

6 Diskussion

Arteriell Remodeling ist maßgeblich am Langzeitergebnis nach Ballondilatation beteiligt, und auch das Ausmaß der Neointimabildung nach Stentimplantation wird von präinterventionellem Remodeling beeinflusst (Mintz et al. 2003). Die (Patho)Physiologie des arteriellen Remodelings blieb bislang jedoch nur unvollständig verstanden.

Arbeiten von Pels et al. (1999) lassen vermuten, dass der Verlust adventitieller *Vasa vasorum* zu späten Zeitpunkten nach PTCA die Phase der späten arteriellen Wundheilung einleitet und zur generalisierten Wundkontraktur (negatives arterielles Remodeling) beiträgt.

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob die Regression adventitieller Mikrogefäße nach PTCA durch einen lokalen VEGF₁₆₅-Gentransfer verzögert/verhindert werden kann, und wie sich diese eventuell verbesserte adventitielle Mikrovaskularisation nach Intervention auf arterielles Remodeling, Intima+Media-Fläche, Lumenverlust und die Komposition der extrazellulären Matrix in I+M bzw. Adventitia auswirkt.

Die Genterapie mit VEGF ist ein vielversprechender Ansatz um therapeutische Angiogenese zu induzieren (Isner & Losordo 1999), so konnten beispielsweise klinische Phase I und II-Studien eines kathetervermittelten intramyokardialen VEGF-Gentransfers die Myokard-Durchblutung verbessern und Angina pectoris-Symptome reduzieren (Vale et al. 2001; Losordo et al. 2002). Aus experimentellen Studien ist jedoch bekannt, dass systemisch verabreichtes VEGF-Protein die Angiogenese innerhalb eines arteriosklerotischen Plaques und auch die Größenzunahme desselben fördert (Celletti et al. 2001). Obwohl weder die bereits genannten klinischen Studien, noch weitere Studien mit kathetervermitteltem intrakoronaren bzw. intrapoplitealen VEGF-Gentransfer (Laitinen et al. 2000; Makinen et al. 2002) Anhaltspunkte dafür lieferten, dass der Prozess der Arteriosklerose durch den lokalen Gentransfer fortschreiten würde, haben diese widersprüchlichen, tierexperimentellen Studien Zweifel an der Sicherheit einer VEGF-basierten angiogenen Therapie hervorgerufen. Die nachteiligen Auswirkungen einer VEGF-Therapie wurden jedoch in Kleintier-Modellen untersucht, in Aorten oder peripheren Arterien, und unter systemischer Verabreichung des VEGF-Proteins. Der Versuchsansatz in der hier vorliegenden Studie war, ein VEGF-Gen lokal in die Adventitia von Schweine-Koronararterien zu applizieren, was den Versuchsaufbau von klinischen Studien mit intrakoronarer/myokardialer VEGF-Genterapie besser simuliert (Isner & Losordo 1999). Dass

das perivaskuläre Gewebe ein interessantes Zielgewebe für eine angiogene Gentherapie ist, wurde auch schon in einer Kaninchenstudie bestätigt, die eine äußere Silikonmanschette für den VEGF-Gentransfer benutzte, wodurch eine Verringerung der Neointimabildung in der Arteria carotis erzielt wurde (Laitinen et al. 1997b).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Einschätzung der Sicherheit einer lokalen VEGF-Gentherapie, ist die Dosierung. So führte beispielsweise die unkontrollierte VEGF-Überexpression im Myokard von Mäusen zur Bildung von intramyokardialen Gefäßtumoren (Hämangiomen) und zum Tod der Tiere (Lee et al. 2000). Damit wird deutlich, dass nützliche und schädliche Effekte der VEGF-Therapie eng beieinander liegen und stark von der lokalen Konzentration abhängen. Selbst geringe lokale Konzentrationen können bedeutende biologische Effekte erzielen (Losordo et al. 1994), besonders in Bezug auf die fein abgestimmten Mechanismen der Mikrogefäß-Angiogenese. Dies bedeutet auch, dass sich selbst eine geringe VEGF-Gentransfer-Effizienz nicht nachteilig auf den gewünschten biologischen Effekt auswirken muss. Die in der vorliegenden Studie verwendete Dosierung (einmalige Injektion von 50 µg Plasmid, liposomenvermittelt) entsprach der Dosierung von anderen, experimentellen wie auch klinischen Studien, die bei lokaler Verabreichung von 25 - 200 µg VEGF-Gen keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachteten (Laitinen et al. 1997b; Vale et al. 2001; Rosengart et al. 1999). Darüber hinaus können selbst geringe VEGF-Konzentrationen einen großen Effekt erzielen, da die Verabreichung von VEGF beispielsweise die Proliferation von Perizyten stimuliert, und Perizyten auch selbst in der Lage sind, VEGF zu produzieren (Yamagishi et al. 1999). Dadurch erhöht sich die lokal bioverfügbare Menge an VEGF, welches möglicherweise den Endothelzellen von Mikrogefäßen als Überlebens- und/oder Stabilisierungsfaktor (Darland et al. 2003) dient. Insofern ist es nicht überraschend, dass in der vorliegenden Studie VEGF nicht nur in Endothelzellen, sondern vor allem in Perizyten adventitieller Mikrogefäße nachzuweisen war.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein adventitieller VEGF-Gentransfer nicht nur den Lumenverlust 28 Tage nach PTCA im Vergleich zur LacZ-transfizierten Kontrollgruppe um ca. 54 % reduzieren konnte, sondern insgesamt sogar ein Lumengewinn von ca. 5,4 % zu verzeichnen war. Dieses Resultat ist hauptsächlich auf positives arterielles Remodeling zurückzuführen (eine um ca. 38 % größere LEE-Fläche im Vergleich zum Referenzwert), und

war assoziiert mit einer inhibierten adventitiellen Mikrogefäß-Regression. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen waren keine Unterschiede hinsichtlich Intima+Media-Flächen-Wachstum, I+M-Flächen-Vaskularisation oder I+M-Flächen-Matrix-Komposition festzustellen, was den Schluss zulässt, dass in diesem Versuchsmodell das adventitiell verabreichte VEGF-Gen keine Progression des Plaque-Wachstums bewirkt. Die Tatsache, dass keine signifikante Reduktion der I+M-Fläche durch VEGF erreicht werden konnte (im Gegensatz zu einer Studie mit VEGF-Gentransfer via Silikonmanschette (Laitinen et al. 1997b)), mag damit zusammenhängen, dass die Charakteristik und Schwere der Läsion, die eine Ballondilatation hervorruft, nicht zu vergleichen ist mit einer chronischen Konstriktion von außen, ohne Beschädigung des Endothels, der elastischen Membranen oder der Tunica muscularis, und außerdem Unterschiede hinsichtlich Tierart und behandelter Arterie bestehen.

Von Geary et al. werden Parallelen zwischen der Hautwundheilung und der Heilung einer Arterienwand nach (Ballon)Verletzung hinsichtlich zeitlichem Ablauf und beteiligter Zellen aufgezeigt (Geary et al. 1998). Auch Mikrogefäße, sowohl deren Bildung als ihre Regression, spielen bei beiden Vorgängen eine wichtige Rolle und werden bei der Hautwundheilung mit der finalen narbigen Kontraktur in Verbindung gebracht. Im Umkehrschluss ist eine reiche Mikrogefäß-Vaskularisierung der arteriellen Adventitia möglicherweise erforderlich, um die lokale, durch adventitielles Wachstum nach Ballonverletzung induzierte Hypoxie und die konsekutive "narbige" Umstrukturierung des Gewebes zu reduzieren, und dadurch die Wiederverengung der Arterie zu verhindern. Zudem dient das Endothel adventitieller Mikrogefäße als Quelle vasodilatatorisch wirksamer Substanzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), welches als Mediator des vaskulären Remodelings diskutiert wird (Rudic et al. 1998). Jedoch auch für die Neointimabildung nach Ballondilatation scheint die adventitielle Vaskularisation von Bedeutung zu sein, wobei nicht ausschlaggebend ist, wieviele Mikrogefäße in der Adventitia vorhanden sind, sondern eher das Verhältnis von Mikrogefäß-Fläche zu Adventitiafläche (also die Mikrogefäß-Dichte) die entscheidende Rolle spielt und umgekehrt proportional zur Stenosierung der Arterie ist (Kwon et al. 1998). Tatsächlich war zu den Zeitpunkten, zu denen sich die beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich ihrer LEE-Fläche signifikant unterschieden, die adventitielle Mikrogefäß-Dichte in der VEGF-Gruppe signifikant höher als in der LacZ-Gruppe. Gleichzeitig war auch die Endothelzell-Zahl pro mm² Adventitia

signifikant höher in der VEGF-Gruppe, was im Zusammenhang mit einer möglichen Stickstoffmonoxid (NO)-Beteiligung von Bedeutung sein könnte. Ein weiteres Indiz dafür, dass eventuell eine vasodilatatorisch wirksame Substanz an den in der VEGF-Gruppe beobachteten Veränderungen beteiligt war, liefert die Feststellung, dass der Mikrogefäß-Größenindex (durchschnittlicher Umfang eines adventitiellen Mikrogefäßes) zwischen den Behandlungsgruppen nicht unterschiedlich war, die durchschnittliche Fläche eines adventitiellen Mikrogefäßes jedoch in der VEGF-Gruppe an den Tagen 14 und 28 signifikant größer war als in der LacZ-Gruppe. Zusätzlich spricht für eine NO-Beteiligung, dass VEGF die NO-Synthese in Endothelzellen fördert, jedenfalls wird dieser Mechanismus für die permeabilitätssteigernde Wirkung von VEGF postuliert (Murohara et al. 1998).

Eine veränderte Bioverfügbarkeit von NO könnte auch verantwortlich sein für die beobachteten Veränderungen der Matrix-Komposition in Bezug auf den signifikant erhöhten Elastingehalt und den tendenziell erhöhten Kollagengehalt in der VEGF-Gruppe. So ist zum Beispiel bekannt, dass NO die Tropoelastin-Synthese steigert, und zwar über die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Protein-Kinase. Auch die Expression der für die Elastin-Quervernetzung verantwortlichen Lysyl-Oxidase wird durch NO gesteigert, zumindest in glatten Gefäßmuskelzellen (Sugitani et al. 2001). Zusätzlich veranlasst NO Fibroblasten zur Steigerung der Kollagen-Synthese und moduliert die Gesamtproteinexpression (inkl. Kollagen) in glatten Gefäßmuskelzellen (Witte et al. 2000; Kolpakov et al. 1995).

Gesunde, unverletzte Koronararterien sind normalerweise von einer feinen Tunica externa (hier Adventitia genannt) umgeben, die differenziert werden muss vom lockeren Binde- und Fettgewebe in der äußersten Schicht einer Arterie. Diese dünne Schicht dichten Bindegewebes, bestehend aus der Lamina elastica externa, *Vasa vasorum*, Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix, enthält relativ viel Elastin (~ 29 %). Eine Ballondilatation provoziert die bindegewebige Verdichtung des peripheren, lockeren Gewebes, so dass die Adventitia an Fläche zunimmt. Diese neue Adventitia enthält relativ zur Fläche weniger Elastin als die ursprüngliche Adventitia unverletzter Gefäße, was die Auswertungen der unverletzten Kontrollgefäße und der beiden Behandlungsgruppen auch bestätigten. Überraschenderweise enthielt die VEGF-Gruppe zu beiden ausgewerteten Zeitpunkten (14 und 28 Tage) signifikant mehr Elastin als die LacZ-Gruppe. Welche Funktion das Elastin in der Entstehung des positiven

Remodelings hat, ist nicht bekannt, es ist jedoch wahrscheinlich, dass ein höherer Elastingehalt die Dehnungsfähigkeit der Arterienwand heraufsetzt. Diese Theorie wird unterstützt von der Studie von Stefanadis et al., in der beobachtet wurde, dass die Entfernung von *Vasa vasorum* zu einer verringerten Dehnbarkeit der Aorta bei gleichzeitiger Verringerung des Elastingehalts führte (Stefanadis et al. 1995). Die Lamina elastica externa, in ihrer Eigenschaft als Hauptträger des adventitiellen Elastins, ist somit möglicherweise ein ganz wichtiger Faktor für die Entwicklung des arteriellen Remodelings (Kwon et al. 1999).

Die Behandlungsgruppen unterschieden sich auch hinsichtlich ihres Gesamt-Kollagengehalts, wobei Kollagen offensichtlich schneller nachproduziert wurde als Elastin, denn teilweise wurden bereits am Tag 14 nach Intervention die gleichen Werte gemessen wie bei unbehandelten Kontrollgefäßen, obwohl auch Kollagen als relativer Wert erhoben wurde und somit abhängig war von der anwachsenden Adventitiafläche. Der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen war allerdings nur am Tag 14 signifikant, am Tag 28 war nur die Tendenz zu mehr Kollagen in der VEGF-Gruppe zu erkennen. Diese Daten stehen im Widerspruch zu einer Studie von Ward et al., die im Schweinmodell beobachteten, dass die Unterdrückung von negativem Remodeling assoziiert war mit einer Abnahme des Kollagengehalts (Ward et al. 2001). Kingston et al. berichteten dagegen, dass eine dichte, kollagenhaltige Adventitia das negative Remodeling verhindern kann, indem sie ein "äußeres Gerüst" bildet, und beobachteten in ihrem Gentransfer-Versuch mit TGF β 3 ebenfalls einen reduzierten Lumenverlust und positives arterielles Remodeling (Kingston et al. 2001; Kingston et al. 2003). Allerdings ist es denkbar, dass nicht der Gesamt-Kollagengehalt der Arterienwand das Remodeling bestimmt, sondern eher die räumliche Verteilung und Quervernetzung der Kollagenfibrillen. Auch Verschiebungen im Typen-Verhältnis sind möglicherweise für das Remodeling bedeutsam, so beeinflusst beispielsweise die Verschiebung von Kollagen Typ I : Typ III die Flexibilität des Herzmuskels bei der dilatativen Kardiomyopathie (Pauschinger et al. 1999).

Einen wichtigen Beitrag zum negativen Remodeling der LacZ-Gruppe leistet möglicherweise der zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tage nach Intervention in dieser Gruppe beobachtete signifikant höhere Gehalt an adventitiellen Myofibroblasten bzw. an α -Aktin-positiver Fläche. Durch die Ballondilatation und konsekutive Verletzung der Arterienwand wird in adventitiellen

Zellen (unter ihnen vor allem Fibroblasten, aber auch Perizyten und glatte Muskelzellen) die phänotypische Differenzierung zu Myofibroblasten induziert (Zalewski & Shi 1997). Von Myofibroblasten gibt es mehrere Phänotypen, die sich hinsichtlich ihrer Expression von Vimentin, α -Aktin, Desmin und Myosin (schwere Kette) unterscheiden. In Granulations- und Reparationsgewebe taucht der α -Aktin-exprimierende Myofibroblasten-Phänotyp vorwiegend zwischen Tag 8 und 15 auf, vorher ist nur der Vimentin-exprimierende Phänotyp vorhanden. Am Tag 30 der Gewebereparatur ist der α -Aktin-Phänotyp kaum mehr vorhanden, was anzeigt, dass dieser Typ nur temporär in Erscheinung tritt; sein Verschwinden wird wahrscheinlich durch Apoptose bewirkt (Schurch et al. 1998). Myofibroblasten exprimieren kontraktile Proteine und Oberflächenintegrine, mit denen sie die extrazelluläre Matrix zusammenziehen und somit die Größe der Wunde reduzieren können (Geary et al. 1998; Darby et al. 1990). Es wird vermutet, dass die Anwesenheit dieser Zellen einen Mechanismus des negativen Remodelings darstellt, der sich nach einer Ballonangioplastie durch Kontraktur des Gefäßes manifestiert (Post et al. 1994; Kakuta et al. 1994; Lafont et al. 1995; Scott et al. 1996). Der Signalweg, über den die VEGF-Gruppe die Reduktion der adventitiellen Myofibroblasten induziert, ist bisher nicht bekannt, es ist aber denkbar, dass die stärkere adventitielle Hypoxie in der LacZ-Gruppe die Proliferation von Myofibroblasten stimuliert.

In beiden Behandlungsgruppen konnte bereits am Tag 1 nach Intervention die Einwanderung von Makrophagen in die Adventitia beobachtet werden. Diese frühe Entzündungsantwort kann als Initiator des Reparaturprozesses angesehen werden und ist wichtig für die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (z.B. für das Abräumen der anfallenden Matrix-Fragmente) (Singer & Clark 1999). In der VEGF-Gruppe war am Tag 7 der Trend zu einem erhöhten Makrophagengehalt zu verzeichnen, was durch die Aktivierung des Makrophagen-rekrutierenden VEGFR-1 erklärt werden kann (Bhardwaj et al. 2003), und auch für eine Steigerung der reparativen Prozesse in der VEGF-Behandlungsgruppe sprechen könnte. Diese Annahme wird unterstützt von der Tatsache, dass in der VEGF-Gruppe auch signifikant mehr T-Zellen in der Adventitia vorhanden waren (drei- bis viermal mehr als in der LacZ-Gruppe). Eine mögliche Erklärung für die höhere T-Zell-Dichte in der VEGF-Gruppe könnte der höhere Gehalt an proliferierenden Endothelzellen in der Adventitia sein, denn es ist bekannt, dass aktivierte Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 (vascular cell

adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und E-selectin exprimieren, mit denen sie die Aktivierung von Leukozyten und ihre Rekrutierung zum Entzündungsort verstärken (Assiri et al. 2001). Darüberhinaus sind T-Lymphozyten selbst in der Lage VEGF zu produzieren, so dass ein positiver "Feedback"-Mechanismus zwischen transfiziertem VEGF und Entzündungszellen möglicherweise den Angiogenese-Prozess verstärkt und dadurch zu einem rascheren Voranschreiten des arteriellen Heilungsprozesses führt.

Abschließend stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf die klinische Situation übertragbar sind. Eine wesentliche Limitation dieser Studie liegt in der Tatsache, dass das positive Remodeling in Gefäßen beobachtet wurde, die nicht arteriosklerotisch verändert waren. Zwar ähnelt die Reaktion der Gefäßwand auf eine Ballon-Verletzung der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit (z.B. hinsichtlich Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen/Myofibroblasten und der Inflammation), schwere, kalzifizierte Läsionen, wie sie bei Patienten zu finden sind, treten jedoch nicht auf. Eine solche, "echte" Läsion hätte den VEGF-Transfer in die Adventitia möglicherweise erschwert und den biologischen Effekt von VEGF nachteilig beeinflusst. Es ist allerdings auch bekannt, dass die adaptiven Gewebsreaktionen zur Verhinderung einer Stenose ("compensatory enlargement") eher von den Plaque-freien Abschnitten einer Arterie ausgehen als von den erkrankten Abschnitten (Gravanis & Roubin 1989).

Der in dieser Studie verwendete Nadelinjektionskatheter bot zwar als einer von wenigen Kathetern die Möglichkeit der hocheffizienten adventitiellen Medikamentapplikation, seine Anwendung im arteriosklerotisch veränderten Gefäß birgt jedoch Risiken. Zum einen ist es denkbar, dass die rigide Spitze des Katheters nicht in verwinkelten oder stark stenosierten Gefäßen platziert werden kann. Zum anderen müssten die Kanülen des Nadelinjektionskatheters durch die arteriosklerotisch veränderte Gefäßwand hindurch dringen, wobei thrombogenes Material aus dem Plaque (Lipid, Kalk, Kollagen, usw.) freigelegt und in Kontakt mit Blut kommen könnte, was prothrombotisch wirken könnte. Ein sicherer, minimalinvasiver adventitieller Gentransfer erscheint mit diesem Katheter problematisch. Dennoch ist die perivaskuläre Verabreichung von VEGF-Plasmid ein vielversprechender Ansatz um die Vaskularisierung in ischämischem Gewebe zu verbessern. Es konnten mit dieser Methode schon eindeutige Erfolge erzielt werden, z.B. die Entwicklung von neuen Seitenästen in

peripheren Arterien und die verstärkte Bildung von Kollateralgefäßen nach induzierter Koronarokklusion im Schwein (Nikol et al. 2002).