

2 DISKUSSION

3.1 VEGF UND DIE REKONSTRUKTIVE MIKROCHIRURGIE

VEGF beschleunigt das Remodeling des Endothels nach Mikrochirurgie

Die Angiogenese und Neovaskularisation werden maßgeblich durch VEGF gesteuert. Es ist zwar ein potentes Zellmitogen der Angiogenese, erhöht aber auch die Gefäßpermeabilität. Natives VEGF ist ein basisches, Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa (22). Diese Eigenschaften sind mit der häufigsten VEGF-Isoform, dem VEGF₁₆₅, vergleichbar. VEGF₁₆₅ ist auch das prädominante Protein, welches durch verschiedene normale oder transformierte Zellen produziert wird. Bisher gab es keine Untersuchungen, welche die Reendothelialisation von Mikrogefäßen nach mikrochirurgischen Operationen wie Reanastomosen, Replantationen oder Transplantationen untersucht haben. Der exakte Mechanismus des vaskulären Remodelings nach Gefäßverletzungen ist noch wenig erforscht. Unsere Daten stellen die erste Analyse des Effekts von lokal appliziertem VEGF nach Mikrochirurgie in Bezug auf die Reendothelialisierung und dem vaskulären Remodeling dar. Hier konnten wir zeigen, dass bei einer alleinigen mikrovaskulären Anastomose an der Femoralarterie der Ratte VEGF nach 10 Tagen signifikant erhöht war. Die Ursache lag in der signifikanten Hochregulierung des VEGF-spezifischen Flk-1 Rezeptors. Deshalb vermuten wir, dass durch eine lokale Applikation von VEGF nach Gefäßtrauma das vaskuläre Remodeling beschleunigt werden könnte. Tatsächlich fanden wir bei mit VEGF-behandelten Mikroanastomosen der Ratte nach 5 Tagen eine vollständige Reendothelialisierung. Nach 10 Tagen war der vaskuläre Remodelingprozess vollständig abgeschlossen. Dies bedeutet eine signifikant beschleunigte Heilung im Vergleich zu den nicht mit VEGF-behandelten Tieren.

Vorangegangene Untersuchungen über die Effektivität von VEGF zur beschleunigten Reendothelialisierung nach Gefäßballondilatation brachten kontroverse Ergebnisse hervor (1, 40). Asahara *et al.* zeigte, dass ein arterieller Gentransfer von phVEGF₁₆₅ die lokale Reendothelialisierung beschleunigt, zu einer neointimalem Verdickung und Reduktion der Thrombogenität führt. Im Gegensatz dazu berichten Lindner *et al.* (71), über das Fehlen eines Endothelzellwachstums nach VEGF-Gabe. Weiterhin wurde in

einer zweiten Studie nachgewiesen, dass in den vaskulären glatten Muskelzellen der Flt-1 Rezeptor nach Gefäßtrauma hoch exprimiert wurde. Dazu zeigte VEGF einen synergistischen Effekt mit FGF-2 bezüglich der Proliferation von glatten Muskelzellen *in vivo* (71).

Diese Effekte beruhen sowohl auf direkt durch VEGF-vermittelte Permeabilitäts-erhöhungen, als auch auf Interaktionen zwischen VEGF und FGF Signal Pathways. Unsere Resultate stimmen mit den Resultaten von Asahara *et al.* überein, welcher ein anderes experimentelles Design vom Tiermodell Kaninchen nutzte. Die Tiere wurden mit einer Ballon Angioplastie behandelt.

Es ist bekannt, dass das mechanische Gefäßtrauma eine Endothelzellproliferation verursacht (71). Der zeitliche Ablauf wurde durch Schwartz (92) beschrieben. Es zeigte sich keine Proliferation in den ersten 24 Stunden nach Ballon-vermitteltem Gefäßlumentrauma. Nach 48 Stunden erreichte die Endothelzellproliferation ein Maximum, welches sich bis 96 Stunden nach Setzung des Trauma wieder normalisierte. Eine intravasale VEGF-Infusion für 3 Minuten verursachte sofort nach dem Trauma eine Erhöhung der Endothelzell-proliferationsrate im geschädigten Gefäß (10).

Gennaro *et al.* (28) zeigte, dass beim Kaninchen ein adenoviraler Gentransfer von VEGF₁₆₅ signifikant die VEGF-Expression im verletzten Gefäß erhöht, wodurch die Re-endothelialisierung beschleunigt wird, und somit die Neointima reduziert werden kann. Eine einmalige Gabe von VEGF reduziert die Intimahyperplasie und unterstützt die endotheliale Funktion im Kaninchen-Venentransplantat Model (72).

Dieses tiefere Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Vaskularisation, mit speziellem Bezug auf die posttraumatische Endothelzellproliferation nach Gefäßtrauma und Gefäßanastomosen ermöglicht neue therapeutische Ansätze zur Behandlung bei Replan-tationen, Transplantationen und Tissue Engineering, um einerseits die Erfolgsrate nach Anastomosen und rekonstruktiven Eingriffen zu verbessern, andererseits die Möglichkeit neuer Techniken beim Tissue Engineering weiter entwickeln zu können.

VEGF induziert die extrazelluläre Matrix und Mediatoren

Bisher existierten keine Daten betreffend der Bedeutung von VEGF auf die Expression von extrazellulären Matrixproteinen beim vaskulären Heilungsprozess. In unserem Rattenmikro-anastomosenmodell konnten wir nachweisen, dass VEGF signifikant

Kollagen Typ I, III und IV Protein sowie Fibronectin induziert (19, 26). Eine andere Arbeit zeigt, dass VEGF die Fibronectin Sekretion in Kulturen von humanen Lungenmuskelzellen bewirkt (61, 62).

Weiter fanden wir eine Erhöhung von TGF- β_1 in VEGF behandelten Tieren sofort und bis zum 10. Tag nach Reanastomose. Diese Daten deuten darauf hin, dass VEGF möglicherweise eine Rolle bei der weiteren Stimulation des vaskulären Remodelings nach Gefäßtrauma spielt. Sehr interessant und neu ist, dass VEGF eine Hochregulation von Osteopontin nach Gefäß-trauma verursacht. Osteopontin war nur bei den VEGF behandelten mikroanastomisierten Tieren erhöht, was auf eine spezifische Rolle dieses zelladhäsiven Moleküls in der frühen Phase der vaskulären Wundheilung hindeutet. Osteopontin ist bekannt als Wachstumsfaktor von Zytokinen und extrazellulärer Matrixproteine. Osteopontin (Eta-1) spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Immunität und bei Entzündungen. Es wirkt als Überlebens-, zelladhäsiver und chemotaktischer Faktor der Endothelzellen. (65). Isoda *et al.* (54, 90) verwendete ein transgenes Mausmodell, welches Osteopontin überexprimierte, und zeigte, dass Osteopontin die Verdickung der Media und Neointimabildung im vaskulären Remodeling nach Ballondilatation beeinflusste. Ferner wurde gezeigt, dass neutralisierende Antikörper gegen Osteopontin im Ratten-Karotismodell die Neointimabildung nach endothelialer Denudation hemmt, was wiederum auf eine aktive Rolle des Osteopontins beim vaskulären Remodeling hindeutet (76).

3.2 VEGF UND DAS VERBRENNUNGSTRAUMA

VEGF erhöht die Gefäßpermeabilität und verursacht ein lokales und generalisiertes Gewebeödem

Nach dem Verbrennungstrauma beginnt der Prozess der Wundheilung. Dieser ist charakterisiert durch Entzündung, Zellmigration und Proliferation, Synthese und Remodeling der extrazellulären Matrix sowie Neovaskularisation (63).

VEGF erhöht die kapilläre und venöse Permeabilität als Resultat der sich öffnenden interzellulären Gap Junctions der Endothelzellen. Diese Veränderungen können morphologisch nachgewiesen werden (49, 87). Die Beeinflussung oder Schädigungen der

Endothelzellen verändern somit direkt die Permeabilität der Gefäße und verursachen ultimativ ein Gewebeödem. Diese Mechanismen sind von zentralem Interesse im Umgang mit den verbrennungsinduzierten Organ- oder Gewebeschädigungen.

Verschiedene Mechanismen sind für die Endothelzellschädigungen nach Verbrennungstrauma verantwortlich. Adhärenz von humanen polymorphonukleären Zellen (PMN) an Endothelzellen und Proteasen sind einer der Grundmechanismen (47). Andere pro- und anti-inflammatorische Mediatoren wie Tumor-Nekrose Faktor (TNF), Histamin, Prostaglandin, Kinin, Thromboxan A₂, Serotonin, Sauerstoffradikale und Endothelin verursachen ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung der Gefäße (34, 49, 51). Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Gabe von VEGF als Nebenwirkung ein lokales Gewebeödem mit Entzündungsreaktionen verursachte (6, 55). Aufgrund der hauptsächlich vasoaktiven Eigenschaften verursacht VEGF eine ausgeprägte systemische Hypotension, welche dosisabhängig ist. Bei intravasaler Plasmid-vermittelter VEGF-Gentherapie an den Beinen wird bei Patienten ebenfalls als Nebenwirkung ein extensives Gewebeödem sowie Teleangiektasien verursacht (6). Poliakova *et al.* (86) konnte 1999 im Kaninchenversuch nachweisen, dass die vaskuläre Permeabilität von VEGF dosisabhängig ist. VEGF₁₂₁ verursachte in zu hoher Konzentration massive skrotale Ödeme und Ulzerationen der Haut, und in geringerer Dosierung ein moderates Gewebeödem.

In einer prospektiv klinischen Studie haben wir die stark erhöhten Serumkonzentrationen des zirkulierenden VEGF sofort nach dem Verbrennungstrauma bis zum Abheilen der Wunden nachgewiesen. Solange das Gewebeödem vorhanden war, konnte ein erhöhter VEGF-Serumspiegel nachgewiesen werden. Wir wissen, dass VEGF auch in sehr geringer Konzentration die vaskuläre Permeabilität erhöhen kann (18).

All diese Fakten weisen auf die Bedeutung des VEGF in der Ätiologie des Gewebeödems nach Verbrennungstrauma hin. Das schwere Verbrennungstrauma stellt ein kritisches klinisches Verletzungsbild mit einer hohen Mortalität dar. Die Ursache für diese erhöhte Mortalität ist das schwere lokale und generalisierte Gewebeödem, welches beim Verbrennungspatienten lokale und generalisierte Komplikationen wie Gewebehypoxie, Apoptose, SIRS und schließlich MODS verursachen kann (102, 104, 110).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der VEGF-Serumspiegel bei Komplikationen wie SIRS, ARDS oder Wundinfektionen signifikant erhöht war. Diese

Veränderungen des VEGF-Spiegels konnte auch bei anderen Krankheiten mit ARDS oder SIRS nachgewiesen werden (12, 101). Zwei Studien zeigten den Zusammenhang zwischen Verbrennungstrauma und vaskulärer Permeabilität, jedoch ohne mögliche Ursachen zu erforschen (12, 49). Nach dem initialen Verbrennungstrauma kommt es zur Geweberegeneration mit lokaler Neoangiogenese und Freisetzung von VEGF. Die Genese der Freisetzung von VEGF nach Verbrennungstrauma ist kaum untersucht. Die Quellen des freigesetzten und zirkulierenden VEGF sind Mastzellen, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Plättchen und Keratinozyten (105). Wenn man berücksichtigt, dass bisher alle Versuche, die Verbrennungsödeme zu reduzieren, fehlgeschlagen sind, und dass VEGF 40000-mal stärker als Histamin die Gefäßpermeabilität erhöht, könnte man sich vorstellen, dass die therapeutische Inhibition von VEGF klinisch das Gewebeödem zu reduzieren vermag.

3.3 VEGF UND TISSUE ENGINEERING IN DER SIMULIERTEN SCHWERELOSIGKEIT (0g)

Das Ziel der Untersuchung war es, die Kurz- und Langzeiteffekte nach simulierter Schwerelosigkeit mittels Klinorotation an Endothelzellen (Eahy 926 Zelllinie) zu untersuchen. Wir wollten die Wirkung von VEGF unter Schwerelosigkeit an Endothelzellen prüfen. Schon nach einer Stunde Aufenthalt bei 0g fand sich bei diesen Zellen Apoptose, die auch nach 4, 24 und 72 Stunden noch nachweisbar war. Dazu waren Fas, Bax und Caspase-3, PARP, 85-kDa PARP Fragmente, sowie NFkB stark und Bcl-2 leicht erhöht. Die Applikation von VEGF reduzierte Apoptose unter Schwerelosigkeit signifikant. Damit einher gingen die Reduktion von Fas, Bax, Caspase-3, PARP und eine Erhöhung von Bcl-2. Diese Resultate zeigen, dass Apoptose durch Schwerelosigkeit via extrinsische und intrinsische Signalwege verursacht wird. Sie wird durch externe Signale über CD 95, jedoch auch über Caspase-3 Aktivierung und Veränderungen an Bax und Bcl-2 verursacht. Nach 24 Stunden formierten sich die Endothelzellen zu dreidimensionalen multizellulären Sphäroiden, sowie zu Monolayern und tubulären Strukturen. Die initial gebildeten Sphäroide (maximaler Durchmesser 3 mm) blieben stabil. Zahlreiche Sphäroide formten sich tubulär. Die Schwerelosigkeit beeinflusste auch

die extrazelluläre Matrix. Fibronectin, Chondroitinsulfat, Kollagen Typ I, Laminin und Osteopontin wurden exprimiert.

VEGF wirkt in der Schwerelosigkeit zytoprotektiv und unterstützt die Bildung von dreidimensionalen multizellulären Sphäroiden und tubulären Strukturen.

3.4 WIRKUNG VON PTK787/ZK222584 AM SCHILDDRÜSENKARINOM-TUMORXENOGRAFTMODELL

Wir untersuchten die Effekte von PTK/ZK (selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor) bezüglich seiner antikanzerogenen und antiangiogenen Wirkung am Tumorxenograftmodell eines niedrig differenzierten Schilddrüsenkarzinoms in der Nacktmaus. Niedrig differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind durch lokales invasives Wachstum, Auftreten entfernt gelegener Metastasen und einem Mangel an therapeutischen Möglichkeiten gekennzeichnet. Onkogene Aktivierung, Inaktivierung von Tumor Suppressor Genen und verschiedene Wachstumsfaktoren sind für die Entwicklung und Wachstumsregulierung von Schilddrüsenkarzinomen verantwortlich. Einige dieser Faktoren sind für die Versorgung des wachsenden Tumors oder seiner Metastasen durch Stimulation der Angiogenese essenziell. Obwohl die Angiogenese auch im Wachstum von benignen Schilddrüsen-Gewebe eine Rolle spielt, könnten möglicherweise maligne Angiogenese in einem höheren Maße stimulieren.

In dieser Studie haben wir zum ersten Mal demonstriert, dass PTK/ZK auch antitumoröse und antiangiogene Aktivitäten im *in vivo* Schilddrüsenkarzinommodell besitzt. Die Blockade der VEGF-Rezeptoren durch orale Applikation des Tyrosin-Kinase-Inhibitors induziert eine Inhibierung des Wachstums von Xenotransplantaten von menschlichen Schilddrüsentumorzellen der ML-1 Zelllinie. Das durchschnittliche Tumolvolumen wurde in PTK/ZK-behandelten Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Darüber hinaus scheint VEGF auch eine Schlüsselrolle im Wachstum von Schilddrüsentumoren zu spielen. Bunone *et al.* berichtete von einer Überexpression von VEGF in Schilddrüsenmalignomen im Vergleich zu normalem Gewebe. Die Autoren vermuteten, dass Faktoren wie die Neoangiogenese in das neoplastische Wachstum und die Aggressivität von Schilddrüsenkarzinomen involviert sind, und dass VEGF

möglicherweise ein initiales angiogenes Signal für Tumorwachstum und lokale Invasion darstellt (9).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Intensität der VEGF-Expression mit einem erhöhten Risiko der Wiederkehr und einem herabgesetzten beschwerdefreien Überleben beim papillären Schilddrüsenkarzinom vergesellschaftet ist (66).

Ein bedeutendes Resultat war die signifikante Reduktion von Mikrogefäßen in Xenotransplantaten, welche mittels CD31-Markierung nachgewiesen werden konnte.

Gleichzeitig untersuchten wir mögliche Veränderungen der Extrazellulären Matrixproteine in behandelten und unbehandelten Tumourimplantaten. Die Extrazelluläre Matrix und die darunter liegenden Membranen beeinflussen in hohem Maße Proliferation, Differenzierung und die Funktion von Zellen, sowie die Struktur des Gewebes.

3.5 VEGF ERHÖHTE DIE PERMEABILITÄT IN DER PERFUNDIERTEN NABELVENE

Wir konnten vor kurzem ein perfundiertes Modell für ein *ex vivo* isoliertes hämoperfundiertes Schweineherz etablieren (58, 59). Der Gesamtaufbau des neuen Gefäß-Perfusions-Modells imitiert dieses Design. Diese Studie hat zum ersten Mal das *ex vivo* Modell einer isolierten perfundierten Nabelarterie charakterisiert. Es ermöglicht pharmakologische und gefäßbiologische Studien, welche den Bedingungen *in vivo* sehr ähnlich sind. Die Vorteile dieses Modells liegen in der Möglichkeit der Durchführung von Langzeitstudien und kontrollierten Bedingungen mit einer permanenten Aufzeichnung der Funktionsparameter. Dieses Modell ist charakterisiert durch seinen normalen vaskulären Druck und Fluss. Es wird für molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt.

3.6 PROSPEKTIV KLINISCHER THERAPIEANSATZ VON VEGF IN DER PLASTISCHEN CHIRURGIE

3.6.1 Stimulation der Gefäßwand mit VEGF beschleunigt das vaskuläre Remodeling

Der Verlust des Endothels nach vaskulärem Trauma im Bereich der mikrovaskulären rekonstruktiven Chirurgie, Transplantation und Replantation ist verbunden mit einem erhöhten Thromboserisiko, einer Proliferation der Intima, Media und Adventitia. Häufig führen diese Mechanismen zu Stenosen oder gar zum vollständigen Verschluss der Gefäße. Daraus resultiert der vollständige Verlust des revaskularisierten Gewebes. Eine erfolgreiche mikrovaskuläre Gefäßanastomose setzt die möglichst rasche und perfekte endotheliale Regeneration der Intima voraus. Dadurch kann klinisch die Erfolgsrate und damit das Überleben von mikrovaskulär replantiertem und transplantiertem Gewebe erreicht werden. In unseren Versuchen haben wir gezeigt, dass VEGF die endotheliale Regeneration signifikant beschleunigt. Dazu induziert VEGF verschiedene Mediatoren (TGF- β 1, Osteopontin) und die extrazelluläre Matrix (Kollagen Typ I, II, IV). Dadurch wird eine Hyperproliferation der gesamten Gefäßwand verhindert und das vaskuläre Remodeling unterstützt. Osteopontin scheint dabei eine Schlüsselrolle in der zelladhäsiven, chemotaktischen, immunologischen und inflammatorischen Wirkung einzunehmen.

Diese Daten sind von klinischer Relevanz. Durch intraluminale VEGF-Injektion kann nach mikrochirurgischer Gefäßnaht die Erfolgsrate in der Transplantations-, Replantations- und Rekonstruktiven Chirurgie erhöht werden (Reprint 1).

3.6.2 Inhibition von VEGF reduziert das Gewebeödem

Das Verbrennungstrauma ist assoziiert mit einem lokalen und generalisierten Gewebeödem. Darauf folgen häufig lebensbedrohliche Erkrankungen wie MODS und SIRS, welche zum Tod der Patienten führen können. Alle bisherigen Versuche, das exzessive Gewebeödem zu reduzieren, sind fehlgeschlagen. Wir fanden 22-fach erhöhte

VEGF-Serumspiegel bei Verbrennungspatienten, welche sich erst wieder nach Wundverschluss normalisierten. Parallel dazu verschwand auch das Gewebeödem. Unsere Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass eine therapeutische VEGF-Blockierung bei Verbrennungspatienten das lokale und generalisierte Ödem reduzieren könnte. Das hat herausragende klinische Konsequenzen: zum einen kann die Wundheilung und Schocktherapie, insbesondere in der Initialphase, verbessert werden, führt doch ein exzessives lokales Gewebeödem zu einer Ischämie in der Intermediärzone. Dies hat ein „Nachbrennen“ im Gewebe zur Folge, was mit dem Absterben des geschädigten Gewebes gleichzusetzen ist. Eine Verminderung des Ödems kann dem entgegenwirken. Ein geringeres lokales und generalisiertes Ödem würde in der Initialphase der schweren Verbrennung auch nicht mehr die exzessiven schocktherapeutischen Maßnahmen erfordern (welche zu den Ödemen führen). Dies reduziert wiederum in der Folge die sekundären Komplikationen von MODS und SIRS. Damit könnte sich das Überleben nach schweren Verbrennungen deutlich verbessern.

3.6.3 Zytoprotektiver Effekt und Bildung von dreidimensionalen Aggregaten durch VEGF in der Schwerelosigkeit

Diese Daten beschreiben neue Informationen über das Wachstum von Endothelzellen unter simulierter Schwerelosigkeit. Mikrogravitation induziert bei Endothelzellen bereits nach kurzer Zeit die Formation von multizellulären dreidimensionalen Sphäroiden und tubulären Strukturen. Dazu kann eine Erhöhung der Expression der Extrazellulärmatrix beobachtet werden. VEGF reduziert den programmierten Zelltod von Endothelzellen während der Klinorotation. Diese Studie zeigt, dass mit der Klinorotation eine große Anzahl von Sphäroiden und tubulären Strukturen gezüchtet werden kann, welche in der regenerativen Medizin oder in pharmakologischen Studien eingesetzt werden können. Bei längeren Missionen in der bemannten Raumfahrt könnten durch den Einsatz von VEGF negative physiologische Effekte reduziert werden. So unterliegen nicht nur EC der Apoptose, sondern auch Schilddrüsenzellen (35). Dadurch verringern sich auch die Schilddrüsenhormone (60). Der zytoprotektive Effekt von VEGF könnte diesen Vorgang positiv beeinflussen. Um diese Effekte prüfen zu können, wird 2008 ein Experiment

unter realer Schwerelosigkeit auf der internationalen Raumfahrtstation ISS durchgeführt werden.

3.6.4 PTK787/ZK222584 inhibiert den Wirkmechanismus von VEGF

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Tyrosin-Kinase-Inhibitor PTK787/ZK222584 die Wirkung von VEGF reduziert. Wir konnten zeigen dass es unter PTK/ZK zu einem signifikant reduzierten Größenwachstum, Gefäßneubildung und Expression Extrazellulärer Matrixproteine in Xenografttumoren bei Nacktmäusen kommt. Diese Beobachtungen sind besonders wichtig für die Rolle, die VEGF bei der Angiogenese im Tumorgewebe spielt, und stellen einen möglichen Therapieansatz da. Darüber hinaus wird mit Hilfe eines Endothelzell-Schilddrüsenkarzinomzell-Kokulturmодells unter Applikation von VEGF bei 0g versucht, diesen Tierversuch zukünftig zu ersetzen. Es soll eine neue Möglichkeit geschaffen werden, um Tierversuche einzusparen.

3.6.5 VEGF beeinflusst die Permeabilität der Nabelarterie

Wir konnten darstellen, dass die intraluminale Applikation von VEGF in die Nabelarterie ein Gewebeödem in perfundierten Nabelschnüren induziert. VEGF übt seine biologische Aktivität bevorzugt an Endothelzellen aus. Kürzlich konnte unsere Gruppe zeigen, dass der VEGF-Serumlevel mit dem Gewebeödem nach Brandverletzungen korreliert (49).

Bislang ist nur wenig über die Expression von VEGF und seiner Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in der Arteria umbilicalis bekannt. Wir haben demonstriert, dass die Permeabilität durch VEGF-Perfusion deutlich erhöht ist. Es steht uns somit ein hervorragendes *ex vivo* Gefäßperfusionsmodell für pharmakologische Tests zur Verfügung.