßdichte (Gesamtfläche der Mikrogefäße im Verhältnis zur Fläche der Neoadventitia in %) im Vergleich zu den nicht dilatierten Gefäßen zu verzeichnen war. Zwischen Tag 14 und 28 nach Intervention war jedoch die neoadventitielle Mikrogefäßdichte in der VEGF-Gruppe signifikant höher als in der LacZ-Gruppe, und somit war die in der LacZ-Gruppe zu beobachtende neoadventitielle Mikrogefäßregression in der Spätphase nach Intervention durch VEGF-Gentransfer inhibiert (siehe Abbildung 22A). Die nach Intervention zunehmende Fläche der Neoadventitia zeigte hingegen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Analog verhielt es sich mit der Gesamtanzahl der adventitiellen Endothelzellen und der proliferativen Aktivität dieser Endothelzellen. Die Gesamtanzahl der adventitiellen Endothelzellen und die Anzahl proliferierender Endothelzellen (in der Abbildung 22B als Proliferationsindex angegeben = prozentualer Anteil der proliferierenden Endothelzellen an der Gesamtzahl der Endothelzellen in der Neoadventitia) stiegen bis zu Tag 7 in beiden Behandlungsgruppen an, unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant. An den Tagen 14 und 28 nach Intervention waren signifikant mehr adventitielle Endothelzellen in den VEGF-behandelten Gefäßen zu sehen (Gesamtanzahl adventitieller Endothelzellen: Tag 1: VEGF 16.8 ± 2.1 vs. LacZ 18.59 ± 7.2 , $p = \text{n.s.}$; Tag 7: VEGF 102.5 ± 24.7 vs. LacZ 52.47 ± 20.2 , $p = \text{n.s.}$; Tag 14: VEGF 75.82 ± 5.3 vs. LacZ 47.85 ± 10.0 , $p = 0.038$; Tag 28: VEGF 79.1 ± 6.9 vs. LacZ 37.01 ± 8.9 , $p = 0.006$). In der LacZ-Gruppe fiel am Tag 14 nach Intervention der Endothelzell-Proliferationsindex der Neoadventitia auf Ausgangswerte (entsprechend dem Proliferationsindex der nichtdilatierten/nichttransfizierten Gefäße) zurück, während in der VEGF-Gruppe der Proliferationsindex bis zu Tag 28 nach Intervention auf dem durch die Ballondilatation induzierten hohen Niveau blieb.

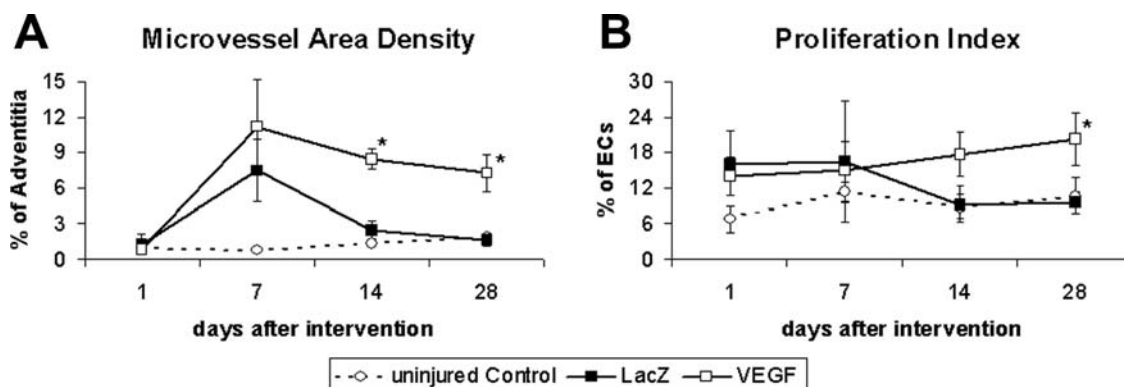


Abb. 22 A Mikrogefäßdichte und **B** Endothelzellproliferationsindex in der Adventitia nach PTCA und VEGF bzw. LacZ-Gentransfer (aus Deiner et al. Atherosclerosis 2007)

Welche Bedeutung diese Neovaskularisation auf die Gefäßwandarchitektur und die daraus resultierende Lumengröße der Koronargefäße nach PTCA hat, zeigen die histomorphologischen Veränderungen der Koronargefäße nach PTCA. Die Lamina elastica externa-Fläche (EELA) und Lumenfläche (LA) in den VEGF-behandelten Gefäßen erscheint größer als in den LacZ-behandelten Gefäßen. Die Abbildung 23A und B veranschaulicht die charakteristischen histomorphologischen Veränderungen beider Behandlungsgruppen in der Spätphase nach PTCA.

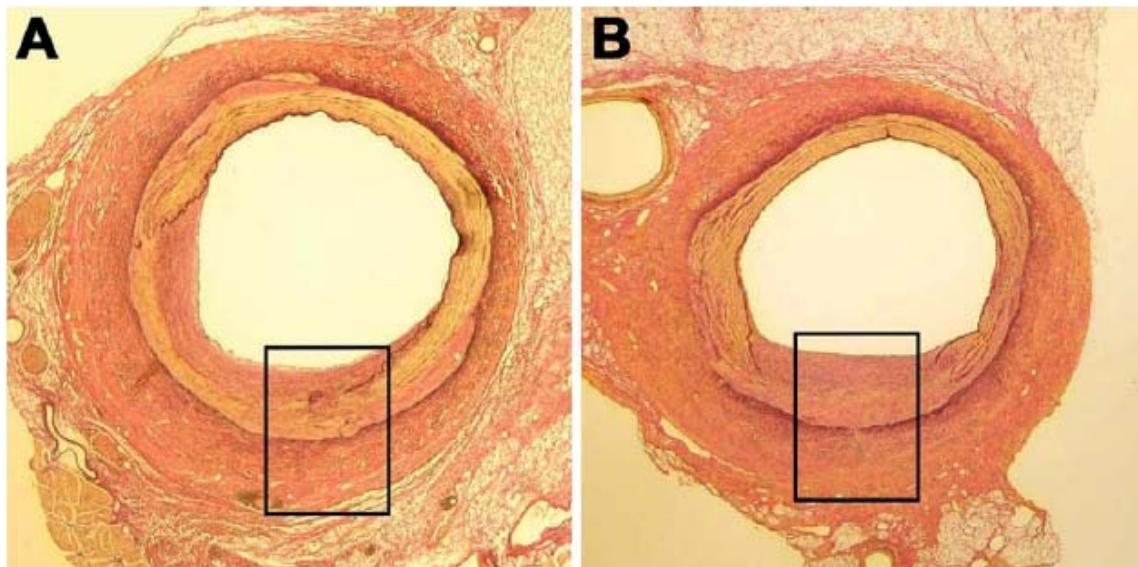


Abb. 23 Querschnitte von Koronargefäßen 28 Tage nach PTCA und LacZ- (A) bzw. VEGF- (B) Gentransfer (Elastica van Gieson-Färbung; aus Deiner et al. Atherosclerosis 2007)

Die automatische Bildanalyse der Gefäßquerschnitte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PTCA und Gentransfer bestätigte, dass in den VEGF gegenüber den LacZ-transfizierten Gefäßen, in den ein negatives Remodeling (Abnahme der EELA) stattfand, ein positives Remodeling (Zunahme der EELA) zu verzeichnen war. Am Tag 14 nach Intervention war der Unterschied dann statistisch signifikant, und es zeigte sich im Verlauf bis zu Tag 28 nach Intervention eine weitere deutliche Zunahme der EELA in den VEGF-behandelten, und eine weitere Abnahme der EELA in den LacZ-behandelten Gefäßen (VEGF 38.17 ± 11.76 % vs. LacZ -25.33 ± 2.27 %, $p = 0.006$; siehe Abbildung 24A). Da die Neointimaformation in beiden Behandlungsgruppen nach PTCA und Gentransfer gleich ausgeprägt war führte das positive

Remodeling in der VEGF-Gruppe zu einer signifikanten Abnahme des in der LacZ-Gruppe auftretenden Lumenverlustes 14 und 28 Tage nach Intervention (Tag 14: VEGF 5.09 ± 7.50 % vs. LacZ 40.12 ± 2.93 %, $p = 0.007$; day 28: VEGF -5.35 ± 18.33 % vs. LacZ 49.04 ± 1.64 %, $p = 0.042$; siehe Abbildung 24B).

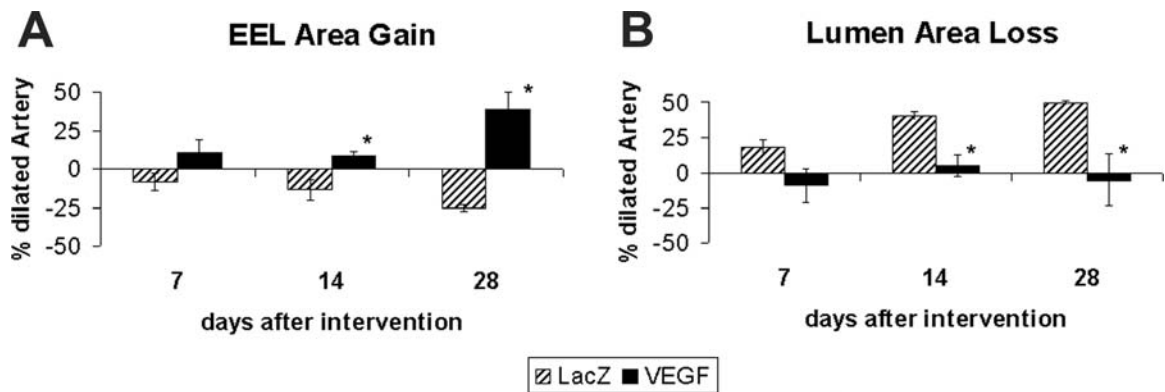


Abb. 24 A EEL-Flächengewinn und **B** Lumenflächeverlust nach PTCA und VEGF bzw. LacZ-Gentransfer

Basierend auf unseren Voruntersuchungen postulierten wir vor Beginn dieses Projektes, dass durch die mögliche VEGF-vermittelte Inhibition der späten Mikrogefäßregression nach Ballondilatation eine im Rahmen der arteriellen Wundheilung mit der Mikrogefäßregression einsetzende hypoxische Fibrosierung verhindert werden könnte. Die zuvor dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass durch lokalen (peri)adventitiellen VEGF-Gentransfer die adventitielle Mikrogefäßregression in der Spätphase nach PTCA verhindert werden kann. Mit dieser biologischen Wirkung des VEGF-Gentransfer war assoziiert, dass nicht nur das negative Remodeling inhibiert wurde, sondern sogar positives Remodeling induziert wurde, verbunden mit einer signifikanten Reduktion des Lumenverlustes. Ein wichtiger, diesem positiven Remodeling zugrundeliegender Mechanismus, könnte die Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM)-Komposition sein (eventuell indirekt durch eine Inhibition der lokalen adventitiellen Hypoxie oder direkt durch Einfluss des VEGF auf die für die ECM-Regulation verantwortlichen Schlüssel-moleküle). Wir bestimmten daher nach histochemischer Färbung mit der digitalen Bildanalyse den

Kollagen- und Elastingehalt der Neoadventitia. Dies wurde zu Zeitpunkten durchgeführt, an denen ein deutlicher Unterschied im Remodelingverhalten zwischen beiden Behandlungsgruppen zu verzeichnen war (14 und 28 Tage nach PTCA).

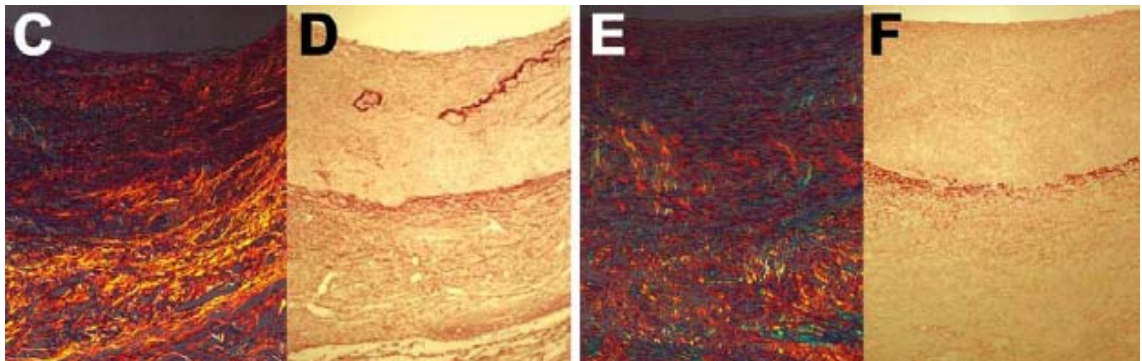


Abb. 25 in Abbildung 23 markierte Koronarsegmente nach histochemischer Picosiriusrot- und Orceinfärbung angrenzender Schnitte in 100 x Vergrößerung; Gelb-orangene Kollagenfärbung und braun-rötliche Elastinfärbung von VEGF-transfizierten Gefäßen (C und D) und LacZ-transfizierten Gefäßen (E und F); aus Deiner et al. Atherosclerosis 2007)

Zu beiden Zeitpunkten nach PTCA beobachteten wir in den VEGF- im Vergleich zu den LacZ-behandelten Gefäßen eine signifikante Erhöhung des neoadventitiellen Elastingehaltes (siehe Abbildung 26). Der Kollagengehalt der Neoadventitia war in der VEGF-Gruppe am Tag 14 nach Intervention signifikant erhöht, und am Tag 28 zwar immer noch höher als in der LacZ-Gruppe, jedoch nicht mehr statistisch signifikant (VEGF 72.11 ± 1.17 % vs. LacZ 64.36 ± 3.54 %; siehe Abbildung 26).

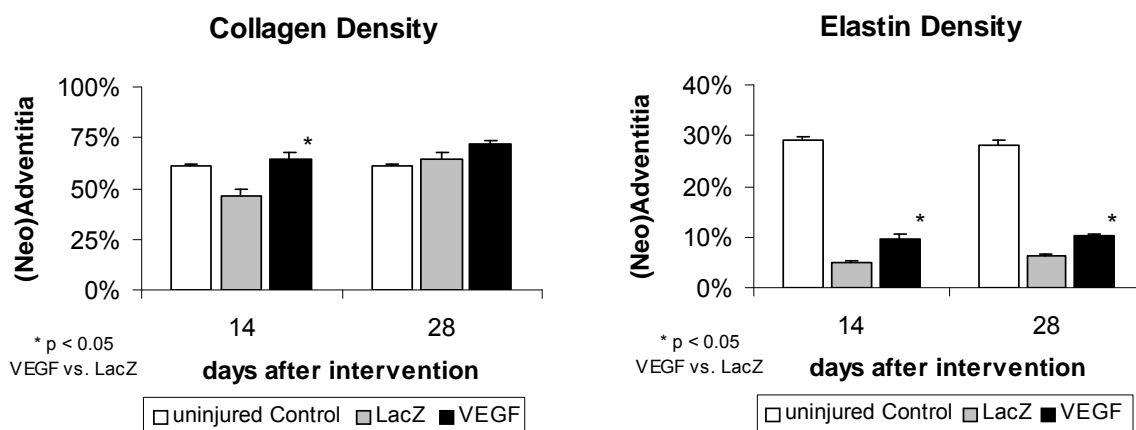


Abb. 26 A Adventitielle Kollagendichte und **B** Elastindichte nach PTCA und VEGF bzw. LacZ-Gentransfer

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob VEGF einen Einfluss auf den kontraktilem Apparat der Koronararchitektur (Myofibroblasten der Adventitia) und die lokale inflammatorische Antwort nach balloninduzierter Gefäßverletzung hat. Letztere ist von Bedeutung für die Umstrukturierung der ECM (Entfernung von anfallenden ECM-Fragmenten) und den Reparaturvorgängen nach Gewebstraumata. Zur Bestimmung des Myofibroblastengehaltes der Neoadventitia wurde das Myofibroblast-bezogene α -Aktin der Neoadventitia nach immunhistochemischer α -Aktin-Färbung mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert und der α -Aktin-Flächenanteil in % berechnet. An den in diesem Modell für das Remodeling entscheidenden Zeitpunkten nach PTCA (14 und 28 Tage nach Intervention) war der α -Aktin-Flächenanteil der Neoadventitia in den VEGF-behandelten Gefäßen signifikant reduziert gegenüber den LacZ-behandelten Gefäßen, was einem deutlich verringerten Myofibroblastenanteil der Neoadventitia in der VEGF-Gruppe entspricht (α -Aktin-Flächenanteil Tag 14: VEGF 14.19 ± 4.67 % vs. LacZ 27.24 ± 2.95 %, $p = 0.046$; Tag 28: VEGF 2.91 ± 0.54 % vs. LacZ 6.32 ± 0.43 %, $p = 0.001$).

Zur Analyse der lokalen inflammatorischen Reaktion wurden Makrophagen und T-Zellen (Suppressor und Helferzellen) nach immunhistochemischer Anfärbung mit CD 68- bzw. CD 3-Antikörpern quantifiziert. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den nicht dilatierten Koronargefäßen in beiden Behandlungsgruppen eine ausgeprägte Makrophageninfiltration der

Neoadventitia einen Tag nach PTCA (nicht dilatierte Koronargefäße: 1.89 ± 0.47 Zellen/mm² vs. VEGF 160.25 ± 18.01 Zellen/mm²; $p = 0.001$; vs. LacZ 115.0 ± 16.85 Zellen/mm², $p = 0.003$; siehe Abbildung 26 A), und 7 Tage nach PTCA eine signifikante Zunahme der neoadventitiellen T-Zellen (nicht dilatierte Koronargefäße: 15.33 ± 2.92 Zellen/mm² vs. VEGF 98.83 ± 7.29 Zellen/mm²; $p < 0.0001$; vs. LacZ 33.41 ± 1.26 Zellen/mm², $p < 0.0001$; siehe Abbildung 26 B). Während in der LacZ-Gruppe bereits 7 Tage nach Intervention die Makrophagendichte in der Neoadventitia auf Ausgangswerte fiel, blieb sie in der VEGF-Gruppe noch leicht erhöht, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur LacZ-Gruppe, um dann an Tag 14 nach PTCA und Gentransfer ebenfalls nahezu auf das Ausgangsniveau vor Intervention abzufallen. Im Gegensatz zur Makrophagendichte blieb die T-Zell-Infiltration in der VEGF-Gruppe bis zu Tag 28 nach Intervention auf dem am Tag 7 erreichten hohen Niveau, während sie in der LacZ-Gruppe bereits an Tag 14 wieder auf Kontrollniveau abfiel. An Tag 7, 14 und 28 nach Intervention war die T-Zell-Zahl in der Neoadventitia der VEGF-Gruppe signifikant höher als in der LacZ-Gruppe.

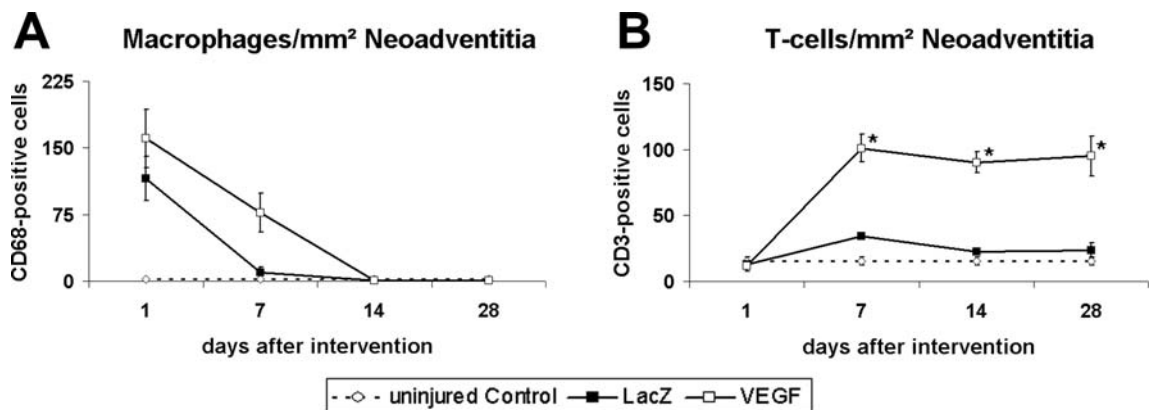


Abb. 27 A Adventitielle Makrophagendichte und **B** T-Zelldichte nach PTCA und VEGF bzw. LacZ-Gentransfer

Die zuvor dargestellten Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die VEGF-induzierte Prävention der adventitiellen Mikrogefäßregression zu späteren Zeitpunkten nach PTCA zu einer gesteigerten adventitiellen Elastindichte und in geringerem Ausmaß zu einer gesteigerten adventitiellen Kollagendichte führt. In gesunden, nicht dilatierten Koronararterien ist der adventitielle Elastingehalt hoch (ca. 30 %), und die Ballondilatation verursacht schon allein durch eine Zunahme der Neoadventitia eine relative Abnahme des Elastingehaltes. Sowohl in der LacZ- als auch in der VEGF-Gruppe kommt es nach Ballondilatation zur Bildung einer Neoadventitia. Obwohl sich das Ausmaß dieser Neoadventitiaformation nicht zwischen beiden Behandlungsgruppen unterschied, beobachteten wir einen deutlich höheren neoadventitiellen Elastingehalt in der VEGF-Gruppe. Elastin ist ein wichtiger Faktor für die Dehnbarkeit der Arterienwand und es erscheint daher schlüssig, dass das in der VEGF-Gruppe beobachtete positive Remodeling zum Teil auf die durch den erhöhten Elastingehalt bewirkte Zunahme der Gefäßdehnbarkeit zurückzuführen ist. Ob VEGF direkt die Elastinsynthese moduliert, ist unbekannt. Ein möglicher indirekter Mechanismus ist aber eine VEGF-induzierte Zunahme der Stickstoffmonoxidsynthese (NO) durch die erhöhte Zahl an mikrovaskulären Endothelzellen in der Neoadventitia. NO steigert auf der einen Seite die Tropoelastinexpression, und auf der anderen Seite die Kollagensynthese (Kolpakov et al. 1995). Diese Hypothese wird durch eine Studie von Stefanadis und Mitarbeitern unterstützt, die zeigten, dass die Entfernung von Mikrogefäßen der Aorta ascendens zu einer Abnahme der Gefäßdehnbarkeit, assoziiert mit vermindertem Elastingehalt, führt (Stefanidis et al. 1995). Die Rolle des Kollagens für das arterielle Remodeling ist unklar. Unsere Ergebnisse zeigen, dass VEGF-transfizierte Gefäße, die positives Remodeling aufweisen, einen höheren Kollagengehalt haben als LacZ-transfizierte Gefäße mit negativem Remodeling. Ähnliche Beobachtungen haben Kingston und Mitarbeiter gemacht, die eine Prävention des negativen koronaren Remodelings im Zusammenhang mit zunehmender Kollagendichte der Adventitia sahen, und postulierten, dass eine kollagenreichere Adventitia wie ein äußeres Stützgeflecht wirken könnte (Kingston et al. 2003). Auf der anderen Seite beschrieben Ward und Mitarbeiter, dass inhibiertes negatives Remodeling mit einer verminderten Kollagendichte assoziiert war (Ward et al. 2001). Diese

widersprüchlichen Daten sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass nicht das Gesamtkollagen die entscheidende Determinante für das Remodeling ist, sondern eher die räumliche Anordnung und Vernetzung der Kollagenfibrillen und die Kollagensubtypenverteilung (z.B. das Kollagen I/III-Verhältnis), wie für das myokardiale Remodeling bei dilatativer Kardiomyopathie beschrieben (Pauschinger et al. 1999).

Es ist bekannt, dass eine Ballondilatation zur Aktivierung adventitieller Fibroblasten und deren phänotypischer Modulation zu Myofibroblasten (α -Aktin-Expression) führt (Zalewski et al. 1997). Myofibroblasten besitzen kontraktile Proteine und Zelloberflächenrezeptoren, durch die sich diese Zellen reorganisieren und zur Kontraktur der ECM bei der kutanen Wundheilungsreaktion führen (Geary et al. 1998). Einen ähnlichen Mechanismus kann man auch für die arterielle Wundheilungsreaktion postulieren. Die 14 bis 28 Tage nach VEGF-Genstransfer bewirkte Reduktion der Myofibroblastendichte in der Adventitia könnte somit ein zusätzlicher Faktor sein, der die beobachtete Inhibition des negativen bzw. das positive Remodeling erklärt. Wie zuvor bereits erwähnt, ist die lokale inflammatorische Gewebsreaktion von Bedeutung für die Umstrukturierung der ECM (Entfernung von anfallenden ECM-Fragmenten) und für die Reparaturvorgänge nach Gewebstrauma. Wir beobachteten eine frühe inflammatorische Reaktion mit einer adventitiellen Makrophageninfiltration 24 Stunden nach Intervention in beiden Behandlungsgruppen. 7 Tage nach Intervention sahen wir einen Trend zur verstärkten Makrophageninfiltration in der Adventitia der VEGF-behandelten Gefäße, der einen Hinweis auf eine verstärkte Heilungsreaktion und beschleunigte Reparaturvorgänge nach balloninduzierter Gefäßverletzung in der VEGF-Gruppe gab. Diese Annahme wurde deutlicher in der lokalen adventitiellen T-Zell-vermittelten Reaktion. In den VEGF-behandelten Gefäßen setzte bereits 7 Tage nach Intervention eine verstärkte neoadventitielle T-Zell-Antwort mit einer drei- bis vierfach erhöhten T-Zellzahl im Vergleich zu den LacZ-behandelten Gefäßen ein, und diese hielt bis zu Tag 28 nach Intervention an. Es ist möglich, dass die Zunahme der neoadventitiellen Mikrogefäße in den VEGF-behandelten Gefäßen den Influx inflammatorischer Zellen steigert. Eine weitere Erklärung für die gesteigerte Abwehrreaktion könnte in der signifikanten Zunahme der mikrovaskulären Endothelzellen in der Neoadventitia VEGF-

behandelter Gefäße liegen: einerseits könnten aktivierte Endothelzellen durch eine Überexpression zellulärer Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selektin, vascular cell adhesion molecule [VCAM-1] oder intercellular adhesion molecule [ICAM-1]) zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten führen (Assiri et al. 2001), andererseits stellen T-Lymphozyten selbst einen Ort der VEGF-Produktion dar, so dass ein positiver Regelkreislauf von VEGF und T-Zellen zu einer verstärkten Neovaskularisation und zu einer beschleunigten Wundheilungsreaktion nach koronarer Intervention führen könnte. Es sollte in diesem Zusammenhang jedoch erwähnt werden, dass eine verstärkte inflammatorische Reaktion infolge einer lokalen VEGF-Gentherapie in anderen (pathologischen) Prozessen wie z.B. der chronisch progredienten Koronararteriosklerose, zu einer Destabilisierung der Erkrankung führen könnte (Plaquedestabilisierung mit der Folge eines akuten Koronarsyndroms). Es ist daher besonders zu betonen, dass sowohl das therapeutische Zeitfenster als auch der Zielort der Therapie (hier Adventitia und nicht Plaque/Intima-Media) entscheidend für den möglichen Benefit einer VEGF-Gentherapie sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der lokale VEGF₁₆₅-Gentransfer in das äußere Kompartiment von Koronararterien nach balloninduzierter Gefäßverletzung eine signifikante Reduktion des Lumenflächenverlustes (ca. 54 % Reduktion im Vergleich zu LacZ-Gen-behandelten Gefäßen) bewirkte. Diese war im Wesentlichen auf ein positives Gefäßremodeling (ca. 38 %ige Zunahme der Lamina elastica externa-Fläche) nach VEGF-Behandlung zurückzuführen. Die Prävention der adventitiellen Mikrogefäßregression, die Zunahme der adventitiellen Elastindichte, eine Reduktion der kontraktilen Myofibroblasten in der Neoadventitia sowie eine beschleunigte Arterienwundheilungsreaktion mit gesteigerter inflammatorischer Lokalreaktion in der Neoadventitia, scheinen die wesentlichen VEGF-vermittelten Mechanismen zu sein, die dem therapeutischen Erfolg des lokalen VEGF-Gentransfers in unserem experimentellen Modell zu Grunde liegen.

Originalarbeiten

- Deiner, C., Schwimmbeck, P.L., Koehler, I.S., Loddenkemper, C., Noutsias, M., Nikol, S., Schultheiss, H.-P., Yla-Herttuala, S., **Pels, K.** Adventitial VEGF165 gene transfer prevents lumen area loss through induction of positive remodeling and enhanced elastin accumulation after angioplasty in porcine coronary arteries. *Atherosclerosis*, 189(1):123-132, 2006.

2.4. Systemische Therapie der Koronaren Restenose

2.4.1 Thienopyridintherapie: Einfluss auf Proliferation/Inflammation

Restenosierung nach perkutaner koronarer Intervention (PCI) und thrombotische Komplikationen im Koronargefäßsystem sind die wesentlichsten klinischen Probleme in der interventionellen Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK). Die antithrombozytäre Begleitmedikation bei PCI, insbesondere nach intrakoronarer Brachytherapie und nach Implantation Medikamenten-freisetzender Stents zur Inhibierung der Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung nach interventionsbedingtem Trauma von Endothel und tieferer Gefäßwandschichten, gehören zur Standardtherapie der KHK. Dauer und Dosierung dieser antithrombozytären (meist dualen) Begleittherapie nach koronarer Intervention, nach akutem Koronarsyndrom, sowie auch zur Sekundärprophylaxe bei KHK sind Gegenstand aktueller kontroverser Diskussionen (Serebruany 2007). Es gibt Hinweise, dass die Thienopyridine neben ihrer antithrombozytären Wirkung in Analogie zu den Statinen sogenannte pleiotrope Effekte besitzen. So konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel die Expression inflammatorischer Marker (CRP und CD40-Ligand) nach PCI reduziert (Quinn et al. 2004, Holmes 2006). Abgesehen von den erwähnten Untersuchungen inflammatorischer Marker im Serum nach PCI gibt es keine Informationen über mögliche pleiotrope Wirkungen von Clopidogrel insbesondere im Langzeitverlauf nach PCI. Ziel dieser Untersuchungen war es daher der Frage nachzugehen, ob eine Thienopyridintherapie neben der antithrombotischen Wirkung auch systemische bzw. lokale Auswirkungen auf die inflammatorische und proliferative Reaktion der Gefäßwand nach koronarer Ballonangioplastie, sowie auch nach zusätzlicher antiproliferativer intrakoronarer Brachytherapie hat. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Langzeittherapie gegenüber einer kurzfristigen Therapie mit Thienopyridinen den Restenoseprozess nach koronarer Ballondilatation und auch nach zusätzlicher antiproliferativer intrakoronarer Brachytherapie beeinflusst. Hierzu wurden insgesamt 48 Schweine untersucht, bei denen jeweils randomisiert eine Koronararterie dilatiert und unmittelbar im Anschluss daran mit einer Betastrahlenquelle intrakoronar bestrahlt wurde, die zweite Koronararterie wurde nur dilatiert (Kontrolle) und die dritte Koronararterie

blieb undilatiert und unbestrahlt und diente als weitere Kontrolle. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden vor und nach PCI Blutproben entnommen und bei 27 Tieren 3 Monate nach PCI eine Sektion zur Untersuchung der Koronararterien durchgeführt. Alle Tiere erhielten bis zu einem Nachbeobachtungszeitraum von einem Monat eine duale Therapie mit 325 mg/die Aspirin und 75 mg/die Clopidogrel (Ladungsdosis von 300 mg am Tag vor der Intervention). In der Gruppe der Tiere mit einer Langzeitnachbeobachtung von 3 Monaten erhielten 12 Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum 325 mg/die Aspirin und 75 mg/die Clopidogrel (Ladungsdosis von 300 mg am Tag vor der Intervention), während 12 weitere Tiere 3 Monate 325 mg/die Aspirin und nur einen Monat 75 mg/die Clopidogrel (ebenfalls Ladungsdosis von 300 mg am Tag vor der Intervention) erhielten. Um die Wirkung der verlängerten Behandlung mit Clopidogrel nach ICBT auf die im Plasma zirkulierenden CRP-Konzentrationen zu untersuchen, wurde den Tieren vor und sofort nach Beendigung der Koronarintervention, sowie vierzehn Tage, einen und drei Monate nach PCI Blut zur Gewinnung von Plasma abgenommen. Die darin enthaltenen CRP-Konzentrationen wurden mittels ELISA quantifiziert. Es zeigte sich unmittelbar nach der Intervention ein signifikanter Anstieg der CRP-Konzentrationen im Plasma (Abbildung 28A). Im Weiteren Verlauf fielen die CRP-Konzentrationen wieder ab und waren signifikant niedriger, wenn die Therapie mit Clopidogrel für die Dauer von drei Monaten im Vergleich zu einem Monat nach PCI mit Ballondilatation und intrakoronarer Strahlentherapie durchgeführt wurde (Abbildung 28B). Diese Daten zeigen erstmalig, dass nicht nur eine kurzzeitige Inhibition der inflammatorischen Reaktion durch Clopidogrelgabe beobachtet werden kann, sondern eine Langzeitbehandlung mit Clopidogrel zu einer lang anhaltenden Hemmung der systemischen Entzündungsreaktion nach Ballondilatation und antiproliferativer Strahlentherapie führt. Diese systemische „pleiotrope“ Wirkung der antithrombotischen Therapie mit Clopidogrel könnte ein Mechanismus für die unter Langzeittherapie mit Clopidogrel beobachtete Verbesserung der klinischen Prognose nach Koronarintervention (Steinhubl et al. 2002, Chen et al. 2005) sein.

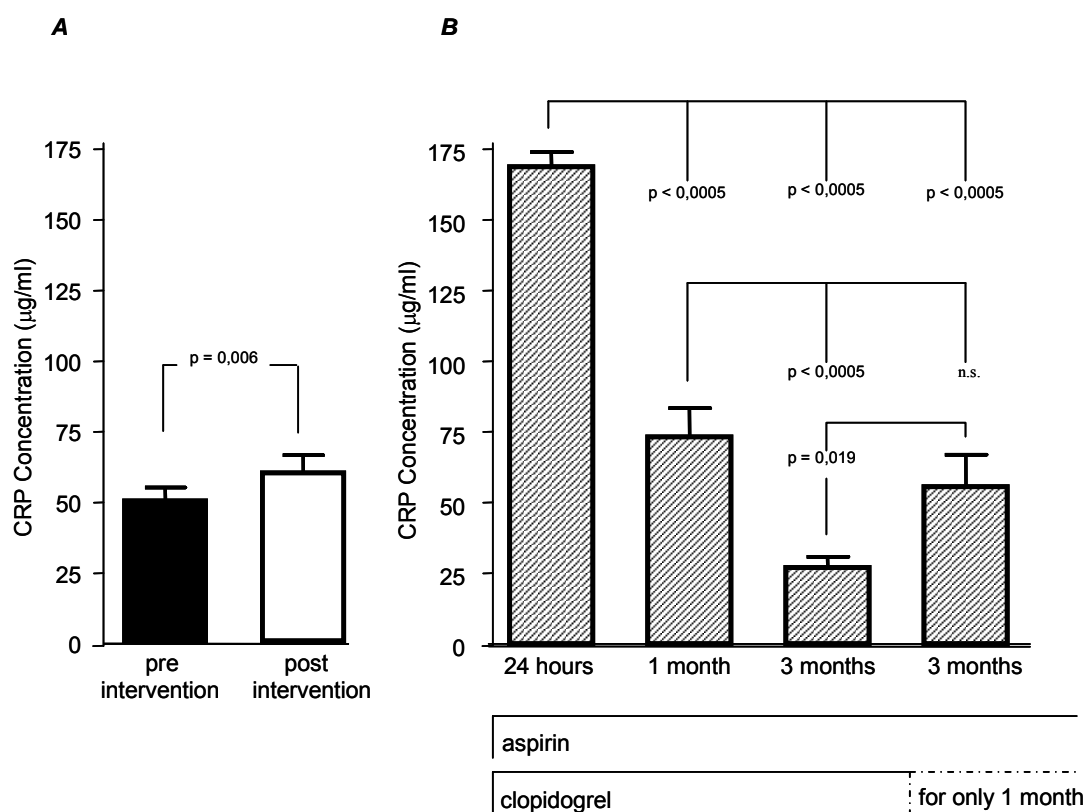


Abb. 28 A Die CRP-Konzentrationen vor und unmittelbar nach der Koronarintervention. Unmittelbar nach der Intervention zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CRP-Konzentrationen im Plasma. **B** CRP-Konzentrationen 24 Stunden, ein und drei Monate nach der Koronarintervention. Die CRP-Konzentrationen waren signifikant niedriger, wenn Clopidogrel für die Dauer von drei Monaten im Vergleich zu einem Monat nach der Koronarintervention appliziert wurde

In dem zweiten Teil unserer Experimente untersuchten wir den Einfluss der Langzeitclopidogrelgabe über 3 Monate im Vergleich zu einer Kurzzeitgabe über einen Monat auf die pathophysiologische Reaktion der Gefäßwand von Koronararterien nach Ballondilatation oder kombinierter Ballondilatation und intrakoronarer Bestrahlung. Wie zuvor beschrieben erhielten alle Tiere über den gesamten Zeitraum von 3 Monaten eine Dauertherapie mit Aspirin. Als Strahlenquelle verwendeten wir einen β -Strahlen emittierenden $^{90}\text{Sr}/\text{Y}$ -40 mm Zug mit einer Applikation von 19,9 - 22,2 Gray bis zu einer Tiefe von 2 mm.

Die Zellproliferationsanalyse mittels Bromodeoxyuridin-Immunhistochemie der Intima/Media und Adventitia nach Ballondilatation (PTCA) und kombinierter Ballondilatation mit anschließender Bestrahlung (Brachy) der Schweinekoronararterien zeigte auch noch 3 Monate nach PCI eine

Zellproliferation, die wie zu erwarten nach antiproliferativer Bestrahlung der Gefäße deutlich geringer ausgeprägt war als nach alleiniger Ballondilatation (Abbildung 29). Die Mehrzahl der proliferierenden Zellen fand sich in der Intima+Media. In beiden Interventionsarmen (PTCA und Brachy) zeigte sich eine signifikant geringere Zellproliferation der Koronargefäße nach 3 Monaten Clopidogrelgabe (LT Clopi) im Vergleich zu der einmonatigen Clopidogrelgabe (ST Clopi).

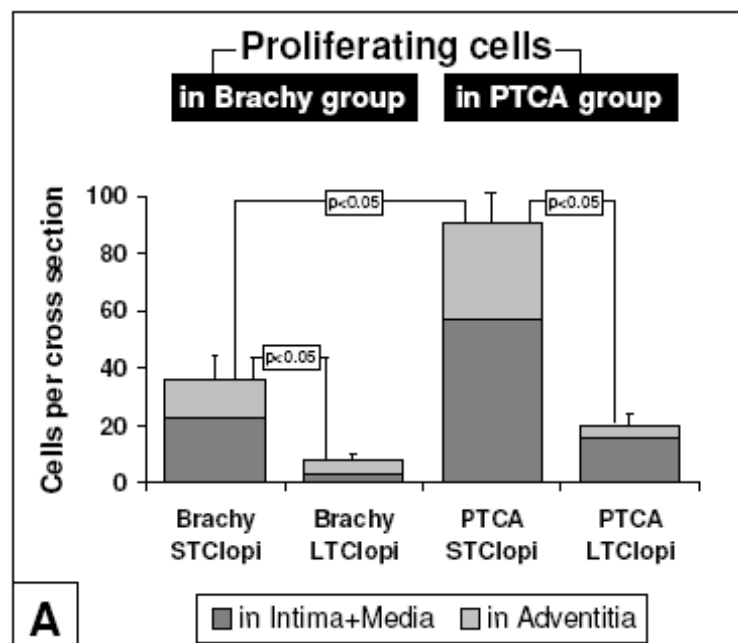


Abb. 29 Zellproliferation in Intima+Media und Adventitia von ballondilatierten (PTCA) oder ballondilatierten und bestrahlten (Brachy) Koronargefäßen von Schweinen nach dreimonatiger (LTClopi) oder einmonatiger (STClopi) Clopidogrel-Therapie. Die dreimonatige Clopidogrelgabe verringert gegenüber der einmonatigen Therapie signifikant die Zellproliferation sowohl nach PTCA als auch nach Brachytherapie

Zur Untersuchung der inflammatorischen Gefäßwandreaktion wurde eine immunhistochemische Färbung von T-Lymphozyten (CD3-positive Zellen) der Koronararterien durchgeführt. T-Lymphozyten wurden 3 Monate nach PCI überwiegend in der Adventitia der Gefäßwand gefunden (Abbildung 30). Sowohl nach Langzeitclopidogrel-Therapie über 3 Monate als auch nach der Kurzzeitgabe über einen Monat zeigte sich nach Ballondilatation und Bestrahlung (Brachy) eine signifikant ausgeprägtere T-Zellinfiltration als nach

alleiniger Ballondilatation (PTCA). In beiden Interventionsgruppen führte die Langzeitclopidogrelgabe (LTClopi) über den gesamten Beobachtungszeitraum gegenüber einer einmonatigen Kurzzeit-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der T-Zellinfiltration. Die T-Zellzahl in den ballondilatierten Gefäßen befand sich nach Langzeitclopidogrel-Therapie im Bereich der Werte nicht intervenierter Kontrollgefäße, während trotz Langzeitclopidogrel-Therapie in den ballondilatierten und bestrahlten Koronargefäßen die T-Zellzahl weiterhin gegenüber unbehandelten Kontrollgefäßen erhöht war.

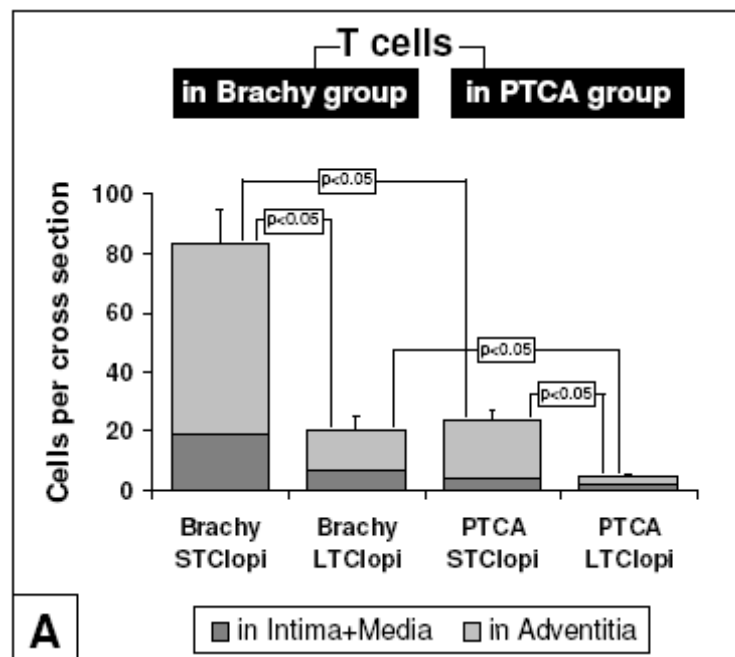


Abb. 30 T-Zellinfiltration in Intima+Media und Adventitia von ballondilatierten (PTCA) oder ballondilatierten und bestrahlten (Brachy) Koronargefäßen von Schweinen nach dreimonatiger (LTClopi) oder einmonatiger (STClopi) Clopidogrel-Therapie. Die dreimonatige Clopidogrelgabe verringert gegenüber der einmonatigen Therapie signifikant die T-Zellinfiltration insbesondere in der Adventitia nach PTCA als auch nach Brachytherapie

Zur Untersuchung der molekularen Regulationsmechanismen, die den zuvor geschilderten, durch eine Langzeitclopidogrel-Therapie induzierten zellulären Veränderungen auf Proliferations- und Inflammationsebene zugrunde liegen könnten, analysierten wir mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) die Aktivität von NF-κB in den Koronargefäßen.

Wie im Abschnitt 2.1.3 ausführlich dargestellt, nimmt die NF-κB-Aktivität

unmittelbar nach PCI (sowohl nach alleiniger Ballondilatation als auch nach Ballondilatation und intrakoronarer Strahlen-Therapie) zu und bleibt bis zu 28 Tagen nach der Intervention nachweisbar, wobei sie in den kombiniert ballondilatierten/bestrahlten (Brachy) Gefäßen höher ist als in den nur ballondilatierten (PTCA) Koronargefäßen. Diese Erhöhung in den Brachy-Gefäßen gegenüber den PTCA-Gefäßen zeigt sich auch noch 3 Monate nach Intervention (Abbildung 31A). In beiden Interventionsarmen führt die Langzeitgabe von Clopidogrel (LTClopi) gegenüber der Kurzzeitgabe (STClopi) zu einer signifikanten Reduktion der koronaren NF-κB-Aktivität (62%ige Reduktion nach Brachy-Therapie und 64%ige nach PTCA; Abbildung 31B).

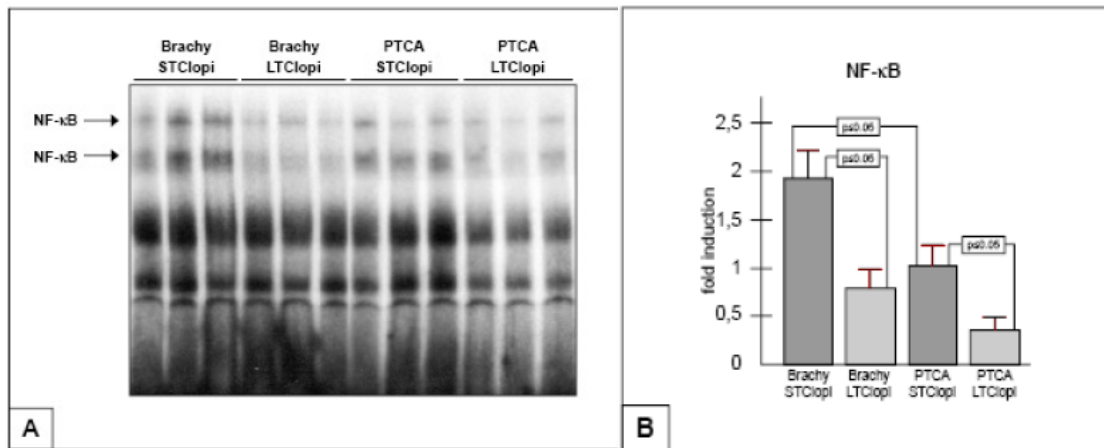


Abb. 31 A EMSA für die NF-κB-Aktivität in ballondilatierten (PTCA) oder ballondilatierten und bestrahlten (Brachy) Koronargefäßen nach dreimonatiger (LTClopi) oder einmonatiger (STClopi) Clopidogrel-Therapie. **B** NF-κB war nach Brachy-Therapie signifikant stärker aktiviert als nach PTCA, in beiden Interventionsarmen (PTCA und Brachy) wurde die auch noch 3 Monate nach Intervention gesteigerte NF-κB-Aktivität durch eine Langzeitclopidogrelgabe signifikant reduziert

Zusammengefaßt, zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die Langzeittherapie mit Clopidogrel die Proliferation und Inflammation in der Koronararterienwand nach PCI signifikant reduziert. Sowohl auf zellulärer wie auch auf molekularer Ebene konnte dies für Koronargefäße nach PTCA und auch nach PTCA in Kombination mit antiproliferativ wirksamer intrakoronarer Bestrahlung gezeigt werden. Die Daten sind insofern von besonderer klinischer Bedeutung, als dass bis heute strittig ist, wie lange Clopidogrel nach Intervention

gegeben werden sollte und die Ergebnisse der Charismastudie keinen Benefit für eine duale Langzeit-Therapie von Aspirin in Kombination mit Clopidogrel zur Primärprevention zeigten, im Gegenteil wurde in der Gruppe der Patienten ohne Vorliegen einer kardiovaskulären Erkrankung aber mit kardiovaskulären Risikofaktoren eine erhöhte Mortalität nach dualer Langzeit-Therapie mit Aspirin und Clopidogrel dokumentiert (Bhatt et al. 2006, Wang et al. 2007). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Langzeittherapie mit Clopidogrel keinen Effekt auf die T-Zellinfiltration der Gefäßwand unbeschädigter Koronargefäße hat und nur die Zellproliferation (mutmasslich α -actin-positive glatte Muskelzellen und Myofibroblasten in Intima+Media) dieser Gefäße nach Langzeitclopidogrel-Therapie abnimmt (was bei geringgradigen Plaques, wie sie bei asymptomatischen Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zu finden sind, zu einer Plaquedestabilisierung führen kann). Diese immunhistologischen Ergebnisse könnten somit ein pathophysiologisches Korrelat für die beschriebenen klinischen Beobachtungen sein. Darüber hinaus hat die Charismastudie aber für Patienten mit vorbekanntem kardiovaskulärem Schaden einen Benefit im Sinne reduzierter Gesamtereignisse (Kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Hospitalisierung) nach Langzeitclopidogrelgabe gezeigt. Unsere Daten unterstützen diese klinischen Ergebnisse, und suggerieren darüber hinaus, dass insbesondere nach antiproliferativer Therapie mittels intrakoronarer Bestrahlung (möglicherweise trifft dies auch auf die vom Mechanismus ähnliche Therapie mit den antiproliferativ wirksamen Medikamenten freisetztenden Stents zu) eine Langzeit-Therapie mit Clopidogrel vorteilhaft ist, da auch noch nach dreimonatigem Beobachtungszeitraum post Intervention eine inflammatorische Aktivität in der Koronararterienwand (trotz der Reduktion durch Clopidogrel) nachweisbar war.

Originalarbeiten

- Ayral Y, Rauch U, Goldin-Lang P, Stellbaum C, Deiner C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, **Pels K**. Prolonged application of clopidogrel reduces inflammatory reactions after percutaneous coronary intervention in the porcine model. *Cardiovasc. Revasc. Med.*, 8(3) 183-88, 2007.
- [**Pels K**, Schwimmbeck PL, Rosenthal P, Loddenkemper C, Rauch U, Pauschinger M, Dietz R, Schultheiss HP, Dechend R, Deiner C. Long-term clopidogrel administration following percutaneous coronary intervention reduces proliferation and inflammation in porcine coronary lesions via inhibition of NF- κ B and AP-1 activation. In Vorbereitung 2007.]

2.4.2 Thienopyridintherapie: Einfluss auf Thrombenbildung

Die Ballondilatation in Kombination mit intrakoronarer Bestrahlung ist ein anti-proliferatives Behandlungsverfahren, welches im Rahmen der interventionellen Therapie von In-Stent-Rezidivstenosen bei Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit eingesetzt wird. Ein großer Nachteil der intrakoronaren Strahlentherapie war das Auftreten von thrombotischen Spätkomplikationen in der bestrahlten Koronararterie, die in bis zu 8% der Fälle innerhalb von 3 Monaten nach der Brachytherapie auftraten. Das späte Auftreten von Koronarthrombosen begründet auch die erhöhte Mortalität nach Anwendung von neueren anti-proliferativen Behandlungsverfahren zur Behandlung der KHK, nämlich der Implantation von Chemotherapeutika freisetzenden Stents. Dass es nach Anwendung von ionisierenden Strahlen zur erhöhten Thrombogenität in Blut und Gewebe und zu einer Aktivierung des Tissue Faktor (TF) abhängigen Koagulationssystems mit Thrombosen in den jeweils bestrahlten Organen kommen kann, ist seit vielen Jahren bekannt. Die hier beschriebenen Untersuchungen dienen zur Erforschung der Induktion und der Expression von gerinnungsaktiven Proteinen im Blut und in der Gefäßwand nach Anwendung von ionisierender β -Bestrahlung. Ferner sollte eine mögliche therapeutische Nutzbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse zur Prävention von o.g. interventions-assoziierten Komplikationen ergründet werden. Ziel war die Wirkung der intrakoronaren Brachytherapie auf die TF-Expression und Prokoagulabilität der Gefäßwand im Tiermodell zu erforschen und die Bedeutung der Dauer der antithrombotischen Begleittherapie mit Clopidogrel für die vaskuläre TF- Expression und die Prokoagulabilität des Blutes zu erfassen.

Im Schweinmodell wurde bei allen untersuchten Tieren eine PTCA in zwei der drei Koronararterien durchgeführt. Nach Randomisierung erfolgte die sofortige Bestrahlung einer der verletzten Koronararterien durch eine β -Strahlen emittierende Quelle (siehe hierzu Abschnitt 2.41). Die dritte Koronararterie verblieb ohne Intervention und diente als Kontrollgefäß. Alle Tiere erhielten Aspirin (325 mg pro Tag) sowie Clopidogrel in einer Sättigungsdosis von 300 mg am Vortag der Intervention, gefolgt von einer Erhaltungsdosis von 75 mg pro Tag für die Dauer von einem Monat. Die unterschiedlich behandelten Koronararterien wurden 24 Stunden, vierzehn Tage sowie einen und drei

Monate nach der Intervention entnommen und entsprechend für die immunhistochemische Untersuchung (jeweils n = 6 Tiere pro Gruppe) sowie für die Analyse der vaskulären TF-Expression (ebenfalls jeweils n = 6 Tiere pro Gruppe) präpariert. Um die Bedeutung der Dauer der antithrombotischen Begleittherapie mit Clopidogrel für die koronare TF- Expression zu erfassen, wurden in einer zweiten Gruppe (n = 6) die Clopidogrelgaben für die Dauer von drei Monaten fortgeführt.

Um die Wirkung der verlängerten Behandlung mit Clopidogrel nach Ballondilatation und intrakoronarer Strahlen-Therapie auf die im Plasma zirkulierenden TF-Konzentrationen zu untersuchen, wurde den Tieren vor und sofort nach Beendigung der Intervention, sowie vierzehn Tage, einen und drei Monate nach der Koronarintervention Blut zur Gewinnung von Plasma abgenommen. Die darin enthaltenen TF-Konzentrationen wurden mittels ELISA quantifiziert. Unmittelbar nach der Koronarintervention fand sich eine Reduktion der TF-Konzentrationen im zirkulierenden Blut, was auf einen Verbrauch von prokoagulativen TF im Rahmen der Intervention hinweisen könnte (Abbildung 32A). Im Weiteren Verlauf ergab sich ein über die Zeit kontinuierlicher Anstieg der TF-Proteinkonzentration im Plasma. Eine Reduktion der TF-Konzentration im Blut war tendenziell zu beobachten, wenn Clopidogrel für die Dauer von drei Monaten im Vergleich zu einem Monat appliziert wurde.

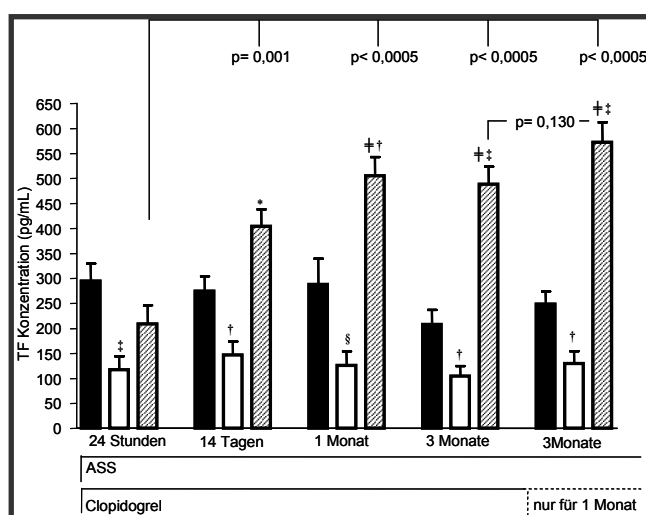


Abb. 32 TF-Konzentrationen im zirkulierenden Blut (n = 12 für jeden Zeitpunkt). Vor Intervention (schwarze Box), unmittelbar (weiße Box) und 24 Stunden, ein Monat und drei Monate nach der Intervention (gestreifte Box). ‡ p < 0.001, † p < 0.01, § p < 0.05 vs. vor Intervention. ‡† p < 0.001 vs. unmittelbar nach Intervention

Die quantitative Auswertung der TF-Färbung der Koronargefäße zeigte, dass die alleinige PTCA als auch die PTCA und intrakoronare Strahlentherapie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgefäßen zu einer verstärkten TF-Protein-Expression in Intima und Media führte. 14 Tage sowie einen Monat nach PTCA und Strahlentherapie war die TF-Expression in Intima und Media nach kombinierter PTCA/Strahlentherapie signifikant gegenüber den allein dilatierten Gefäßen erhöht. Im Vergleich zur einmonatigen Gabe reduzierte die dreimonatige Behandlung mit Clopidogrel die TF-Expression nach PTCA und Strahlentherapie signifikant, sowie - im Trend – auch nach alleiniger PTCA (Abbildung 33 links; $p = 0.075$). Die Auswertung der koronaren Fibrinogen-Färbung ergab, dass die intrakoronare Strahlentherapie zu einer vermehrten koronaren Fibrinogen-Expression im Vergleich zur alleinigen PTCA führt. Es findet sich kein Einfluss der längerfristigen Clopidogrelgabe auf die Fibrinogen-Expression nach Ballondilatation und intrakoronarer Strahlentherapie (Abbildung 33 rechts).

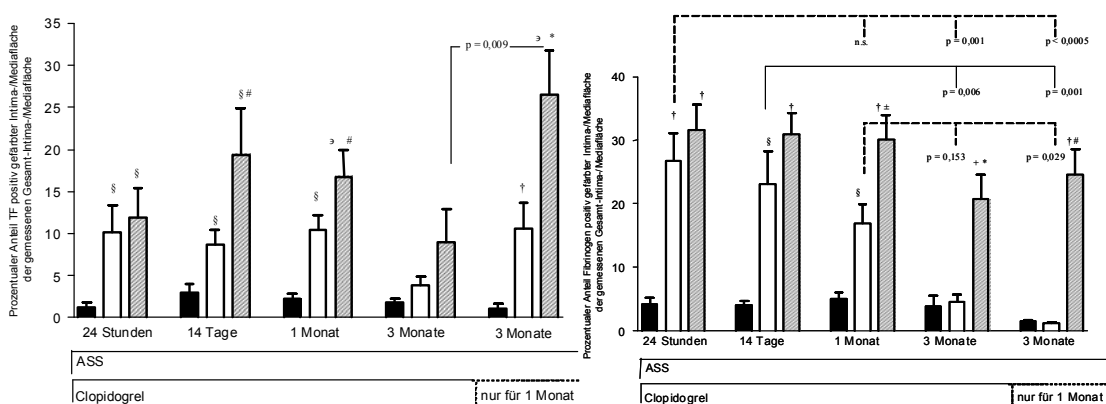


Abb. 33 Immunhistochemische Quantifizierungen der koronaren TF-Färbung (linke Abb.) und Fibrin/Fibrinogen-Färbung (rechte Abb.; $n = 6$ für jeden Zeitpunkt). Kontrollgefäße (schwarze Box), Koronargefäße nach alleiniger PTCA (weiße Box) und nach PTCA sowie intrakoronarer Strahlentherapie (gestreifte Box). Linke Abb.: † $p \leq 0.04$, § $p \leq 0.03$, + $p \leq 0.01$ vs. Kontrollgefäße. * $p = 0.03$, # $p = 0.072$ vs. alleinige PTCA. Rechte Abb.: † $p \leq 0.005$, § $p \leq 0.05$, + $p \leq 0.01$ vs. Kontrollen. ± $p = 0.015$, * $p = 0.004$, # $p = 0.002$ vs. alleinige PTCA

Die Quantifizierung der koronaren TF-mRNA bestätigten die Ergebnisse der immunhistomorphometrischen TF-Proteinanalyse. Nach PTCA und intrakoronarer Bestrahlung reduziert die dreimonatige Behandlung mit Clopidogrel die TF-Expression im Vergleich zur einmonatigen Gabe.

Ratio pTF/pGAPDH (*10 ⁻³ ± SEM)	1 Tag (ASS+ Clopidogrel)	14 Tage (ASS+ Clopidogrel)	1 Monat (ASS+ Clopidogrel)	3 Monate (ASS+ Clopidogrel)	3 Monate (ASS+ 1 Mo. Clopidogrel)
Kontrolle	0.2300 ± 0.1099	0.2331 ± 0.0682	0.2340 ± 0.0266	0.2017 ± 0.0492	0.2150 ± 0.0902
PTCA	0.2005 ± 0.0326	0.6912 ± 0.0460 [§]	0.5572 ± 0.0657 [§]	0.3353 ± 0.0788 [†]	0.4567 ± 0.0535 [†]
PTCA + ICBT	0.2132 ± 0.0260	0.4862 ± 0.0916 [‡]	0.5425 ± 0.0645 [§]	0.3501 ± 0.0519 [§]	0.7073 ± 0.0436 ^{*§}

Abb. 34 Quantifizierung der koronaren TF-mRNA (Ratio pTF/pGAPDH) per RT-PCR (n = 6 für jeden Zeitpunkt). PTCA und PTCA + Bestrahlung versus Kontrolle: † p ≤ 0.05, § p ≤ 0.01, ‡ p = 0.131

Zusammengefaßt zeigen unsere Ergebnisse, dass die antiproliferative intrakoronare Bestrahlung zu einer erhöhten koronaren Thrombogenität gegenüber der alleinigen PTCA führt, und dass diese erhöhte Thrombogenität auch noch nach 3 Monaten post Intervention nachweisbar ist, was eine mögliche Erklärung für die klinisch beobachteten Spätthrombosen nach PTCA und intrakoronarer Strahlentherapie ist. Die Langzeit-Therapie mit Clopidogrel kann diese Thrombogenität zumindest auf der Ebene der TF-Expression langanhaltend reduzieren. Wenngleich diese experimentellen Daten eine Langzeittherapie mit Clopidogrel insbesondere nach PTCA in Kombination mit intrakoronarer Strahlentherapie nahe legen, ist es schwierig konkrete Zeitempfehlungen daraus abzuleiten. Extrapoliert man die Daten aus dem Schweinemodell (Restenoseprozesse spielen sich in diesem Modell im Wesentlichen in den ersten 14 Tagen nach Intervention ab, während bei Menschen ein Zeitraum von ca. 6 Monaten angenommen wird), so wäre eine Clopidogreltherapie von mindestens 36 Monaten sinnvoll. Aus aktueller klinischer Bedeutung, bliebe darüber hinaus zu klären, ob trotz der pathophysiologischen Parallelen zwischen antiproliferativer Strahlentherapie und antiproliferativ wirksamer Medikamente freisetztende Stents, unsere Schlussfolgerungen auch auf die zuletzt genannten Stents übertragbar sind.

Originalarbeiten

- Ayrat Y, Rauch U, Goldin-Lang P, Stellbaum C, Deiner C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, **Pels K**. Prolonged application of clopidogrel reduces inflammatory reactions after percutaneous coronary intervention in the porcine model. *Cardiovasc. Revasc. Med.*, 8(3) 183-88, 2007.
- [Rauch U, Ayrat Y, Goldin-Lang P, Deiner C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, **Pels K**. Prolonged antithrombotic treatment with clopidogrel after intracoronary brachytherapy is associated with reduced coronary tissue factor and fibrinogen expression. In Vorbereitung 2007.]

3. Zusammenfassung

Seit Einführung der perkutanen transluminalen Ballonangioplastie (PTCA) stellt die koronare Restenose ein Hauptproblem in der interventionellen Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) dar. In den Anfängen der interventionellen Therapie der KHK richtete sich das Augenmerk der Forschung primär auf den Pathomechanismus der Neointimaformation und hierbei konzentrierte man sich im Wesentlichen auf die Untersuchung der Gefäßwandschichten von Intima und Media. Die zweite wesentliche pathogenetische Säule bei der Entstehung der koronaren Restenose, das arterielle Remodeling, war wenig verstanden und Schwerpunkt meiner ersten Studien. Zur Untersuchung der das Remodeling mitbestimmenden morphometrische Faktoren und des zeitlichen Ablaufes etablierte ich mit meinen Kollegen Edward O'Brien und Marino Labinaz als erste Arbeitsgruppe das Schweineangioplastiemodel der „double injury“. Es konnte gezeigt werden, dass der Lumenverlust nach einfacher koronarer Ballondilatation zu 2/3 auf negatives Remodeling zurückzuführen ist. Hierbei scheint der Adventitia, deren Zunahme dem negativen Remodeling vorausgeht, eine besondere Bedeutung zuzukommen. Wir konnten zeigen, dass das negative Remodeling und der resultierende Lumenverlust zwischen Tag 3 und 14 nach Intervention stattfindet. Während dieses Zeitintervalls fand eine Kollagenablagerung und Ansammlung alpha-actin-positiver Zellen in der Neoadventitia statt, so dass davon auszugehen ist, dass diese strukturellen Gefäßwandveränderungen eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese des arteriellen Remodeling spielen. In weiteren Studien konnten wir erstmalig zeigen, dass nach Ballondilatation eine positive Korrelation zwischen Lumenfläche und adventitieller Mikrogefäßdichte besteht und die Mikrogefäßregression eine funktionelle Komponente der Arterienwandkontraktur und des negativen Remodelings nach Ballondilatation zu sein scheint. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Arterienwundheilung sich wie eine Sonderform der klassischen Hautwundheilung verhält.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse waren die Grundlage für weitere Experimente, die der Hypothese, dass die adventitielle Mikrogefäßregression nach koronarer Ballondilatation ein wesentlicher pathogenetischer Faktor des negativen Gefäßwandremodelings ist, nachgingen. In diesen Experimenten

konnte gezeigt werden, dass lokaler VEGF₁₆₅ –Gentransfer in das äußere Kompartiment von Koronararterien nach balloninduzierter Gefäßverletzung eine signifikante Reduktion des Lumenflächenverlustes bewirkte. Die Inhibition des Lumenflächenverlustes war hauptsächlich auf die Induktion von positivem Gefäßremodeling durch die VEGF-Behandlung zurückzuführen. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Prävention der adventitiellen Mikrogefäßregression, die Zunahme der adventitiellen Elastindichte, eine Reduktion der kontraktilen Myofibroblasten in der Neoadventitia sowie eine beschleunigte Arterienwundheilungsreaktion mit gesteigerter inflammatorischer Lokalreaktion in der Neoadventitia die wesentlichen VEGF-vermittelten Mechanismen darstellen, die dem therapeutischen Erfolg des lokalen VEGF-Gentransfers in unserem experimentellen Modell zu Grunde lagen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass der lokale (peri)adventitelle VEGF₁₆₅-Gentransfer in unserem Modell der balloninduzierten koronaren Läsionsbildung zu keinen unerwünschten Nebenwirkungen (Läsionsakzeleration) geführt hat, weder die Intima+Media-Läsionsvaskularisierung noch die Intima+Media-Läsionsfläche nahm in den VEGF-behandelten Gefäßen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu.

Die Weiterentwicklung der Therapie der koronaren Restenose mit neuen interventionellen Verfahren (antiproliferative intrakoronare Strahlentherapie, Einsatz antiproliferativ wirksamer Medikamente freisetzender Stents) half die Restenoserate nach koronarer Intervention zu reduzieren, brachte aber gleichzeitig neue Probleme mit sich (veränderte/verzögerte Wundheilungsreaktion der Arterienwand, Auftreten von Spätthrombosen). Wir konnten in tierexperimentellen Versuchen zeigen, dass in einer frühen Phase nach intrakoronarer Bestrahlung ein ausgeprägter Adventitiawachstum stattfindet, der ein Trigger für das von uns gezeigte spät einsetzende negative Remodeling und die späte Neointimaformation sein könnte und möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des späten Lumenverlustes nach lokaler antiproliferativer Strahlentherapie spielt. Wir dokumentierten, dass nach Strahlentherapie nur eine initiale, jedoch nicht länger anhaltende Proliferationsinhibition zu beobachten ist und eine protrahierte späte Inflammation induziert wird. Der späte Lumenverlust war hauptsächlich durch negatives arterielles Remodeling bedingt, und hierbei scheint, wie auch

für die beschriebene protrahierte Inflammationsreaktion, eine NFκB- und AP-1-Aktivierung von zentraler Bedeutung zu sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die antiproliferative intrakoronare Bestrahlung zu einer erhöhten koronaren Thrombogenität gegenüber der alleinigen PTCA führt, und dass diese erhöhte Thrombogenität auch noch nach 3 Monaten post Intervention nachweisbar ist, was eine mögliche Erklärung für die klinisch beobachteten Spätthrombosen nach PTCA und antiproliferativer intrakoronarer Strahlentherapie ist. Eine systemische Langzeittherapie mit dem Thienopyridin Clopidogrel konnte diese Thrombogenität zumindest auf der Ebene der Tissue Factor-Expression anhaltend reduzieren. Interessanterweise beschränkte sich die Wirkung der Clopidogrellangzeittherapie aber nicht nur auf die Beeinflussung der Thrombogenität, sondern bewirkte zusätzlich eine Reduktion, der durch die Strahlentherapie induzierten Inflammation in der Koronararterienwand und auch eine Inhibition der Zellproliferation zu einem späten Zeitpunkt nach PCI, zu dem die antiproliferative Wirkung der Strahlentherapie, nicht mehr anhält. Die Versuche konnten bestätigen, dass die pathophysiologischen Prozesse nach PTCA und intrakoronarer Strahlentherapie durch NFκB- und AP-1 mitreguliert werden, da die Aktivität beider Transkriptionsfaktoren durch die Langzeittherapie mit Clopidogrel reduziert wurde.

Die dargestellten Ergebnisse liefern wesentliche Einsichten in die Pathophysiologie und Therapieoptionen für die Behandlung der koronaren Restenose. Weitere Studien sind erforderlich, um die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf die aktuell in ca. 50% aller koronaren Interventionen in Deutschland eingesetzten Medikamente freisetzenden Stents zu untersuchen und eine individualisiertere lokale Therapie, sowie das Festlegen genauerer Zeitfenster für den Einsatz medikamentöser Begleithérapien in der Behandlung der koronaren Restenose zu ermöglichen.

4. Literatur

- Abid MR, Yano K, Guo S, Patel VI, Shrikhande G, Spokes K.C., Ferran C., Aird W.C. 2005. Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *J Biol Chem* 19(280):29864-73.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J. & Keshet, E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat.Med.* 1: 1024-1028.
- Andersen, H. R., Maeng, M., Thorwest, M. & Falk, E. 1996. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation* 93: 1716-1724.
- Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., Kearney, M., Rossow, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F. & Isner, J. M. 1995. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 91: 2793-2801.
- Assiri, A., Veinot, J. P., Woodend, K., Kimura, T., Nobuyoshi, M., Schwartz, S. M. & O'Brien, E. R. 2001. Abundance of plaque microvessels is associated with constrictive remodeling in angioplastied human coronary arteries. *Jpn.Circ.J.* 65: 429-433.
- Ausprunk, D. H. & Folkman, J. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc.Res.* 14: 53-65.
- Axel, D. I., Kunert, W., Goggelmann, C., Oberhoff, M., Herdeg, C., Kuttner, A., Wild, D. H., Brehm, B. R., Riessen, R., Koveker, G. & Karsch, K. R. 1997. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 96: 636-645.
- Barger, A. C., Beeuwkes, R., III, Lainey, L. L. & Silverman, K. J. 1984. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N.Engl.J.Med.* 19;310: 175-177.
- Barker, S. G., Talbert, A., Cottam, S., Baskerville, P. A. & Martin, J. F. 1993. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arterioscler.Thromb.* 13: 70-77.
- Bayes-Genis A., Kantor B., Keelan P.C., Altman J.D., Lubbe, D.F., Kang, J.H., Schwarz, R.S. 2000. Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Curr Interv Cardiol Rep* 2(4): 303-8.
- Bhardwaj, S., Roy, H., Gruchala, M., Viita, H., Kholova, I., Kokina, I., Achen, M. G., Stackner, S. A., Hedman, M., Alitalo, K. & Yla-Herttuala, S. 2003. Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Hum.Gene Ther.* 14: 1451-1462.
- Bhatt, D.L., Fox, K.A., Hacke, W., Berger, P.B., Black, H.R., Boden, W.E., Cacoub, P., Cohen, E.A., Creager, M.A., Easton, J.D., Flather, M.D., Haffner, S.M., Hamm, C.W., Hankey, G.J., Johnston, S.C., Mak, K.H., Mas, J.L., Montalescot, G., Pearson, T.A., Steg, P.G., Steinhubl, S.R., Weber, M.A., Brennan, D.M., Fabry-Ribaudo, L., Booth, J., Topol, E.J.; CHARISMA Investigators. 2006. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 354(16):1706-17.
- Birgelen von, C., Mintz, G. S., de Vrey, E. A. & et al. 1998. Atherosclerotic coronary lesions with inadequate compensatory enlargement have smaller plaque and vessel volumes: observations with three dimensional intravascular ultrasound in vivo. *Heart* 79: 137-142.
- Block, P. C. 1990. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty - anatomic and pathophysiological mechanisms: strategies for prevention. *Circulation* 81(Suppl.IV): IV-2-IV-4.
- Burke, A. P., Kolodgie, F. D., Farb, A., Weber, D. & Virmani, R. 2002. Morphological predictors

- of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation* 105: 297-303.
- Califf, R. M., Fortin, D. F., Frid, D. J., Harlan, W. R., III, Ohman, E. M., Bengtson, J. R., Nelson, C. L., Tchong, J. E., Mark, D. B. & Stack, R. S. 1991. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J.Am.Coll.Cardiol.* 17: 2B-13B.
- Casscells, W., Engler, D. & Willerson, J. 1994. Mechanisms of restenosis. *Texas Heart Inst.J.* 21: 68-77.
- Celletti F L, Waugh J M, Amabile P G, Brendolan A, Hilfiker P R, Dake M D. 2001A. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat.Med.* 7: 425-429.
- Celletti, F. L., Hilfiker, P. R., Ghafouri, P. & Dake, M. D. 2001B. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37: 2126-2130.
- Chen, Z.M., Jiang, L.X., Chen, Y.P., Xie, J.X., Pan, H.C., Peto, R., Collins, R., Liu, L.S.; COMMIT (CLOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. 2005. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 366(9497):1607-21.
- Costa M.A., Sabat M., van der Giessen W.J., Kay I.P., Cervinka P., Ligthart J.M., Serrano P., Coen V.L., Levendag P.C., Serruys P.W. 1999. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation.* 100:789-792.
- Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63: 21-29.
- Darland, D. C., Massingham, L. J., Smith, S. R., Piek, E., Saint-Geniez, M. & D'Amore, P. A. 2003. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev.Biol.* 264: 275-288.
- Davies, M. J. 1998. Coronary artery remodelling and the assessment of stenosis by pathologists. *Histopathology* 33: 497-500.
- De Martin, R., Hoeth, M., Hofer-Warbinek, R. & Schmid, J. A. 2000. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20: E83-E88.
- Doornekamp, F. N. G., Post, M. J. & Borst, C. 1995. Influence of presence or absence of medial necrosis on endothelial regeneration and intimal hyperplasia in the rabbit. *J.Am.Coll.Cardiol. Suppl.:* 420A.
- Dufrane D., van Steenberghe M., Guiot Y., Goebbels R.M., Saliez A., Gianello P. 2006. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 81(1): 36-45.
- Ehrlich, H. P., Rockwell, W. B., Cornwell, T. L. & Rajaratnam, J. B. 1991. Demonstration of a direct role for myosin light chain kinase in fibroblast-populated collagen lattice contraction. *J.Cell Physiol.* 146: 1.
- Epstein, S. E., Kornowski, R., Fuchs, S. & Dvorak, H. F. 2001. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation* 104: 115-119.
- Faxon, D. P. 2002. Systemic drug therapy for restenosis: "deja vu all over again". *Circulation* 106: 2296-2298.
- Farb A., Sangiorgi G., Carter A.J., Walley V.M., Edwards W.D., Schwartz R.S., Virmani R. 1999. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 99:44-52
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. & Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84: 7413-7417.

- Ferrara, N., Houck, K. A., Jakeman, L. B., Winer, J. & Leung, D. W. 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J.Cell Biochem.* 47: 211-218.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. & Williams, G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J.Exp.Med.* 133: 275-288.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70.
- Franklin, S. M. & Faxon, D. P. 1993. Pharmacologic prevention of restenosis after coronary angioplasty: review of randomized clinical trials. *Coron.Artery Dis.* 4: 232-242.
- Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior R.M., Ivan E. 2002. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 91(9):852-9.
- Geary, R. L., Nikkari, S. T., Wagner, W. D., Williams, J. K., Adams, M. R. & Dean, R. H. 1998. Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction. *J.Vasc.Surg.* 27: 96-106.
- Gerber, H. P., Dixit, V. & Ferrara, N. 1998a. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 273: 13313-13316.
- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V. & Ferrara, N. 1998b. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J.Biol.Chem.* 273: 30336-30343.
- Gibbons, G. H. & Dzau, V. J. 1994. The emerging concept of vascular remodeling. *N.Engl.J.Med.* 330: 1431-1438.
- Glagov, S. & Zarins, C. K. 1983. Quantitating atherosclerosis: problems of definition. In Bond, M. G., Insull, W. J., Glagov, S., Chandler, A. B. & Cornhill, J. F. (Eds) *Clinical diagnosis of atherosclerosis: quantitative methods of evaluation* (pp. 11-35). New York: Springer Verlag.
- Gorman, C. M., Gies, R. D. & McCray, G. 1990. Transient Production of Proteins Using an Adenovirus Transformed Cell Line. *unknown* 2: 3-10.
- Gossl, M., Malyar, N. M., Rosol, M., Beighley, P. E. & Ritman, E. L. 2003. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* ..
- Gradius-Pizlo, I., Wilensky, R. L., March, K. L., Fineberg, N., Michaels, M., Sandusky, G. E. & Hathaway, D. R. 1995. Local delivery of biodegradable microparticles containing colchicine or a colchicine analogue: effects on restenosis and implications for catheter-based drug delivery. *J.Am.Coll.Cardiol.* 26: 1549-1557.
- Gravanis, M. B. & Roubin, G. S. 1989. Histopathologic phenomena at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty: the problem of restenosis. *Hum.Pathol.* 20: 477-485.
- Gruberg, L., Waksman, R., Satler, L. F., Pichard, A. D. & Kent, K. M. 2000. Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 9: 2555-2578.
- Gruentzig, A.R., Senning, A., Siegenthaler, W.E. 1979. Nonoperative dilation of coronary artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 301:61-66.
- Haensler, J. & Szoka, F. C., Jr. 1993. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug.Chem.* 4: 372-379.
- Hariawala, M. D., Horowitz, J. R., Esakof, D., Sheriff, D. D., Walter, D. H., Keyt, B., Isner, J. M. & Symes, J. F. 1996. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J.Surg.Res.* 63: 77-82.

- Heistad D.H., Armstrong M.L. 1986. Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. *Arteriosclerosis* 6:326-331.
- Hermans W.R., Rensing B.J., Strauss B.H., Serruys P.W. 1991. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: The search for a "magic bullet". *Am Heart J.* 122:171-187.
- Holmes, D.R., Jr. 2006. Antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 1:25-34.
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B. & Leung, D. W. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol.Endocrinol.* 5: 1806-1814.
- Isner, J. M. 1994. Vascular remodeling. Honey, I think I shrunk the artery. *Circulation* 89: 2937-2941.
- Isner, J. M. & Losordo, D. W. 1999. Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nat.Med.* 5: 491-492.
- Isner, J. M., Walsh, K., Symes, J., Pieczek, A., Takeshita, S., Lowry, J., Rossow, S., Rosenfield, K., Weir, L., Brogi, E. & . 1995. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 91: 2687-2692.
- Kahlon, R., Shapero, J. & Gotlieb, A. I. 1992. Angiogenesis in atherosclerosis. *Can.J.Cardiol.* 8: 60-64.
- Kakuta, T., Currier, J. W., Haudenschild, C. C., Ryan, T. J. & Faxon, D. P. 1994. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 89: 2809-2815.
- Kalnins, A., Otto, K., Ruther, U. & Muller-Hill, B. 1983. Sequence of the lacZ gene of Escherichia coli. *EMBO J.* 2: 593-597.
- Karim, M. A., Miller, D. D., Farrar, M. A., Eleftheriades, E., Reddy, B. H., Breland, C. M. & Samarel, A. M. 1995. Histomorphometric and biochemical correlates of arterial procollagen gene expression during vascular repair after experimental angioplasty. *Circulation* 91: 2049.
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. & Connolly, D. T. 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312.
- Kingston, P. A., Sinha, S., Appleby, C. E., David, A., Verakis, T., Castro, M. G., Lowenstein, P. R. & Heagerty, A. M. 2003. Adenovirus-mediated gene transfer of transforming growth factor-beta3, but not transforming growth factor-beta1, inhibits constrictive remodeling and reduces luminal loss after coronary angioplasty. *Circulation* 108: 2819-2825.
- Kingston, P. A., Sinha, S., David, A., Castro, M. G., Lowenstein, P. R. & Heagerty, A. M. 2001. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor-beta type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. *Circulation* 104: 2595-2601.
- Kiriakidis, S., Andreakos, E., Monaco, C., Foxwell, B., Feldmann, M. & Paleolog, E. 2003. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J.Cell Sci.* 116: 665-674.
- Knighton, D. R., Hunt, T. K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B. J., Werb, Z. & Banda, M. J. 1983. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221: 1283-1285.
- Koch, A. E., Harlow, L. A., Haines, G. K., Amento, E. P., Unemori, E. N., Wong, W. L., Pope, R. M. & Ferrara, N. 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating

- endothelial function in rheumatoid arthritis. *J.Immunol.* 152: 4149-4156.
- Koester W. 1876. Endarteritis and arteriitis. *Berl Klin Wochenschr* 13:454-455.
- Kolpakov, V., Gordon, D. & Kulik, T. J. 1995. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 76: 305-309.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. 1995. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Human Pathol* 26:450-456.
- Kwon, H. M., Kang, S., Hong, B. K., Kim, D., Park, H. Y., Shin, M. S. & Byun, K. H. 1999. Ultrastructural changes of the external elastic lamina in experimental hypercholesterolemic porcine coronary arteries. *Yonsei Med.J.* 40: 273-282.
- Kwon, H. M., Sangiorgi, G., Ritman, E. L., Lerman, A., McKenna, C., Virmani, R., Edwards, W. D., Holmes, D. R. & Schwartz, R. S. 1998. Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: visualization and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. *J.Am.Coll.Cardiol.* 32: 2072-2079.
- Lafont, A., Guzman, L. A., Whitlow, P. L., Goormastic, M., Cornhill, J. F. & Chisolm, G. M. 1995. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ.Res.* 76: 996-1002.
- Laitinen, M., Hartikainen, J., Hiltunen, M. O., Eranen, J., Kiviniemi, M., Narvanen, O., Makinen, K., Manninen, H., Syvanne, M., Martin, J. F., Laakso, M. & Yla-Herttuala, S. 2000. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum.Gene Ther.* 20;11: 263-270.
- Laitinen, M., Pakkanen, T., Donetti, E., Baetta, R., Luoma, J., Lehtolainen, P., Viita, H., Agrawal, R., Miyanochara, A., Friedmann, T., Risau, W., Martin, J. F., Soma, M. & Yla-Herttuala, S. 1997a. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum.Gene Ther.* 8: 1645-1650.
- Laitinen, M., Zachary, I., Breier, G., Pakkanen, T., Hakkinen, T., Luoma, J., Abedi, H., Risau, W., Soma, M., Laakso, M., Martin, J. F. & Yla-Herttuala, S. 1997b. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum.Gene Ther.* 8: 1737-1744.
- Langille, B. L. 1993. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 21(Suppl.): S11-S17.
- Lee, R. J., Springer, M. L., Blanco-Bose, W. E., Shaw, R., Ursell, P. C. & Blau, H. M. 2000. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102: 898-901.
- Lehmann, K. G., Popma, J. J., Werner, J. A., Lansky, A. J. & Wilensky, R. L. 2000. Vascular remodeling and the local delivery of cytochalasin B after coronary angioplasty in humans. *J.Am.Coll.Cardiol.* 35: 583-591.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.
- Lincoff, A. M., Furst, J. G., Ellis, S. G., Tuch, R. J. & Topol, E. J. 1997. Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J.Am.Coll.Cardiol.* 29: 808-816.
- Liu, M. W., Roubin, G. S. & King, S. B. I. 1989. Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinants and the role of intimal hyperplasia. *Circulation* 79: 1374-1387.
- Losordo, D. W., Pickering, J. G., Takeshita, S., Leclerc, G., Gal, D., Weir, L., Kearney, M., Jekanowski, J. & Isner, J. M. 1994. Use of the rabbit ear artery to serially assess

foreign protein secretion after site-specific arterial gene transfer in vivo. Evidence that anatomic identification of successful gene transfer may underestimate the potential magnitude of transgene expression. *Circulation* 89: 785-792.

- Losordo, D. W., Vale, P. R., Hendel, R. C., Milliken, C. E., Fortuin, F. D., Cummings, N., Schatz, R. A., Asahara, T., Isner, J. M. & Kuntz, R. E. 2002. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 105: 2012-2018.
- Ma X., O'Brien E.R. 2004. Antagonism of the alpha4 integrin subunit attenuates the acute inflammatory response to stent implantation yet is insufficient to prevent late intimal formation. *J Leukoc Biol* 75:1016-21.
- Mäkinen, K., Manninen, H., Hedman, M., Matsi, P., Mussalo, H., Alhava, E. & Yla-Herttuala, S. 2002. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 6: 127-133.
- Mintz, G. S., Popma, J. J., Pichard, A. D., Kent, K. M., Satler, L. F., Wong, C., Hong, M. K., Kovach, J. A. & Leon, M. B. 1996. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94: 35-43.
- Mintz, G. S., Tinana, A., Hong, M. K., Lee, C. W., Kim, J. J., Fearnot, N. E., Park, S. W., Park, S. J. & Weissman, N. J. 2003. Impact of preinterventional arterial remodeling on neointimal hyperplasia after implantation of (non-polymer-encapsulated) paclitaxel-coated stents: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the ASian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT). *Circulation* 108: 1295-1298.
- Moulton K. S., Heller E., Konerding M. A., Flynn E., Palinski W., Folkman J. 1999. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99: 1726-1732.
- Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A. & Isner, J. M. 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97: 99-107.
- Nikol, S., Engelmann, M. G., Pelisek, J., Fuchs, A., Golda, A., Shimizu, M., Mekkaoui, C. & Rolland, P. H. 2002. Local perivascular application of low amounts of a plasmid encoding for vascular endothelial growth factor (VEGF165) is efficient for therapeutic angiogenesis in pigs. *Acta Physiol Scand.* 176: 151-159.
- Nissen S. E, Tuzcu E. M., Schoenhagen P., Crowe T., Sasiela W.J., Tsai J., Orazem J., Magorien R. D., O'Shaughnessy C., Ganz P. Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering (REVERSAL) Investigators. 2005. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:29-38.
- Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A. B., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warraich, R., Yacoub, M., Hetzer, R., Lamers, J., Schultheiss, H. P. & Poller, W. 2001. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104: 275-280.
- Noutsias, M., Pauschinger, M., Ostermann, K., Escher, F., Blohm, J. H., Schultheiss, H. & Kuhl, U. 2002. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med.Sci.Monit.* 8: MT59-MT71.
- Pasterkamp, G., Hillen, B. & Borst, C. 1997. Arterial remodelling by atherosclerosis. *Semin.Interv.Cardiol.* 2: 147-152.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P. L., Kuhl, U. & Schultheiss, H. P. 1999. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99: 2750-2756.

- Pels, K., Labinaz, M., and O'Brien, E.R. 1997. Arterial wall neovascularization: potential role in atherosclerosis and restenosis. *Jap Circ J* 61(11):893-904.
- Pels, K., Labinaz, M., Hoffert, C. & O'Brien, E. R. 1999. Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty : correlation with arterial remodeling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19: 229-238.
- Pfisterer M., Brunner-La Rocca H.P., Buser P.T., Rickenbacher P., Hunziker P., Mueller C., Jeger R., Bader F., Osswald S., Kaiser C.; BASKET-LATE Investigators. 2006. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 48:2584-91.
- Phillips, H. S., Hains, J., Leung, D. W. & Ferrara, N. 1990. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127: 965-967.
- Pipp, F., Heil, M., Issbrucker, K., Ziegelhoeffer, T., Martin, S., van den, H. J., Weich, H., Fernandez, B., Golomb, G., Carmeliet, P., Schaper, W. & Clauss, M. 2003. VEGFR-1-selective VEGF homologue PIGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ.Res.* 92: 378-385.
- Post, M. J., Borst, C. & Kuntz, R. E. 1994. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 89: 2816-2821.
- Quinn, M.J., Bhatt, D.L., Zidar, F., Vivekananthan, D., Chew, D.P., Ellis, S.G., Plow, E., Topol, E.J. 2004. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 93(6):679-84.
- Reitman J.S., Mahley RW., Fry D.L. 1982. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 43(1): 119-32.
- Rosanio, S., Tocchi, M., Patterson, C. & Runge, M. S. 1999. Prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions: the medical approach. *Thromb.Haemost.* 82 Suppl 1:164-70.: 164-170.
- Rosengart, T. K., Lee, L. Y., Patel, S. R., Sanborn, T. A., Parikh, M., Bergman, G. W., Hachamovitch, R., Szulc, M., Kligfield, P. D., Okin, P. M., Hahn, R. T., Devereux, R. B., Post, M. R., Hackett, N. R., Foster, T., Grasso, T. M., Lesser, M. L., Isom, O. W. & Crystal, R. G. 1999. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 100: 468-474.
- Rosenthal, E. A., Bohlmeier, T. J., Monnet, E., MacPhail, C., Robertson, A. D., Horwitz, M. A., Burchenal, J. E. & Horwitz, L. D. 2001. An iron-binding exochelin prevents restenosis due to coronary artery balloon injury in a porcine model. *Circulation* 104: 2222-2227.
- Ross R, Glomset JA. 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 180:1332-1339.
- Ross R. 1990. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.
- Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S. & Sessa, W. C. 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J.Clin.Invest* 101: 731-736.
- Schurch, W., Seemayer, T. A. & Gabbiani, G. 1998. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am.J.Surg.Pathol.* 22: 141-147.
- Scott, N. A., Cipolla, G. D., Ross, C. E., Dunn, B., Martin, F. H., Simonet, L. & Wilcox, J. N. 1996. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after

- balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 93: 2178-2187.
- Scott, N. A., Ross, C., Subramanian, R., Martin, F., Simonet, L. & Wilcox, J. N. 1995. Characterization of the cellular response to coronary injury. *Circulation* 90: 1-392.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. & Dvorak, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.
- Serebruany, V.L. 2007. Aggressive antiplatelet strategies: time to reconsider? *Eur Heart J*. 28(18):2183-2184.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. & Schuh, A. C. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66.
- Shi, Y., Fard, A., Galeo, A., Hutchinson, H. G., Vermani, P., Dodge, G. R., Hall, D. J., Shaheen, F. & Zalewski, A. 1994. Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury. *Circulation* 90: 944-951.
- Shi Y, O'Brien J, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. 1996A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*; 94:1655-1664.
- Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski, A. 1996B. Adventitial remodeling after coronary artery injury. *Circulation* 93:340-348.
- Shi Y, O'Brien JE, Ala-Kokko L, Chung WS, Mannion JD, Zalewski A. 1997. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 95:997-1006.
- Shimamoto T. 1968. Microcirculatory aspects of atherogenesis, thrombogenesis, and antiatherosclerotics. *Am Heart J* 76:105-113.
- Sibinga, N. E., Foster, L. C., Hsieh, C. M., Perrella, M. A., Lee, W. S., Endege, W. O., Sage, E. H., Lee, M. E. & Haber, E. 1997. Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ.Res.* 80: 532-541.
- Singer, A. J. & Clark, R. A. 1999. Cutaneous wound healing. *N.Engl.J.Med.* 341: 738-746.
- Stefanadis, C., Vlachopoulos, C., Karayannacos, P., Boudoulas, H., Stratos, C., Filippides, T., Agapitos, M. & Toutouzas, P. 1995. Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation* 91: 2669-2678.
- Steinhubl, S.R., Berger, P.B., Mann, J.T. 3rd, Fry, E.T., DeLago, A., Wilmer, C., Topol, E.J.; CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. 2002. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 288(19):2411-20.
- Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB. 2007. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med*. 356(10):998-1008.
- Sugitani, H., Wachi, H., Tajima, S. & Seyama, Y. 2001. Nitric oxide stimulates elastin expression in chick aortic smooth muscle cells. *Biol.Pharm.Bull.* 24: 461-464.
- Teirstein P.S., Massullo V., Jani S., Popma J.J., Mintz G.S., Russo R.J., Schatz R.A., Guarneri E.M., Steuterman S., Morris N.B., Leon M.B., Tripuraneni P. 1997. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 336:1697-1703.
- Teirstein P. S., Massullo V., Jani S., Popma J.J., Russo R.J., Schatz R.A., Guarneri E.M., Steuterman S., Sirkin K., Cloutier D.A., Leon M.B., Tripuraneni P. 2000. Three-year clinical and angiographic follow-up after intracoronary radiation : results of a randomized clinical trial. *Circulation*. 101:360-365.

- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C. & Abraham, J. A. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J.Biol Chem.* 266: 11947-11954.
- Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., McDonald, M. C., Gravelin, L. M., Curry, C. M., Esakof, D. D., Maysky, M., Symes, J. F. & Isner, J. M. 2001. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 103: 2138-2143.
- Van Belle, E., Tio, F. O., Chen, D., Maillard, L., Chen, D., Kearney, M. & Isner, J. M. 1997. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J.Am.Coll.Cardiol.* 29: 1371-1379.
- Varnava, A. 1998. Coronary artery remodelling. *Heart* 79: 109-110.
- Varnava, A. M. & Davies, M. J. 2001. Relation between coronary artery remodelling (compensatory dilatation) and stenosis in human native coronary arteries. *Heart* 86: 207-211.
- Verma, I. M. & Somia, N. 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242.
- Voisard R, Fischer R, Osswald M, Voglic S, Baur R, Susa M., Koenig W., Hombach V. 2001. Aspirin (5 mmol/L) inhibits leukocyte attack and triggered reactive cell proliferation in a 3D human coronary in vitro model. *Circulation* 103:1688-94.
- Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tsepili M, Valsecchi O, Kolodgie FD. 2004. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* 109(6):701-5.
- Waksman R, Bhargava B, White L, Chan RC, Mehran R, Lansky AJ, Mintz GS, Satler LF, Pichard AD, Leon MB, Kent KK. 2000A. Intracoronary beta-radiation therapy inhibits recurrence of in-stent restenosis. *Circulation* 101:1895-1898.
- Waksman R, White RL, Chan RC, Bass BG, Geirlach L, Mintz GS, Satler LF, Mehran R, Serruys PW, Lansky AJ, Fitzgerald P, Bhargava B, Kent KM, Pichard AD, Leon MB. 2000B. Intracoronary gamma-radiation therapy after angioplasty inhibits recurrence in patients with in-stent restenosis. *Circulation* 101:2165-2171.
- Wang, T.H., Bhatt, D.L., Fox, K.A., Steinhubl, S.R., Brennan, D.M., Hacke, W., Mak, K.H., Pearson, T.A., Boden, W.E., Steg, P.G., Flather, M.D., Montalescot, G., Topol, E.J.; on behalf of the CHARISMA Investigators. 2007. An analysis of mortality rates with dual-antiplatelet therapy in the primary prevention population of the CHARISMA trial. *Eur Heart J.* 28(18):2200-7.
- Ward, M. R., Kanellakis, P., Ramsey, D., Funder, J. & Bobik, A. 2001. Eplerenone suppresses constrictive remodeling and collagen accumulation after angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 104: 467-472.
- Williams J.K., Armstrong M.L., Heistad D.D. 1988. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: Responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res* 62:515-523.
- Witte, M. B., Thornton, F. J., Efron, D. T. & Barbul, A. 2000. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. *Nitric.Oxide.* 4: 572-582.
- Wu, G. Y. & Wu, C. H. 1988. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J.Biol.Chem.* 263: 14621-14624.
- Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Fujimori, H., Sakurai, S., Tanaka, N. & Yamamoto, H. 1999. Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 79: 501-509.

- Zalewski, A. & Shi, Y. 1997. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 417-422.
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H. & Birnstiel, M. L. 1990. Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 3655-3659.

5. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinen akademischen Lehrern danken, die meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang entscheidend geprägt haben. Prof. Dr. Bodo Eckehard Strauer verdanke ich den Einstieg in meine wissenschaftliche Laufbahn, er unterstützte meine Bemühungen um ein DFG-Ausbildungsstipendium am University of Ottawa Heart Institute in Kanada. Zu besonderem Dank bin ich Prof. Dr. Edward Redmond O'Brien verpflichtet, er verstand es in Ottawa ein wissenschaftliches und menschliches Umfeld zu schaffen, das es mir ermöglichte eigenständige Projekte durchzuführen, und vermittelte mir Freude und ein besonderes Verständnis für das wissenschaftliche Schreiben.

Prof. Dr. Hans-Peter Schultheiss hat als Klinikdirektor meine Ausbildung als Internist und Kardiologe entscheidend geprägt. Insbesondere in für mich sehr schwierigen Zeiten hat er mich mit Worten und Taten unterstützt meinen Weg als Kliniker und Wissenschaftler fortzusetzen, wofür ich ihm von Herzen danke.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Peter Lothar Schwimbeck, der mich nach meiner Rückkehr aus Kanada beraten und unterstützt hat. Seinem Frohmut und erfinderischen Einsatz ist es mit zu verdanken, dass ich in Berlin das aufwendige Großtierangioplastiemodell am Schwein etablieren konnte, das die Grundlage meiner experimentellen Forschungsarbeit darstellt.

Ich danke den Mitarbeitern und Doktoranden meiner Arbeitsgruppe, Ina-Sabine Köhler, Petra Mehn, Daniela Bellabarba, Dr. Sandra Artinger, Dr. Chantip Dang-Heine, Diana Bösel, Stefanie Utchil und Jens Klinowski für ihren Einsatz und ihre Unterstützung, viele der hier dargestellten Projekte haben sie mit ermöglicht.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Dr. Carolin Deiner verpflichtet, Carolin half als Doktorandin mit unermüdlichem Einsatz das Labor aufzubauen und mein erstes DFG-Projekt in Berlin anzuschieben. In den Folgejahren arbeitete sie als Post-Doc mit herausragendem Engagement und unerschöplichem Ideenreichtum an den Folgeprojekten, ohne ihre Mitarbeit, Loyalität und Freundschaft wäre eine Großzahl der hier aufgeführten Projekte nie verwirklicht worden.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kooperationspartnern PD Dr. Ralf Dechend und Prof. Dr. Christoph Loddenkemper aus Berlin, sowie Prof. Dr. Seppo Ylä-Herttuala aus Kopio/Finnland für ihre produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt, und dass, weil sie mein gesamtes Leben immer vom Anfang bis zum Ende aller Phasen an meiner Seite standen, gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern. Eine Auflistung ihrer Verdienste sprengt den Rahmen dieser Danksagung, ich bin was und wer ich bin, weil es Euch gibt!

In Liebe und Dank meiner Frau Ragna. Ihrem unendlichen Verständnis, ihrer Sensibilität und der Kraft, die sie mir täglich schenkt.

6. Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- Mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Dr. Klaus Pels