Transgene Ratten als Modell für Hypertonie und kardiovaskuläre Endorganschädigung

Martin Paul

Freie Universität Berlin, Klinikum Benjamin Franklin, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin

Verschiedene Kandidatengene für die primäre Hypertonie wurden in den letzten Jahren identifiziert. Genetische Analysen konnten zeigen, daß diese Gene mit der Pathogenese der Hypertonie bei Tiermodellen oder bei Menschen assoziiert sind. Transgene Tiermodelle können einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Funktion dieser Gene in vivo leisten. Die transgenen Techniken können bei vielen Tierspecies eingesetzt werden, wurden aber bisher hauptsächlich bei Mäusen angewandt. Transgene Tiere werden entwickelt, um die Funktion von Genen in vivo zu testen und neue Modelle zur Untersuchung genetisch determinierter Erkrankungen zu schaffen. Bei diesen Tieren wird das genetische Material verändert durch Methoden, die über klassische Zuchtansätze hinausgehen, wie zum Beispiel durch direkte Mikroinjektion in den Pronukleus der befruchteten Eizelle. Die so behandelten Oozyten werden dann in den Uterus oder in den Eileiter einer scheinschwangeren Ammenmutter implantiert. In der Nachkommenschaft dieser Amme wird die Gegenwart des Transgens in Schwanz- oder Ohrbiopsaten durch Southern-Blot-Hybridisierung oder Applikationstechniken (PCR) überprüft. Die transgene Technologie ist seit einiger Zeit in der biomedizinischen Grundlagenforschung fest verankert und wird am häufigsten im Mausmodell eingesetzt. Zahlreiche transgene Mauslinien wurden bisher entwickelt und charakterisiert. Die transgene Maus ist als Modell jedoch nur in bestimmten Fällen geeignet, da für zahlreiche Phänotypen die Charakterisierung von Mäusen technisch diffizil und schwer durchführbar ist. Im Gegensatz dazu bietet die Ratte einige Vorteile. Die Technologie der integrativen Physiologie und der Pharmakologie ist im Rattenmodell weit verbreitet und bestens etabliert. Darüber hinaus ist die primäre Hypertonie vor allem in Ratten charakterisiert worden, zum Beispiel in den sogenannten spontan hypertensiven Ratten (SHR). Mäuse mit genetisch bedingter Hypertonie wurden nur in Einzelfällen beschrieben. Aus dieser Überlegung heraus erschien es sinnvoll, die transgenen Techniken auch auf die Ratte zu übertragen. Dies geschah initial bei der Erforschung von rheumatischen Erkrankungen wie auch in der kardiovaskulären Forschung. Bei letzteren stand vor allem die Untersuchung von Kandidatengenen für Hypertonie im Vordergrund.

Die Erforschung der Pathophysiologie der primären Hypertonie im transgenen Rattenmodell machte sich die Informationen, die bereits über bestimmte Kandidatensysteme bestanden, zunutze. Klassische Vasokonstriktorsysteme, wie das Renin-Angiotensin-System (RAS), aber auch neuere Gene, wie die des Endothelinsystems, zeigten sich hier als ideale Kandidaten. Im Folgenden sollen transgene Rattenmodelle, die für zwei wesentliche Kandidatensysteme der primären Hypertonie entwickelt wurden, diskutiert werden.

Transgene Rattenmodelle, die Komponenten des RAS überexprimieren

Das erste transgene Rattenmodell in der Hypertonieforschung wurde von Mullins, Peters und Ganten entwickelt. Hier wurde das Mäuse-*Ren*-2-Gen als genomisches Konstrukt in der Ratte überexprimiert. Dieses Gen wurde aus bestimmten Mäusestämmen isoliert, die zwei Renin-Gene besitzen (*Ren*-1 und *Ren*-2). Während *Ren*-1 vor allem in der Niere in hohem Maße exprimiert wird, ist *Ren*-2, das im Gegensatz zu *Ren*-1 für ein nicht-glykoseliertes Reninprotein kodiert, vor allem in extrarenalen Geweben, wie zum Beispiel in der Glandula submaxiliaris, zu finden. Das *Ren*-2-Gen wurde bereits in früheren Untersuchungen erfolgreich in transformierten Zellen und in transgenen Mäusen zur Expression gebracht, so daß auch hier eine erfolgreiche Integration im Rattengenom erwartet werden konnte. Es gelang, mit diesem Genkonstrukt eine Reihe von transgenen Rattenlinien zu erzeugen. Diese waren charakterisiert durch die Entwicklung einer fulminanten Hypertonie mit Blutdruckwerten von bis zu 250 mmHg bei heterozygoten männlichen Tieren und noch höheren Werten (bis zu 300 mmHg) bei homozygoten männlichen Tieren. Die Tiere zeigen einen ausgeprägten sexuellen Dimorphismus, der sich darin äußert, daß die Blutdruckwerte bei Weibchen um 20–30 mmHg geringer sind. Expressonsanalysen bei den transgenen Tieren zeigten, daß das Transgen vor allem in extrarenalen Geweben exprimiert wurde, was auch dem Expressionsmuster des nativen *Ren*-2-Gens entspricht. Die Expression in der Niere, dem klassischen Ort der Reninbiosynthese, ist geringer als bei Kontrolltieren. Die Plasmaspiegel des RAS variieren jedoch stark und sind nur in bestimmten Altersgruppen erhöht. Sie korrelieren jedoch nicht mit der Entwicklung der Hypertonie. Daraus wurde geschlossen, daß bei diesem Modell vor allem eine Aktivierung der extrarenalen Renin-Angiotension-Systeme vorliegt. Die höchsten Expressionsspiegel für das Transgen und das daraus resultierende Protein wurden in der Nebenniere gefunden. Möglicherweise führen erhöhte Angiotensin-

Hinweis: Die Anschriften der Referenten resp. Autoren aller Beiträge sind am Schluß der Dokumentation auf S. 339 zusammengefaßt aufgeführt.

II-Spiegel in der Nebenniere dazu, daß es über die Aktivierung von adrenalen Steroiden zu einer Veränderung der Blutdruckregulation kommen kann. In letzter Zeit wurden auch die kardiovaskulären Parameter dieser transgenen Tiere genau untersucht. So konnte gezeigt werden, daß das Gefäßsystem, sowie das Herz, erhöhte Reninspiegel produziert, die auch hier zu Veränderungen im lokalen Bereich führen können. Die Tiere zeigen eine ausgeprägte kardiovaskuläre Hypertrophie mit Zeichen des Remodeling und entwickeln sowohl funktionelle als auch biochemische Zeichen einer Herzinsuffizienz. In weitergehenden Untersuchungen konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß es bei diesen Tieren zu einer deutlichen Stimulation des inhibitorischen G-Proteins Gi α kommt, das als biochemischer Marker für Herzinsuffizienz gilt. Darüber hinaus sind Bindegewebsmarker, wie Kollagene und Fibronectin, deutlich vermehrt. Es besteht natürlich die Frage, inwieweit es sich bei diesen Veränderungen um Konsequenzen des erhöhten Blutdrucks handelt oder ob die lokale Expression des RAS im kardiovaskulären System zur Pathophysiologie beitragen kann. In einer ausführlichen Studie wurden daher die transgenen Tiere nicht nur mit den normotensiven Kontrolltieren, sondern auch mit hypertensiven Ratten des Stammes SHR verglichen, die einen den transgenen Tieren ähnlichen Blutdruck aufwiesen. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß funktionelle Parameter der Herzfunktion auch unterschiedlich zu den hypertensiven Kontrolltieren waren, was für eine direkte Beteiligung des RAS im Herzen spricht. Weiterhin wurden diese Tiere zu pharmakologischen Studien herangezogen, bei denen die Wirkung verschiedener antihypertensiver Pharmaka untersucht werden konnte. So konnte gezeigt werden, daß bei diesen Tieren extrem effektive Wirkungen von Substanzen, die das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) hemmen bzw. den Angiotensin-II (AT_2)-Rezeptor blockieren, es zu einer deutlichen Senkung des Blutdrucks kam, wie auch zu einer Reduktion der pathophysiologischen Veränderungen. Diese Effizienz konnte mit anderen Antihypertensiva, wie zum Beispiel Dihydralazin oder Spironolacton nicht erreicht werden. Daraus wurde gefolgert, daß es sich bei diesem Modell auch um ein Tiermodell handeln kann, das zur Evakuierung spezifischer Therapiemaßnahmen, die auf das RAS gerichtet sind, dienen kann.

Transgene Ratten, die Komponenten des Endothelinsystems überexprimieren

Die Peptidfamilie der Endotheline besteht aus drei Peptiden (Endothelin-I, -II und –III), die stark vasokonstriktorisch wirken. Zunächst wurde Endothelin-I aus den Endothelzellen von Rindern isoliert, kloniert und charakterisiert. Die Endotheline vermitteln ihre Wirkungen über 2 Rezeptoren, den ET_A-Rezeptor, der vor allem auf glatten Muskelzellen zu finden ist und ET_A-Rezeptor, der zuerst auf Endothelzellen beschrieben wurde. Die Bindung von Endothelinen an den ET_A-Rezeptor führt zur Vasokonstriktion. Eine Stimulation des ET_B-Rezeptors hat eine kurze vasodilatatorische Antwort zur Folge, die wahrscheinlich durch eine Aktivierung von cGMP nach Freisetzung von Stickoxid (NO) hervorgerufen wird. Auch mitogene Eigenschaften der Endotheline wurden im kardiovaskulären System beschrieben. Diese werden wahrscheinlich ebenfalls über den ET_A-Rezeptor vermittelt. Aufgrund seiner starken vasokonstriktorischen Eigenschaften wurde vermutet, daß den Endothelinen eine mögliche Rolle bei der Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen zukommen kann. Hierzu zählen nicht nur Hypertonie, sondern auch Arteriosklerose, sowie ischämische Erkrankungen im karidovaskulären System. Diese Vermutung konnte untermauert werden durch die Tatsache, daß die intrakoronarielle Injektion von Endothelin zu einem letalen Koronarspasmus im Schweinemodell führte. Nicht nur im kardiovaskulären System, sondern auch in anderen Organen wurden den Endothelinen pathophysiologische Wirkungen zugeschrieben. Im Gehirn könnte das System bei ischämischen Zuständen eine Rolle spielen. Pharmakologische Untersuchungen haben dazu geführt, daß Endothelinrezeptorenantagonisten möglicherweise die Folgezustände von Subachnoidalblutungen deutlich verbessern können. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß eine „Missense" Mutation des ET_B-Rezeptors bei Morbus Hirschsprung kausal beteiligt ist. Trotz dieser Befunde ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems im kardiovaskulären System nach wie vor ungeklärt.

In einem weiteren Ansatz wurde daher ein genomisches Konstrukt des humanen Endothelin-II-Gens eingesetzt. Endothelin-II ist in seiner Expression viel gewebsspezifischer als Endothelin-I. Beim Menschen finden sich hohe Expressionsspiegel vor allem im Gastrointestinaltrakt, während die Expression in kardiovaskulären Organen, wie den Blutgefäßen und dem Endothel, nur gering ist. In pharmakologischen Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, daß injiziertes Endothelin-II fast genauso stark auf den Blutdruck wirkt wie Endothelin-I. Es wurden mehrere transgene Linien mit diesem Konstrukt gewonnen, die das humane Endothelin-II-Gen in mehreren Organen, wie Niere und Gehirn, exprimierten. Die Plasmaspiegel von Endothelin-II waren etwa fünffach erhöht. Dennoch waren diese Tiere nicht hypertensiv. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden zunächst die Rezeptoren des Endothelinsystems untersucht, da eine Desensitisierung oder Herabregulierung des ET_A-Rezeptors als mögliche Ursache gesehen wurde. Interesseanterweise waren die Rezeptoren jedoch nicht vermindert oder in ihrer Funktion eingeschränkt. Als zweite Hypothese wurde untersucht, inwieweit vasodilatatorische Systeme, wie das Stickoxidsystem, als Gegenspieler des Endothelinsystems zu einer Normalisierung des Blutdrucks in diesem chronischen Modell beitragen konnten. Die Infusionen des Inhibitors der Stickoxidsynthase, L-NAME, zeigte, daß eine deutlich stärkere blutdrucksteigernde Wirkung als bei nicht transgenen Ratten gesehen wurde. Darüber hinaus war die Expression von NO-Synthase im kardiovaskulären System ebenfalls erhöht. Dies war in der Tat ein Hinweis dafür, daß dieses System als Gegenspieler von Endothelin in diesem transgenen Modell auftreten kann. Um die Wirkungen des Endothelin-Transgens auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde zunächst die Morphologie der Niere als Ziel ausgewählt. Hier zeigten sich nach 3–6 Monaten chronische, langsam beginnende Veränderungen, die mit interstitieller Fibrose sowie glomerulären und tubulären Veränderungen einhergingen. Nach 6 Monaten zeigt sich bei den Tieren eine deutliche Erhöhung des Glomerulosklerose-Index, sowie eine beginnende Niereninsuffizienz. Diese Befunde führten zu dem Schluß, daß Endothelin-II bei diesen transgenen Tieren vor allem als renaler Wachstumsfaktor wirkt, der unabhängig vom Blutdruck aktiv ist.

Zusammenfassung und Ausblick

In der karidovaskulären Grundlagenforschung sind transgene Ratten als Modelle mittlerweile gut etabliert. Ihr Hauptbeitrag ist die Untersuchung komplexer Regulationssysteme in einem In-vivo-Modell, wobei insbesondere andere regulative Systeme und gegenregulative Mechanismen betrachtet werden können wie hier am Beispiel der transgenen Tiere mit Überexpression des Renin- oder Endothelin-Gens exemplarisch aufgezeigt wurde. Die Interaktion Endothelin und Stickoxid sind hier nur als Beispiel genannt. Insoweit gehen die Befunde, die wir im transgenen Modell erhalten können, weit über die Ergebnisse, die zum Beispiel in transfizierten Zellsystemen werden können, hinaus. Die Expression menschlicher Gene ergibt weiterhin die Möglichkeit, die transgenen Modelle zur Untersuchung humanspezifischer Pharmaka einzusetzen. Hier können sie die früher oft eingesetzten privaten Modelle weitgehend ersetzen und leisten einen Beitrag zur Eingrenzung unspezfischer Tierversuche. Es bleibt die Frage, inwieweit diese transgenen Modelle auch als Modelle für menschliche Krankheiten gelten können. Dies ist sicher nur in einigen Fällen möglich. Der Beitrag dieser Tiermodelle könnte aber sein, daß das Augenmerk des Untersuchers auf pathophysiologische Mechanismen gerichtet wird, die sonst nicht auffallen würden. Als Beispiel sei hierfür nur das sogenannte Knockout Mausmodell des Endothelin$_B$-Rezeptors genannt, das zu einer pathophysiologischen Veränderung ähnlich der des Morbus Hirschsprungs geführt hat und in Untersuchungen beim Patienten mit Morbus Hirschsprung bestätigt hat, daß hier eine Mutation des ET_B-Rezeptors vorliegt. Zukünftige Untersuchungen bei der Ratte werden ebenfalls auf diese „Knockout"-Technologie zielen, um hier weitere grundlegende genetische Mechanismen aufzuklären.

Literatur

[1] Böhm, M., Moll, M., Schmid, B. et al., α-Adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. Hypertension **24,** 653 (1994)

[2] Paul, M., Hoffmann, S., Urata, H. et al., Transgenic animals in cardiovascular research. Ann. Rev. Physio. **56,** 811 (1994)

[3] Paul, M., Franz, W.-M., Transgenic animal models in hypertension research. Trends Cardiovasc. Med. **5,** 108 (1995)

[4] Pinto, Y. M., Buikema, H. van Gilst, W. H. et al., Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. J. Mol. Med. **75,** 371 (1997)

[5] Hocher, B., Liefeldt, L., Thöne-Reinecke, C. et al., Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. Hypertension **28,** 196 (1996)

Transgenic and/or Knock-out Animals in Atherosclerosis Research

Daniel Guerrier

Lipha s.a., Research and Development Centre, Lyon-Lacassagne (France)

Cardiovascular disease remains the most serious threat to life and health in the main developed countries of the world. Approximately one third of men develop a major cardiovascular disease before the age of 60, women having a lower risk 1 in 10. In the elderly (after the age of 65 women become as vulnerable to cardiovascular disease as men), the disease is an expanding problem. In the early sixties, the term "risk factor" was defined as a measurable characteristic that predicts probability of developing clinically the disease. For atherosclerosis, it could be an environmental agent (smoking), an interventing variable (serum cholesterol) resulting from an environmental agent (dietary lipids) or a genetic variant (lipoprotein receptor deficit), another disease (diabetes) or preclinical manifestation (ECG).

This pragmatic approach of patient classification in terms of risk factors considerably improved the knowledge of etiologic factors responsible for the disease and stimulated the fundamental research. One of the results was to define: "atherosclerosis has a process that is the principal contributor to the pathogenesis of myocardial and cerebral infarction, gangrene and loss of function in the extremities". This is an active process involving the factors of chronic inflammation associated with those of repair in the artery wall. This process was summarised as follows: "inflammatory-fibroproliferative response to injury process".

The associated fundamental research in the last forty years moved from serum lipids to lipoprotein analysis, then to the apoprotein part of lipoprotein to fi-

nally conduct to genomic regulation. This knowledge improvement highlighted the involvement of vessel in this process: endothelial dysfunction as an early event, macrophages, smooth muscle cells and lymphocytes as major cell players.

The new drug discovery challenge consists in mimicking in animals the patient pathophysiology. The difficulty of this objective is to achieve a long time process like atherosclerosis. Diet models have been the reference model in drug research since 1913 after description of "fat lesions" development by feeding cholesterol to rabbits (Anitschkow and Chalatow 1913). Researchers have tried to use smaller animals like rodents for practical reasons. But rodents (mainly rats and mice) are poor predictable models with a very low susceptibility to atherosclerosis. This specificity can be today explained by the different lipoprotein patterns of this species compared to humans. More recently, the hepatic regulation of lipids through Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR's) confirmed the discrepancy between rodents and humans.

In the eighties, animal models moved from diet models to genetic models. The major contributor was the "Watanabe" rabbit with low density lipoprotein (LDL) receptor deficit mimicking familial hypercholesterolemia. Developing atherosclerotic plaques which closely resemble those in humans, this genetically deficient rabbit has been mainly used for statins development.

Transgenic technology appeared at the beginning of last decade. This technology enables today to produce knock-out (KO) animal corresponding to the destruction of a targeted gene or to produce animals with human gene expression. The progressively improved knowledge of the pathways of cholesterol and triglyceride metabolism has conducted to detailed information on the role of plasma lipoproteins in lipid transfer and the specific function of lipoprotein receptors, enzymes, transfer proteins and apolipoproteins in metabolism. The transgenic technology (principally in mice) has provided new opportunities to study how the (human) genes of these numerous actors are expressed in an intact organism. Since the beginning of the nineties, these altered mice have been a new tool to develop animal models of lipoprotein disorders associated or not with atherosclerosis susceptibility. Furthermore, for pharmaceutical industry, these new animals provide a new area for drug discovery.

Four different panels mimicking some typical patient profiles have been obtained with transgenic mice. The first determine an increase in LDL cholesterol levels (LDL KO or apoB mice). Reduced high density lipoprotein (HDL) cholesterol and elevated triglycerides were obtained with $apoA_1$, LPL (lipoprotein lipase), $apoC_{III}$ and CETP (cholesterol ester transfer protein) transgenic mice. ApoE KO mice produce elevated chylomicron remnants and IDL (intermediate density lipoprotein) cholesterol. The fourth panel is characterised by elevated lipoprotein (a).

"Human" transgenic animals offered a better pharmacological predictability related to the patient abnormalities. A clear cut demonstration was done with fibrates. In non transgenic mice, these compounds decrease $apoA_1$ (HDL main apoprotein). In human $apoA_1$ mice, fibrates increase human $apoA_1$ expression. This result demonstrates the different genomic regulation of PPAR's between humans and mice. Nevertheless, in some cases, opposite results can be obtained with expression of the same gene in different species. For example, overexpression of LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) in mice increased susceptibility to atherosclerosis whereas opposite results were obtained in LCAT rabbits. This difference is explained by the fact that CETP activity is expressed in rabbits (like humans) and not in mice.

Among all these transgenic animals, only the apoE KO mice develop spontaneously diffuse fibroproliferative atherosclerotic lesions like those in humans.

In conclusion, transgenic animal models (mainly mice) offer to the pharmaceutical industry a challenge for new drug discovery with higher predictability, but this potential must be demonstrated in patients.

References

Fuster, V., Ross, R., Topol, E. J., Atherosclerosis and coronary artery disease. Lippencott-Raven Publishers, Philadelphia (1996)

Stary, H. C., Chandler, A. B., Chagov, S., A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. Circulation **89,** 2462 (1994)

Anitschkow, N., Chalatow, S., Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. Zentralbl. Allg. Pathol. Anat. **24,** 1 (1913); [Anitschkow, N., Chalatow, S.,On experimental cholesterin steatosis and its significance in the origin of some pathological processes. Arterioscleros is **3,** 178 (1983)]

Besse, R., Fleming, I., Endothelial dysfunction in atherosclerosis. J. Vas. Res. **33,** 181 (1996)

Segrest, J. R., Anantharamaiah, Pathogenesis of atherosclerosis. Curr. Opinion Cardiol. **9,** 404 (1994)

Breslow, J. L., Mouse models of atherosclerosis. Science **272,** 685 (1996)

Berthou, L., Ouverger, N., Emmanuel, F., Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein Al by fibrates in human apolipoprotein Al transgenic mice. J. Clin. Invest. **97,** 2408 (1996)

Schoonjans, K., Auwerx, J., Role of the peroxisome proliferator-activateds receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. J. Lipid Res. **37,** 907 (1997)

Animal Models of Heart Failure in Preclinical Development

S. Hergenröder, K. Münter, M. Kirchengast, A. Hahn, and H. Riechers

BASF Pharma, Ludwigshafen (Germany)

Heart failure is a pathophysiological syndrome characterized by the inability of the heart to supply sufficient cardiac output to meet the metabolic needs of the organism. In humans this syndrome has many underlying reasons, ranging from primary myocardial disease of often unknown origin to secondary cardiac hypertrophy as a result of ventricular overload in hypertension, valvular heart disease, or myocardial infarction. The resulting cardiac hypertrophy is accompanied by changes in the autonomic nervous system, production of endothelins, and the renin-angiotensin-aldosterone system which lead to salt and water retention and vasoconstriction. In order to investigate these severe clinical conditions animal models of heart failure have been developed over the last decades. An ideal animal model should mimic human disease and should be easy to reproduce. Chronical stability for longterm treatment and the possibility of measurement of cardiac function are very important.

To date no single model completely fulfills these criteria, although their use for addressing specific pathophysiologic mechanisms in undoubted. Animal models are used for e.g. dilatative cardiomyopathy and congestive heart failure (CHF). Dilated cardiomyopathy occurs in certain strains of hamsters [1] or salt-senstive hypertensive rats. Induced dilatative cardiomyopathy is produced by chronic rapid supraventricular pacing leading to ventricular dilatation and dysfunction, impairment of myocardial contractility and neurohumoral activation with peripheral vasoconstriction [2]. The most common etiology of CHF is coronary artery disease, therefore coronary artery ligation and microembolization in rats, dogs and pigs are widely used animal models [3]. In addition models of cardiomyopathy induced by both pressure and volume overload have been established. Pressure overload induced by aortic constriction induces left ventricular hypertrophy followed by left ventricular (LV) failure [4]. Volume overload is provoked by a surgical arteriovenous shunt initially leading to LV hypertrophy followed by dysfunction and finaly heart failure [5].

Endothelin-1 (ET-1) is a 21 amino acid peptide with potent biological activities. It is synthesized locally in several tissues including the vasculature. Production and release of endothelin is stimulated by many factors under physiological and pathophysiological conditions. Binding of ET-1 to smooth muscle ET_A receptors causes vasoconstriction and stimulation of vascular smooth muscle cell growth and proliferation. To investigate the role of ET-1 in heart failure the orally active ET_A receptor antagonist LU 135252 ((+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenylpropionic acid) [6] was used chronically p.o. in the following animal models: CHF in rats, pacing induced heart failure in dogs, and pressure overload in rats.

In CHF rats oral treatment with LU 135252 for one month significantly improved secondary pulmonary hypertension by reducing right ventricular enddiastolic and systolic pressure. As these parameters are not influenced by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, this implies a possible significant benefit for patients suffering from severe CHF, as 70 % of those have increased pulmonary resistance and develop life-threatening pulmonary hypertension. In the model of dilatative cardiac hypertrophy in dogs oral treatment with LU 135252 for a period of 2 weeks significantly improved left and right ventricular cardiodynamics and, most importantly, significantly increased cardiac output by almost 30 % over untreated controls, thus resulting in a marked haemodynamic improvement in this severe cardiac pathology. Last, but not least, in pressure overload induced heart failure in rats with renal artery stenosis chronic oral LU 135252 could markedly reduce the development of cardiac hypertrophy independent of concomitant hypertension.

In summary, ET_A receptor antagonism by chronic oral treatment with the new compound LU 135252 was able to reduce cardiac hypertrophy and improve haemodynamics in all animal models tested so far. Due to these promising preclinical results LU 135252 was chosen for clinical development in CHF. Having entered recently Phase II clinical trials, the clinical test of LU 135252's efficacy in heart failure is imminent. We hope that ET_A receptor antagonism will bring significant benefit for patients suffering from this truly life-threatening condition.

References

[1] Panchal, B. C., Trippodo, N. C., Systemic and regional hemodynamic in conscious BIOTO-2 cardiomyopathic hamsters. Cardiovasc. Res. **27,** 2264 (1993)

[2] Shinbane, J. S., Wood, M. A., Jensen, D. N. et al., Tachycardia-induced cardiomoypathy: A review in animal models and clinical studies. JACC **29,** 709 (1997)

[3] Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ. Res. **44,** 503 (1979)

[4] Feldman, A., Weinberg, E. O., Ray, P. E. et al., Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. Circ. Res. **73,** 184 (1993)

[5] Liu, Z., Hilbelink, D. R., Gerdes, A. M., Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas: long-term effects. Circ. Res. **69,** 59 (1991)

[6] Münter, K., Hergenröder, S., Unger, L. et al., Oral treatment with an ET_A-receptor antagonist inhibits neointima formation induced by endothelial injury. Pharm. Pharmacol. Lett. **6,** 90 (1996)

Von Modellen zu Molekülen: Auf der Suche nach Schlaganfalltherapien

Laszlo Szabo

Knoll AG, Neuropharmakologie, Ludwigshafen

Unter einem Schlaganfall versteht man das plötzliche Auftreten von neurologischen Defiziten infolge einer gestörten Blutversorgung des Gehirns. Bei einer jährlichen Inzidenz von annähernd 2 pro 1000 erleiden allein in den Vereinigten Staaten jedes Jahr etwa 500 000 Menschen einen Schlaganfall. Die Mortalität der Erkrankung ist hoch, und viele Patienten überleben nur mit bleibenden Schäden.

In Anbetracht dieser Zahlen sowie des Fehlens einer wirksamen und zugleich ausreichend verträglichen Therapie stellt der Schlaganfall ein attraktives Gebiet für die forschende pharmazeutische Industrie dar; die nihilistische Einstellung der Mediziner zur Schlaganfalltherapie hat den Einstieg jedoch lange hinausgezögert. Die Situation änderte sich Anfang der 80er Jahre, als Grundlagenforscher gezeigt haben, daß in bestimmten Tiermodellen des Schlaganfalls irreversible Schäden häufig erst mehrere Stunden bis Tage nach dem ischämischen Insult auftreten und damit prinzipiell einer Therapie zugänglich sein müßten.

Als einfachster Weg zur Auffindung von therapeutisch wirksamen Substanzen, generell als Neuroprotektiva bezeichnet, erschien der Einsatz von stark vereinfachten Tiermodellen, die einen relativ hohen Substanzdurchsatz ermöglichen. In der Tat konnten auf diese Weise Stoffklassen identifiziert werden, die beispielsweise das Überleben von Versuchstieren unter starker Hypoxie signifikant verlängern. Die anschließenden erfolglosen klinischen Prüfungen haben jedoch gezeigt, daß die Relevanz derartiger Modelle gering ist.

Auch in der Schlaganfallforschung können Tiermodelle zwei grundsätzliche Aufgaben erfüllen: (1) die Untersuchung der Pathophysiologie der Erkrankung und damit die Identifizierung von potentiellen therapeutischen Eingriffsmöglichkeiten sowie (2) die tatsächliche Prüfung des aus dieser Hypothese resultierenden therapeutischen Ansatzes. Da die Therapie jedoch aus demselben Modell abgeleitet ist, das später auch zum Wirksamkeitsnachweis herangezogen wird, stellt diese Vorgehensweise gewissermaßen eine zirkuläre Argumentation dar. Die Situation wird speziell in der Schlaganfallforschung dadurch erschwert, daß der prädiktive Wert der eingesetzten Modelle in Ermangelung einer Substanz mit klinisch erwiesener Wirksamkeit noch der Bestätigung bedarf.

Trotz dieser Problematik haben die auf fokaler Ischämie basierenden Schlaganfallmodelle in den letzten Jahren weitgehende Akzeptanz erfahren, da sie – im Gegensatz zu In-vitro-Ansätzen und einfacheren In-vivo-Modellen – doch einen nicht unbeträchtlichen Aussagewert besitzen. In diesen Modellen wird eine intrakranielle Arterie, in der Regel die A. cerebi media selektiv verschlossen und damit die thromboembolische Gefäßokklusion beim Patienten abgebildet. Die Wirksamkeit einer Therapie wird anhand von histologischen Parametern (z. B. Infarktvolumen) oder neurologischen Testverfahren ermittelt. Mit der Hilfe von bildgebenden Verfahren, insbesondere der Positronenemissionstomographie, konnte gezeigt werden, daß die durch Gefäßverschluß ausgelösten hämodynamischen und metabolischen Prozesse bei Mensch und Tier im wesentlichen identisch verlaufen. Damit besteht die berechtigte Hoffnung, daß die aus derartigen Modellen abgeleiteten Ergebnisse auch für die klinische Situation relevant sind.

Es existieren zahlreiche Varianten der fokalen zerebralen Ischämie; die Gefäßokklusion kann extra- oder intravaskulär, mechanisch oder thrombotisch, proximal oder distal, permanent oder transitorisch ausgelöst werden. All diese Varianten haben bestimmte Vor- und Nachteile; prinzipiell muß man jedoch annehmen, daß ein „entwicklungswürdiges" therapeutisches Prinzip mehr oder weniger unter allen Bedingungen wirksam sein sollte.

Demgegenüber existieren zahlreiche kritische Punkte bezüglich der Versuchsdurchführung, die speziell in der pharmazeutischen Forschung wichtig sind. Da die Entwicklung eines Schlaganfalltherapeutikums mehrere hundert Millionen Mark kostet, muß das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ein vermeintlicher neuroprotektiver Effekt kann beispielsweise sehr leicht durch eine temperatursenkende Wirkung der Prüfsubstanz erzielt werden; die Kontrolle dieses Parameters ist deshalb äußerst wichtig. Ähnliches gilt auch für Blutgase, Plasmaglukose und verschiedene Kreislaufparameter.

Auf Grund der anatomischen Variabilität der zerebralen Gefäßarchitektur zeigen Schlaganfallmodelle eine nicht unbeträchtliche Streuung, der nur durch die rigorose Einhaltung statistischer Kriterien begegnet werden kann. Dies gilt insbesondere für höhere Spezies (Katze, Affe), die nicht die Homogenität einer Inzucht-Rattenpopulation aufweisen. Eine zusätzliche Absicherung der experimentellen Befunde kann dadurch erzielt werden, daß sowohl die Versuchsdurchführung als auch die histologische oder neurologische Auswertung ohne Kenntnis der Therapiezuordnung, also blind erfolgen.

Schließlich muß die Verabreichung einer Prüfsubstanz auch im Tiermodell auf realistische Weise erfolgen. Bei Schlaganfallmodellen bedeutet dies, daß mit der Substanzbehandlung erst nach Auslösen der Ischämie und nach Abklingen der Narkose begonnen werden soll. Da Schlaganfallpatienten normalerweise erst mehrere Stunden nach Auftreten der Symptomatik einer Therapie zugeführt werden können, muß auch im Tierversuch mit einer entsprechend langen Latenz gearbeitet werden.

Trotz einiger Rückschläge in jüngster Zeit arbeitet die pharmazeutische Industrie mit großem Aufwand an der Entwicklung von neuartigen Therapien für den akuten Schlaganfall. Einige Ansätze konnten dabei die oben angedeuteten strengen Kriterien für präklinische Wirksamkeit erfüllen, so daß in den nächsten Jahren mit der Zulassung von entsprechenden Medikamenten zu rechnen ist. Neben ihrer außerordentlichen Bedeutung für die Medizin werden sie auch eine bessere Beurteilung der vorhandenen experimentellen Modelle ermöglichen.

Literatur

Ginsberg, M. D., Busto, R., Rodent models of cerebral ischemia. Stroke **20,** 1627 (1989)

Hsu, C. Y., Criteria for valid preclinical trials using animal stroke models. Stroke **24,** 633 (1993)

Sind Tiermodelle in der zerebralen Ischämie überhaupt relevant? – Ja, sie sind es!

Adrian J. Carter

Boehringer Ingelheim Pharma KG, ZNS-Forschung, Ingelheim

Schlaganfall ist eine lokale Hirnschädigung infolge einer Durchblutungsstörung. Die betroffenen Areale können ihre Funktion nicht mehr ausführen, und die von ihnen gesteuerten Organe sind entsprechend beeinträchtigt. In den Industrieländern zählen die zerebrovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen und sind der Hauptgrund für Behinderungen erwachsener Menschen; sie rangieren an dritter Stelle nach Herzerkrankungen und Krebsleiden. Allein in Deutschland erleiden jährlich ca. 200 000 Menschen einen Schlaganfall; weitere ca. 70 000 sind auf einen Rollstuhl angewiesen oder anderweitig behindert. Die ökonomischen Folgen sind deshalb enorm, zumal die Schädigung der betroffenen Hirnareale meist irreversibel ist und die betroffenen Patienten in den meisten Fällen ihre Arbeitsfähigkeit verlieren und intensiver Pflege bedürfen.

Lange zweifelten Neurologen, ob es ihnen je gelingen würde, die im Zusammenhang mit Schlaganfall bekannten Gewebsstörungen zu behandeln. Sie haben früher oft sogar Schlaganfall als natürliche Konsequenz des Älterwerdens angesehen. Dieser Pessimismus beruht auf der klassischen Sichtweise, wonach die betroffenen Zellen unmittelbar an einem Energiemangel zugrunde gehen. Heutzutage verstehen wir aufgrund von zahlreichen Tierexperimenten, daß zerebrale Ischämie eine Kettenreaktion von elektrischen und chemischen Aktivitäten auslöst, die nach und nach die Neuronen zunehmend irreversibel schädigt (Zivin u. Choi 1991). Das durch einen Verschluß einer Hirnarterie geschädigte Gewebe gliedert sich in ein stark betroffenes Kerngebiet und eine Randzone. Obwohl die Zellen im Kerngebiet an einer Vielzahl von schädigenden Prozessen unmittelbar nach dem Verschluß absterben, überleben Zellen in der Randzone sehr viel länger, bevor sie gegebenenfalls zugrunde gehen. Die Neuronen in der Randzone hängen nicht allein von der verschlossenen Arterie ab, sondern sie werden auch von anderen Blutgefäßen, sogenannten Kollateralgefäßen, mitversorgt. Diese Zone wird sehr oft Penumbra genannt, weil sie historisch mit einer partiellen Mondfinsternis verglichen wurde.

Angesichts der schweren Folgen und Häufigkeit des Hirnschlags werden in der Pharma-Industrie ständig neue Therapieansätze präklinisch geprüft. Die gegenwärtige Hoffnung auf Interventionsmöglichkeiten gründet sich unter anderem auf Pharmaka, die das Einsetzen oder Fortschreiten der zerstörerischen Reaktionskaskaden blockieren. Zwei Strategien stehen dabei im Vordergrund. Zunächst versucht man den versorgenden Blutfluß schnellstmöglich wiederherzustellen durch Auflösen des gefäßverstopfenden Blutgerinnsels, und zweitens will man die durch die gestörte Durchblutung ausgelösten chemischen Prozesse, die letztlich das Hirngewebe schädigen (Önal u. Fisher 1996), mit sogenannten neuroprotektiven Pharmaka stoppen. Erfolgreiche präklinische Forschung setzt aber voraus, daß es passende Tiermodelle gibt, die das Infarktgeschehen nachahmen können.

Obwohl menschlicher Schlaganfall eine beträchtliche Variabilität in Pathogenese, Erscheinungsform und anatomischer Lokalisation aufweist (Chopp u. Zhang 1995), sind ca. 80 % aller Insulte durch einen ischämischen Infarkt verursacht (Bamford 1992). Tiermodelle der zerebralen Ischämie gliedern sich in zwei Gruppen: global und fokal. Globale Modelle erzeugen eine Ischämie im gesamten Gehirn und rufen dadurch eine selektive neuronale Nekrose in vulnerablen Hirnarealen hervor (Ginsberg u. Busto 1989). Im Gegensatz dazu erzeugen fokale Modelle Läsionen in definierten Arealen des Gehirns. Fokale Modelle sind für den thromboembolischen Schlaganfall relevanter (Ginsberg u. Busto 1989, Macrae 1992).

Die erste Hoffnung auf neuroprotektive Substanzen setzte man in die Wirkung von Glutamat-Antagonisten. Eine Vielzahl von tierexperimentellen Befunden zeigte, daß Substanzen, die einen bestimmten Subtyp des Glutamat-Rezeptorkomplexes, nämlich den N-Methyl-D-Asparaginsäure (NMDA)-Rezeptor, antagonisieren, eine robuste neuroprotektive Wirkung aufweisen (McCulloch 1992). Leider sind aber alle Substanzen dieser Klasse spätestens in klinischen Phase-III-Studien gescheitert. Bei dieser Klasse blieb bis jetzt vor allem das Nebenwirkungsprofil kritisch, das verhinderte, daß die Substanzen bis zu ihrer wahrscheinlichen Wirkung ausreichend hoch dosiert werden konnten. NMDA-Antagonisten rufen ein breites Spektrum von Nebenwirkungen hervor wie z. B. Blutdruck- und Herzfrequenzstörungen, Motorkoordinationsstörungen und neuropsychologische Symptome, die direkt mit der Hauptwirkung korrelieren (Carter 1995, Muir u. Lees 1995). Entscheidend für die Beurteilung der komplexen Symptomatik waren nicht nur Tierexperimente sondern auch Tolerabilitätsstudien am Menschen in Phase I und II. Aus dieser Erfahrung lernen wir meiner Ansicht nach, wie wichtig es ist, neuroprotektive Wirkung mit Nebenwirkung auf Basis von Plasmaspiegeln kritisch zu vergleichen.

Man könnte zum Schluß kommen, daß Tiermodelle nicht ausreichend prädiktiv für die klinische Wirkung sind. Die bisherigen klinischen Erfahrungen können jedoch helfen, die vorhandenen präklinischen Tiermodelle so weiterzuentwickeln, daß deren unmittelbare Relevanz zur Klinik noch deutlicher wird. Bis jetzt wurden sehr oft Infarktvolumina in Tiermodellen nach einer zerebralen Ischämie histologisch bestimmt. Kritiker beurteilen aber den Therapieerfolg nach einfachen neurologischen Parametern. Dies läßt sich auf z. B. Nagetiere nur schwer übertragen. Deshalb und um eine effektivere Brücke zur Klinik zu schlagen, werden wir uns in Zukunft zunehmend auf In-vivo-Kernspinresonanz-Methoden bei der tierexperimentellen zerebralen Ischämie konzentrieren, um den dynamischen Zustand der Läsion als Meßparameter zu beurteilen, wie z. B. quantitative Diffusionsbildgebung, quantitative T_2-Bildgebung (Pschorn et al. 1993) und NMR-Spektroskopie, Perfusionsbildgebung, funktionelle Bildgebung etc.

Obwohl die bisher präklinisch entwickelten Therapeutika klinisch noch wenig überzeugen konnten, lassen es Häufigkeit, Schweregrad und ökonomische Bedeutung der Schlaganfall-Erkrankungen dringlich erscheinen, dieses Therapiegebiet mit allem Nachdruck weiter zu bearbeiten. Unsere Herausforderung in der Präklinik bleibt dabei, die vorhandenen Modelle noch näher an das klinische Geschehen anzupassen.

Literatur

Bamford, J., Clinical examination in diagnosis and subclassification of stroke. Lancet **339,** 400 (1992)

Carter, A. J., Antagonists of the NMDA receptor-channel complex and motor coordination. Life Sci. **57,** 917 (1995)

Chopp, M., Zhang, R. L., Animal modeling for developing stroke therapy. In: Stroke Therapy, M. Fisher (ed.), pp. 117–134, Butterworth-Heinemann, Boston (1995)

Ginsberg, M. D., Busto, R., Rodent models of cerebral ischemia. Stroke **20,** 1627 (1989)

Macrae, I. M., New models of focal cerebral ischaemia. Br. J. Clin. Pharmacol. **34,** 302 (1992)

McCulloch, J., Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. Br. J. Clin. Pharmacol. **34,** 106 (1992)

Muir, K. W., Lees, K. R., Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. Stroke **26,** 503 (1995)

Önal, M. Z., Fisher, M., Thrombolytic and cytoprotective therapies for acute ischemic stroke: a clinical overview. Drugs of Today **32,** 573 (1996)

Pschorn, U., Köperich, H., Heymans, L. et al., MRI and MRS Studies on the Time Course of Rat Brain Lesions and the Effect of Drug Treatment: Volume Quantification and Characterization of Tissue Heterogeneity by Parameter Selection. Magn. Reson. Med. **30,** 174 (1993)

Zivin, J. A., Choi, D. W., Neue Ansätze zur Schlaganfall-Therapie. Spektrum der Wissenschaft, S. 58, Sept. 1991

Tiermodelle für die Entwicklung neuer Antiepileptika

Christine Tober

Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Pharmakologische Forschung, Radebeul

Ein großer Teil der Epileptiker ist gegenwärtig nicht ausreichend therapierbar. Vollständige Anfallsfreiheit kann nicht erreicht werden. Neue Antiepileptika, die stark wirksam sind, vor allem therapieresistente Epilepsieformen erfassen und weniger Nebenwirkungen beim Patienten hervorrufen, sind notwendig.

Für das Auffinden und die Entwicklung neuer Antiepileptika werden geeignete Tiermodelle eingesetzt, in denen Konvulsionen ähnlich humanen Krämpfen spontan auftreten oder nachgeahmt werden. In den letzten 20 Jahren wurden viele experimentelle Krampf- und Epilepsiemodelle entwickelt.

Krampfmodelle

Krampfmodelle werden für das Screening neuer Substanzen zur Erfassung antikonvulsiver Substanzwirkungen breit eingesetzt. Es wird geprüft, inwieweit Testsubstanzen elektrisch (maximaler Elektroschocktest) oder chemisch (Pentylentetrazol, Bicucullin, Picrotoxin, Strychnin, Pilocarpin, N-Methyl-D-aspartat (NMDA), γ-Hydroxybuttersäure) supramaximal induzierte generalisierte Krämpfe verhindern können. Mit Hilfe von Modellen, in denen die Wirkung von Substanzen auf die Krampfschwelle nach elektrischer oder chemischer Stimulation bestimmt wird, kann vergleichend zu Methoden mit supramaximaler Stimulation unterschieden werden, ob die antikonvulsive Effektivität aus einer Anhebung der Krampfschwelle oder einer Hemmung der Krampfausbreitung resultiert.

Epilepsiemodelle

Im Gegensatz zu den Krampfmodellen repräsentieren Epilepsiemodelle Krankheitsmodelle der Epilepsie.

Bei einigen Tierarten oder -stämmen treten auf Grund einer besonderen genetischen Prädisposition und Zuchtauswahl in unterschiedlichen Abständen spontan Krämpfe auf. Diese genetischen Tiermodelle der Epilepsie stellen primär generalisierte Anfälle dar und ähneln der idiopathischen Epilepsie des Menschen mehr als andere experimentelle Methoden. Sie repräsentieren ideale Modelle für die menschliche Epilepsie, sind jedoch auf Grund der Spontanität der Krämpfe und des hohen Zeitaufwandes besonders bei geringer Krampffrequenz nur bedingt für die Antiepileptikaentwicklung einsetzbar. Breiter können Tierstämme genutzt werden, bei denen auf Grund genetischer Anlagen und gezielter Züchtung Krampfanfälle durch spezielle Reize auslösbar sind (sogenannte Reflexkrämpfe).

Fokale Epilepsieformen stellen gegenwärtig den größten Anteil der therapieresistenten Epilepsien dar. Ursprung des Krampfgeschehens ist ein epileptischer Fokus, d. h. eine Gruppe hypersensibler Neurone in einem spezifischen Hirngebiet. Solche mehr oder weniger begrenzte epileptischen Herde können im Tierversuch durch topische Applikation von Metallen (Aluminium, Kobalt, Wolframsäure) in die Hirnrinde oder in subkortikale Strukturen, durch umschriebene Gefrierläsionen, durch begrenzte elektrische Reizung oder durch lokale Anwendung von chemischen Stoffen (Strychnin, Picrotoxin, Bicucullin, Kainsäure, Penicillin) hervorgerufen werden.

Besonders die begrenzte elektrische Stimulation hat sich bewährt und wird tierexperimentell in Kindling-Modellen breit eingesetzt. Das elektrische Kindling ist zur Zeit das einzige zur Verfügung stehende Testmodell, in dem in einem ganz spezifischen Hirngebiet ein epileptischer Herd, vergleichbar mit einem epileptischen Fokus beim Epileptiker, hervorgerufen werden kann. Der Begriff Kindling wurde von Goddard und Mitarbeiter 1967 eingeführt. Sie bezeichneten damit das Phänomen, daß eine wiederholte Stimulation mit subkonvulsiven Reizen in bestimmten Hirnregionen zu einer limbischen (elektroenzephalographischen) und motorischen (tonisch-klonischen) Krampfaktivität führt, die sich fortschreitend verstärkend über das Gehirn ausbreitet und in einem generalisierten motorischen (tonisch-klonischen) Krampfanfall endet. Durch die wiederholte Aktivierung des Gehirns entwickelt sich eine Prädisposition für epileptische Anfälle. Dieses Phänomen kann grundsätzlich bei allen Tierarten ausgelöst werden. Kindling ruft permanente Veränderungen im Gehirn hervor und gilt als Modell neuronaler Plastizität. Ist die erhöhte Erregbarkeit einmal vorhanden, gilt das Tier als gekindelt und die Übererregbarkeit bleibt ohne zusätzliche Stimulation für das gesamte Leben des Tieres bestehen.

Viele Hirnregionen sind gegenüber dem Kindling-Phänomen sensitiv. Das limbische System und damit assoziierte Strukturen sind am empfindlichsten. Nachdem Goddard und Mitarbeiter 1969 zeigen konnten, daß durch Stimulation der Amygdala Ratten am schnellsten (mit der geringsten Anzahl von Stimulationen) kindelbar sind, wurde das Amygdala-Kindling-Modell am weitesten verbreitet und hat sich zwischenzeitlich in der experimentellen Epilepsieforschung als Modell für komplex fokale Epilepsie des Menschen mit sekundärer Generalisierung bewährt. Nach periodischen Stimulationen der Amygdala mit initial subkonvulsiven Stimuli sind von der stimulierten Hirnregion epileptiforme, synchronisierte Entladungen, die auch als Nachentladungen bezeichnet werden, ableitbar, die sich über das Hirn ausbreiten und konvulsive Verhaltensänderungen (tonisch-klonische Krämpfe) induzieren.

Die pathophysiologischen Elementarprozesse, die dem Kindling-Phänomen zugrunde liegen, sind noch weitgehend unklar. Nach dem bisherigen Wissensstand besitzt das induzierte Ungleichgewicht zwischen dem inhibitorischen Neurotransmitter γ-Aminobuttersäure und den exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat die größte Bedeutung für den Kindling-Prozeß und wird gegenwärtig als Mechanismus der Kindlingentwicklung angenommen. Ob und inwieweit weiteren Systemen eine Funktion im Kindlingmechanismus zukommt, ist noch unklar.

Das Amygdala-Kindling-Modell ist nicht nur ein Modell für eine erhöhte Krampfbereitschaft, sondern auch für eine erhöhte Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber Nebenwirkungen von Substanzen. Gekindelte Ratten reagieren stärker auf Nebenwirkungen von Antikonvulsiva als nichtgekindelte Tiere. Auch diese erhöhte Empfindlichkeit gekindelter Ratten wird auf eine Suppression inhibitorischer Prozesse und/oder Veränderung der durch exzitatorische Aminosäuren vermittelten synaptischen Transmission im gekindelten Hirn zurückgeführt.

In den letzten Jahren ist das Interesse an prophylaktischen Wirkungen von Antiepileptika gestiegen und die Möglichkeiten einer Epilepsieprophylaxe nach Hirnschädigungen werden immer breiter diskutiert. Neben der Prüfung von antikonvulsiven Substanzwirkungen an vollgekindelten Ratten gilt das Kindling-Modell als Methode für die Identifikation von Substanzen mit antiepileptogenen Eigenschaften, indem der Effekt von Testsubstanzen auf den Prozeß der Epileptogenese während des Kindlings untersucht wird.

Literatur

Kulkarni, S. K., George, B., Kindling model of epilepsy. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. **16,** 735 (1994)

Kupferberg, H. J., Strategies for identifying and developing new anticonvulsant drugs. Pharm. Weekbl. **14,** 132 (1992)

Löscher, W., Schmidt, D., Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. Epilepsy Res. **2,** 145 (1988)

Löscher, W., Schmidt, D., New drugs for the treatment of epilepsy. Curr. Opin. Invest. Drugs **2,** 1067 (1993)

McNamara, J. O., Bonhaus, D. W., Shin, C., The kindling model of epilepsy. In: Epilepsy: Models, Mechanisms and Concepts. P. A. Schartzkroin (Hrsg.), S. 27–47, University Press, Cambridge (1993)

Virulenz von Candida albicans in C5-defekten Inzucht-Mäusestämmen

Axel Schmidt

Bayer AG, Pharma-Forschungszentrum, Wuppertal

Einführung und Problematik

Infektiologische Tierversuche sind ein unabdingbares Mittel, um Erreger in ihrer „parasitären" Form in vivo studieren zu können sowie Abwehrmechanismen des Wirtes zu evaluieren und haben ferner Bedeutung für die Findung und Bewertung antiinfektiv wirksamer Substanzen [1]. Da das Komplement-System eine maßgebliche Rolle bei der Abwehr einer Vielzahl von Infektionen spielt [2, 3], war der Gedanke, in Mäuselinien mit einem Komplement-Defekt „sensiblere" Tierversuchsmodelle für die mykologische Antinfektiva-Forschung etablieren zu können. Für die Inzucht Mäuse-Linien A/J, AKR/N und DBA/2J wurde eine genetisch bedingte Defizienz des C5-Proteins – ein Serum Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 220.000 – beschrieben [4], was für die Auszucht-Linien CFW1 und OF1 nicht beschrieben wurde.

Material und Methode

Zur Induktion einer experimentellen systemischen Infektion durch C. albicans in der Maus wurde der Stamm C. albicans BSMY 212 (Bayer Strain Collection Mycology Yeasts, = DSM 10697 bzw. ATCC 200498) vergleichend bezüglich seiner Virulenz für 9 Wochen alte, spezifisch pathogenfreie, männliche A/J Bom, AKR/N Bom, Hsd Win: CFW1, DBA/2J Bom und ICO: OF1-Mäuse untersucht. Der C. albicans Stamm ist ein klinisches Isolat und wurde zur Erstellung des Infektions-Inokulums über 24 h bei 28 °C auf Malzextrakt-Agar (E. Merck, Darmstadt) angezüchtet und die Hefezellen mit PBS (phosphate buffered saline) abgeschwemmt. Diese Suspension wurde 2 × mit PBS gewaschen und auf eine optische Dichte entsprechend einem Inokulum von 2×10^6 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro ml eingestellt. 0,2 ml der unverdünnten bzw. der ein- und zweimal 1 : 1 weiter verdünnten Suspension wurden pro Maus in die laterale Schwanzvene injiziert. Dieses entspricht Infektionsdosen von 4×10^5, 2×10^5 und 1×10^5 KBE/Maus.

Ergebnisse

Die 3 Mäuse-Linien mit C5-Defekt zeigten eine deutlich höhere i.v.-Empfänglichkeit für die C. albicans-Infektion als die CFW1 oder OF1-Mäuse. In den drei C5-defekten Mäuse-Linien wurde mit der Infektionsdosis von 1×10^5 KBE/Maus eine 100%ige Mortalität innerhalb einer Woche induziert. Mit dieser Infektionsdosis wurden innerhalb des gleichen Zeitraumes keine letalen Ereignisse bei CFW1 und OF1-Mäusen beobachtet. Bei CFW1 und OF1-Mäusen mußte somit durchschnittlich eine 4 × höhere Infektionsdosis appliziert werden, um eine vergleichbare Mortalität wie in den Mäuse-Linien mit C5-Defizienz zu erzielen. Dieses zeigte sich auch mit anderen Isolaten von C. albicans sowie mit Isolaten von C. tropicalis.

Diskussion

Die Ergebnisse demonstrieren, daß das Komplement-System eine Rolle in der Abwehr von experimentellen Candida-Infektionen in der Maus spielt. Es ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen, ob sich in Mäuse-Linien mit C5-Defekt letale, systematische Infektionen mit ansonsten für Auszucht-Mäuse apathogenen Candida-Spezies mit humanpathogenetischer Relevanz, wie z. B. C. glabrata, C. krusei bzw. C. albicans und C. tropicalis Isolaten mit geringer Mäuse-Virulenz, etablieren lassen. Ferner soll geprüft werden, ob diese Mäuse-Linien die Etablierung einer Systemmykose mit C. albicans durch Persorption der Keime aus dem Darm nach peroraler Inokulation erlauben. Die höhere Empfänglichkeit C5-defekter Mäuse-Linien gegenüber Infektionserregern soll auch im Hinblick auf bakteriologische Infektionsmodelle bewertet werden.

Die C5-defekten Inzucht Mäuse-Linien sind im Vergleich zu Auszucht-Stämmen zwar relativ teuer, was im Rahmen von Substanzbewertungen in vivo einen limitierenden Faktor darstellen kann. Ein Vorteil gegenüber anderen Mäuse-Linien mit unterschiedlichen Immundefekten ist jedoch, daß sie auch bei normaler Haltung außerhalb keimreduzierender Systeme, wie z. B. Isolatoren über Beobachtungszeiträume von einigen Monaten keine höhere Neigung zu spontanen, interkurrenten Infektionen zeigten als Auszucht-Mäuse. Da artefizielle Immunsuppressionen durch z. B. Zytostatika oder Glucocorticosteroide häufig arbeitsaufwendig und teilweise auch schwierig standardisierbar sind und ferner zu unbekannten Interaktionen mit Prüfpräparaten führen können, bieten C5-defekte Inzucht-Mäuselinien zu derartigen Ansätzen eine gute Alternative.

Literatur

[1] Miyaji, M. (Ed.), Animal models in medical mycology. CRC Press, Boca Raton (1987)

[2] Diamond, R. D., May, J. E., Kane, M. et al., The role of late complement components and the alternate complement pathway in experimental cryptococcosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **144,** 312 (1973)

[3] Caren, L. D., Rosenberg, L. T., The role of complement in resistance to endogenous and exogenous infection with a common mouse pathogen, Corynebacterium kutscheri. J. Exp. Med. **124,** 689 (1966)

[4] Ooi, Y. M., Colten, H. R., Genetic defect in secretion of complement C5 in mice. Nature **282,** 207 (1979)

Helicobacter pylori-Tiermodelle

Guido Hanauer

Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz

1. Einleitung

Seit seiner Entdeckung im Jahr 1983 durch Warren und Marshall [1] hat Helicobacter pylori eine enorme Entwicklung eingeleitet und die medizinische Welt beschäftigt, wie kaum ein anderer Keim zuvor. Seine Bedeutung blieb lange Zeit umstritten, bevor sich in der Gastroenterologie langsam ein Paradigmenwechsel einstellte.

Heute ist H. pylori international als eine Ursache für die Entstehung gastrischer und duodenaler Ulcera und Gastritiden akzeptiert [2]. Außerdem konnte anhand epidemiologischer Studien gezeigt werden, daß das Risiko eines Magenkarzinoms bei H. pylori-positiven Patienten gegenüber H. pylori-negativen Personen erhöht ist [3].

Der Keim kommt im Antrum des Magens vor, die Infektion zeigt eine weltweite Verbreitung. Die Inzidenz liegt in Industriestaaten in Abhängigkeit vom Alter zwischen 10 und 60 %, in Entwicklungsländern zwischen 60 und 95 %. Der Keim ist durch seine Flagellen im Mucus sehr gut beweglich. Durch seine hohe Ureaseaktivität und die Möglichkeit durch Ammoniakproduktion ein geeignetes Mikroklima zu schaffen, ist er optimal an die Bedingungen des sauren Magenmilieus angepaßt. Durch die Besiedelung von Nischen ist er außerdem in der Lage, sich vor dem Einfluß gängiger Antibiotika zu schützen. Nur durch eine sogenannte Tripletherapie (z. B. mit einem Protonenpumpenhemmer und 2 Antibiotika) über 1–2 Wochen kann eine Eradikation in mehr als 85 % der Fälle erreicht werden. Neben der schlechten Compliance (8–12 Tabletten/Tag) spielen die klassischen Nebenwirkungen der Antibiotika und die zunehmende Resistenzneigung des Keims eine große Rolle.

Aus den oben beschriebenen Gründen wird sehr schnell deutlich, daß sich universitäre und industrielle Forschungsinstitute sehr intensiv mit neuen therapeutischen Ansatzmöglichkeiten beschäftigen.

2. Notwendigkeit von Tiermodellen

Im Gegensatz zu anderen Feldern der Antiinfektiva-Forschung kommt der Durchführung von Tierversuchen auf dem Gebiet der H. pylori-Forschung aus folgenden Gründen eine große Bedeutung zu:

1. Die Wirksamkeit von Antibiotika gegen Helicobacter hängt von ihrer Sekretion in den Magen ab, damit eine ausreichend hohe Konzentration am Wirkort erreicht werden kann.
2. H. pylori ist sehr stark beweglich und kann in vivo Kompartimente aufsuchen, wo die Konzentration der Antibiotika gering ist.
3. Fragen der Pharmakokinetik lassen sich nur am Ganztier sicher beantworten.

3. Tiermodelle in der Helicobacter-Forschung

Zwischen 1987 und heute wurde eine Vielzahl von Tiermodellen etabliert, die sich sowohl in der Spezies als auch der Art des Keimes unterscheiden. Die meisten dieser Modelle zeigen gewisse Aspekte der menschlichen Helicobacter-Erkrankung, keines spiegelt jedoch exakt die Situation im Menschen wider. Für die Auswahl eines geeigneten Modells ist daher die wissenschaftliche Fragestellung von entscheidender Bedeutung. Im einzelnen müssen dabei folgende Punkte berücksichtigt werden:

- Die verwendeten Keime unterscheiden sich in ihrer genetischen Verwandtschaft zu H. pylori.
- Die Wirtspezies unterscheidet sich vom Menschen bezüglich ihrer Anatomie und Physiologie des Magens.
- Die normale gastrale Flora ist unterschiedlich zum Menschen.
- Die Pathologie der Infektionen ist unterschiedlich stark ausgeprägt.
- Anforderungen an ein Screeningmodell bezüglich Stabilität, Reproduzierbarkeit, Substanzbedarf, Komplexität und Kosten.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die am häufigsten verwendeten Tiermodelle gegeben werden.

3.1. H. felis – Maus

Die Infektion von Mäusen mit H. felis wurde 1991 von Dick-Hegedus und Lee [4] beschrieben und stellt ein gut charakterisiertes Modell dar. Die Infektion verschiedener Mäusestämme mit H. felis ist relativ einfach möglich, das Modell hat eine hervorragende Eignung für ein Screening, da nur geringe Tierzahlen und ein geringer Substanzbedarf erforderlich sind. Die Ergebnisse sind sehr stabil und in hohem Maße reproduzierbar. Nachteilig sind die im Vergleich zum Menschen andere anatomische Physiologie des Magens und eine – in Abhängigkeit vom Mäusestamm – mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Entzündungsreaktion. Außerdem besitzt der Keim genetische und biochemische Unterschiede zu H. pylori, sowie eine etwas andere Lokalisation im Antrum.

3.2. H. pylory – Maus

Obwohl seit 1992 mehrere Publikationen mit dem humanidentischen Keim erschienen sind, ist eine Infektion von Mäusen mit H. pylori sehr schwierig, nur unter speziellen Umständen und nicht mit hoher Stabilität möglich. Die auftretenden histopathologischen Veränderungen sind sehr variabel, ihre Bedeutung umstritten.

3.3. H. felis – Ratte

Die Besiedlung des Magens von Ratten mit H. felis ist relativ gut möglich. Die Ratte bietet bezüglich Pharmakokinetik und Untersuchung von Inhibitoren der Magensäure gewisse Vorteile gegenüber der Maus.

3.4. H. pylori – Schwein

Das Modell ist durch die Arbeitsgruppe um Eaton [5] sehr gut beschrieben und zeigt zahlreiche Ähnlichkeiten zur Situation beim Menschen. Die Infektion der Schweine führt zu einer chronischen, follikulären Gastritis, die in bis zu 25 % der Fälle zur Entstehung von starken Erosionen der Magenschleimhaut führt. Andererseits ist das Modell sehr aufwendig, da es gnotobiotische, d. h. keimfreie Schweine erforderlich macht, deren Aufzucht per Sectio caesarea und Haltung erhebliche Kosten verursacht. Da gleichzeitig große Substanzmengen erforderlich sind, ist das Modell sehr teuer und für einen hohen Substanzdurchsatz nicht geeignet.

H. mustelae – Frettchen

Der große Vorteil des Frettchens liegt darin begründet, daß es sich um eine natürliche Infektion mit H. mustelae handelt, die bezüglich Pathophysiologie ähnliche Verhältnisse aufweist wie beim Menschen. Mit einer Körpermasse von ca. 1 kg sind Frettchen klein genug, um in der Routine verwendet zu werden. Ihre Größe ist andererseits bereits ausreichend, um Endoskopie oder einen Atemtest durchführen zu können [6]. Der Nachteil dieses Modells liegt in der größeren genetischen Verschiedenheit zwischen H. pylori und H. mustelae.

3.6. H. pylori – Affenmodell

H. pylori infiziert Affen und ruft hier dem Menschen vergleichbare pathophysiologische Veränderungen hervor. Das Modell findet jedoch aus ethischen, finanziellen und Praktikabilitäts-Gründen nur für ausgewählte Fragestellungen Verwendung.

4. Literatur

[1] Warren, J. R., Marshall, B., Unidentified cured bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1273 (1983)

[2] Nedrud, J. G., Czinn, St. J., Helicobacter pylori. Current Opinion in Gastroenterology. **13,** 71 (1997)

[3] Parsonet, J., Helicobacter pylori as a risk factor for gastric cancer. J. Gastroenterol. Hepatol. **5,** 103 (1993)

[4] Dick-Hegedus, E., Lee, A., Use of a mouse model to examine anti-helicobacter pyloriy agents. Scand. J. Gastroenterol. **26,** 909 (1991)

[5] Eaton, K. A., Krakowkas, Chronic active gastritis due to Helicobacter pylori in immunized gnotobiotic piglets. Gastroenterology **103,** 1580 (1992)

[6] Hanauer, G., Bethke, Th., Hermerschmidt, M. et al., Detection of Helicobacter infection in ferrets with a ^{13}C-urea breath test versus infrared spectrometry. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. **355,** R106 (1997)

ARDS Model in the Rat: Influence of Early and Late Treatment with Surfactant in an Animal Model of Acute Lung Injury

Dietrich Häfner, Paul-Georg Germann, and Dieter Hauschke

Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz (Germany)

1. Introduction

Several investigators [1, 2] have consistently shown that alterations of surfactant function or composition are detectable in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). The function of surfactant activity was measured in vitro by determining the surface activity of bronchoalveolar lavage samples using the pulsating bubble surfactometer. This system can also be used for determination of the in vitro activity of clinically used surfactant preparations. However, a good correlation between in vitro and in vivo test results in animal models is difficult to obtain. For testing the activity of surfactant preparations in vivo, several animal models have been described [3]. They all rely on a situation of severe acute lung injury. We decided to use the rat lung lavage model because there were several reports [4, 5] that demonstrated similarities between the histopathological and pathophysiological changes in this model and the changes in patients who suffer from ARDS. The histopathological changes are formation of hyaline membranes, influx of polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PMNL) and edema formation. The pathophysiological changes can be measured as impaired gas exchange, i.e. an increased partial arterial carbon dioxide pressure ($PaCO_2$) and a decreased partial arterial oxygen pressure (PaO_2). Furthermore, this animal model allows standardised testing of the activity of different surfactant preparations and, therefore, allows direct comparison to clinically used surfactants with newly developed surfactants.

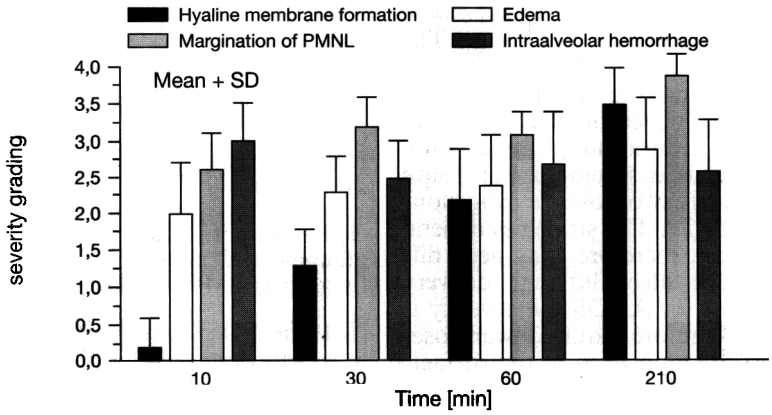

Fig. 1: Time course of histopathological alterations. The histopathological grading was performed with N = 12 animals per time point after the last lavage.

2. Materials and methods

In the rat lung lavage model the activity of two surfactant preparations was compared using two different treatment strategies (for experimental details see [5, 6]. The surfactants used were a bovine-derived and surfactant protein B and C containing preparation, bLES®, and a synthetic surfactant, Exosurf®, which does not contain any surfactant protein. We have performed dose response investigations after administering both preparations either at 10 min (early treatment) or 60 min (late treatment) after lung injury was induced by lavage [6]. The surfactants were administered at doses of 25, 50 and 100 mg phospholipids per kg. The activity of the surfactants was measured as improvements in the partial arterial oxygen pressure (PaO_2). The time course of the histopathological changes was assessed by severity grading (according to [5]). For statistical calculation of dose response effects the Jonckhere Terpstra test was used, and for calculation of statistically significant differences the Wilcoxon test was performed.

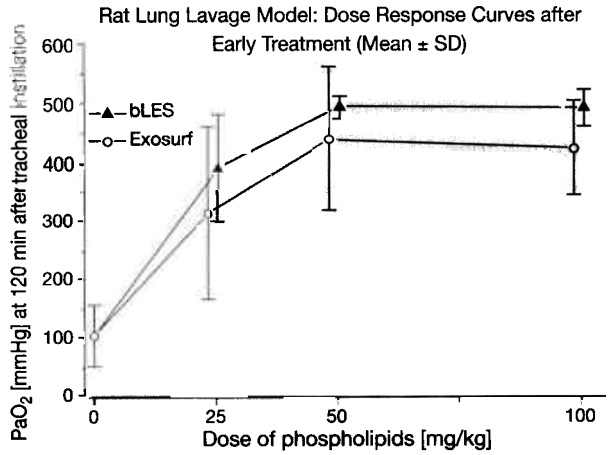

Fig. 2: Dose response curves after early treatment based on the partial arterial oxygen pressures (PaO_2) at 120 min after treatment. N = 11–12 per dose and surfactant.

3. Results

The severity grading of hyaline membrane formation and of intraalveolar and interstitiell edema increased with time in this model (Fig. 1). A time course was less clear with respect to margination of PMNL. For intraalveolar hemorrhage no time course of the grading was present in this model.

After early treatment both surfactants exhibited significant dose dependence (Fig. 2) at 120 min after treatment. At the low and medium dose there were no statistically significant differences detectable between both surfactants despite the lower and highly variable activity of Exosurf. Only at the high dose bLES was statistically significant better than Exosurf ($p < 0.05$). After late treatment only bLES exhibited significant dose dependence (Fig. 3) at 120 min after treatment. Furthermore, at all doses treatment with bLES led to statistically significant ($p < 0.01$) higher PaO_2 values than treatment with Exosurf

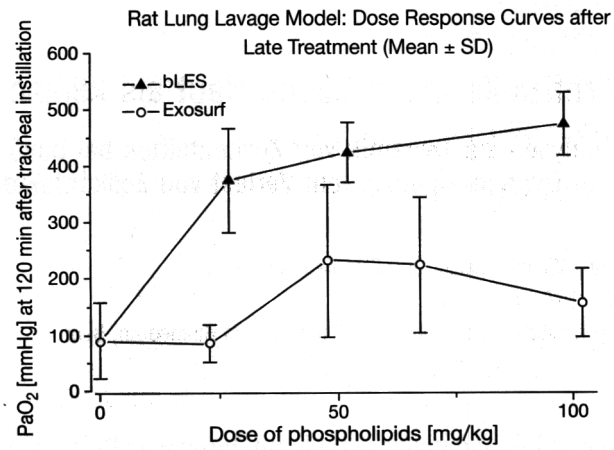

Fig. 3: Dose response curves after late treatment based on the partial arterial oxygen pressures (PaO_2) at 120 min after treatment. N = 11–12 per dose and surfactant.

4. Discussion

A time course of histopathological changes is present in the rat lung lavage model which shows similarities with human pathology of ARDS. Due to this time dependent alterations the tested surfactants showed different activity when administered early or late after the lung injury was induced by lung lavage. Whereas after early treatment both surfactants showed only small differences, there were pronounced differences detectable after late treatment (1 h after the last lav-

age). At this time the histopathological changes were more severe than at 10 min after the last lavage. The results are in good accordance with data of Ito et al. [7] who have demonstrated that the timing of surfactant treatment has great influence on the activity of surfactant treatment, i.e. the duration of the response after late treatment. As Lewis and Veldhuizen [8] have pointed out there are at least two possible exogenous surfactant treatment strategies. The strategies depend on the stage of ARDS and, therefore, may need different dose regimens and also different delivery methods. In the early stage of ARDS the severity is relatively mild and may therefore require lower doses of surfactant or a simple composition of the surfactant used. With late stage ARDS probably surfactants are needed that contain surfactant proteins to increase the resistance of surfactants against inhibiting factors like albumin or fibrinogen. Such a complex situation cannot be tested in vitro. Therefore, we conclude that animal models are needed to show the complex interactions of surfactant in the lung and the potential resistance of surfactants against inhibiting factors that are present in the lung.

5. References

[1] Gregory, T. J., Longmore, W. J., Moxley, M. A. et al., Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. J. Clin. Invest. **88,** 1976 (1991)

[2] Günther, A., Siebert, C., Schmidt, R. et al., Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome and cardiogenic lung edema. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153,** 176 (1996)

[3] Lewis, J. F., Jobe, A. H., Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. Am. Rev. Respir. Dis. **147,** 218 (1993)

[4] Kawano, T., Mori, S., Cybulsky, M. et al., Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. J. Appl. Physiol. **62,** 27 (1987)

[5] Häfner, D., German, P.-G., Hauschke, D., Effects of lung surfactant factor (LSF) treatment on gas exchange and histopathological changes in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS). Comparison of recombinant LSF with bovine LSF. Pulm. Pharmacol. **7,** 319 (1994)

[6] Häfner, D., Beume, R., Kilian, U. et al., Dose response comparisons of five lung surfactant factor (LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS). Br. J. Pharmacol. **115,** 451 (1995)

[7] Ito, Y., Goffin, J., Veldhuizen, R. et al., Timing of exogenous surfactant administration in a rabbit model of acute lung injury. J. Appl. Physiol. **80,** 1357 (1996)

[8] Lewis, J. F., Veldhuizen, R. A. W., Factors influencing efficacy of exogenous surfactant in acute lung injury. Biol. Neonate. **67** (Suppl.), 48 (1995)

Artifizielle menschliche Haut als klinisches Krankheitsmodell

Analysen zur Dynamik von Zellkontakten bei bullösen Dermatosen und Onkogen-induziertem Verlust von Zellkontakten

Hans Wilhelm Kaiser und Claudia Haberkamp

Universitäts-Hautklinik Bonn, Bonner Forum Biomedizin, Bonn

Blasenbildung in der Haut kann durch eine Reihe von Noxen induziert werden. Zu diesen Noxen gehören Viren, Bakterien, Medikamente sowie Autoimmunerkrankungen mit Bildung von Antikörpern gegen Zelladhäsionsmoleküle. Am Beispiel der Autoimmunerkrankungen des Pemphigus vulgaris einerseits und virustransformierter Zellen andererseits sollen humane Testsysteme vorgestellt werden, die eine Analyse dieser Prozesse erlauben und Ausblicke auf die Entwicklung möglicher therapeutischer Strategien im humanen System unter Vermeidung von Tierversuchen ermöglichen.

Die menschliche Haut ist ein Flächenorgan, das die Außenseite des Organismus überzieht und schützt. Um diesen Schutz gewährleisten zu können, muß sie weitgehend undurchlässig sein und außerdem starken Zug- und Scherkräften widerstehen können. Diese Funktion wird in der obersten Hautschicht, der Epidermis, insbesondere durch Keratinozyten vermittelt, die 95 % der epidermalen Zellen ausmachen. Die Integrität dieser Struktur wird über Filamentsysteme (Aktin- und Keratin-assoziiertes Cytoskelett) gesichert. An Zellgrenzen interagiert dieses Cytoskelett mit dem Cytoskelett benachbarter Zellen über Adhä-

sionsstrukturen, die als Adherens Junctionen bzw. Desmosomen bezeichnet werden. Diese Kontaktstrukturen werden aus mehreren zytoplastischen und integralen Proteinen zusammengesetzt. Bei der Pathogenese des Pemphigus vulgaris werden von Patienten Antikörper gegen eine Komponente der Desmosomen gebildet. Die Antikörper richten sich gegen ein transmembranöses Protein der Cadherin-Familie, Desmoglein 3. Die pathogenetische Bedeutung der Antikörper konnte in Mausmodellen nachgewiesen werden. Aufgereinigte IgG-Fraktionen von Pemphigus vulgaris Antikörpern induzierten eine Blasenbildung in Mäusen innerhalb von Stunden. Nach Bindung von Autoantikörpern an den extrazellulären Bereich des desmosomalen Transmembranproteins Desmoglein 3 [1–4] löst sich der interzelluläre Verband der Keratinozyten im Stratum spinosum der Epidermis (Akantholyse), und es bilden sich Blasen [5, 6]. Hierbei kommt es zum Verlust der Zelladhäsion sowohl der Keratin-assoziierten Desmosomen als auch der Aktin-assoziierten Adhärenzverbindungen, obwohl der Antikörper ausschließlich gegen ein desmosomales Protein gerichtet ist. Aus dieser Beobachtung heraus ergab sich die Fragestellung, ob neben dem Anbinden eines Autoantikörpers an eine funktionelle Untereinheit des Adhäsionsmoleküls möglicherweise weitere Mechanismen für den vollkommenen Verlust von Zellkontakten beider Adhäsionssysteme von Bedeutung sind. Untersuchungen weisen darauf hin, daß nach Anbinden eines Autoimmunantikörpers Signaltransduktionswege induziert werden können. Die Bindung von Pemphigus-IgG-Autoantikörper führt zu einem schnellen, vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Ca^{++}-Konzentration [7, 8]. Außerdem konnten ein transienter Anstieg der IP_3-Konzentration festgestellt werden [7] sowie eine Aktivierung und Translokation der Proteinkinase C [8]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die Beobachtung, daß die Gabe von Proteinkinase C Inhibitoren zu humanen Keratinozytenkulturen eine Akantholyse verhindert [9].

Der Verlust von Zellkontakten ist ebenfalls ein bei der viralen Transformation beobachteter Vorgang. Er ist darüberhinaus Grundvoraussetzung für die Metastasierung maligner Zellen und somit mitentscheidend für die Überlebensprognose. Einige Untergruppen maligner Tumoren sind durch die überschießende Produktion von Wachstumsfaktoren gekennzeichnet, andere kennzeichnen sich durch die Produktion von Kinasen, welche Signaltransduktionswege aktivieren. Beide biologische Mechanismen können zum Verlust von Zellkontakten führen. Kultivierte Onkogentransformierte Keratinozyten erlauben, diese Mechanismen in der Kultur nachzuvollziehen. Während normale Keratinozyten durch Stimulation mit Ca^{++} Zell-Zellkontakte bilden [10], wachsen onkogentransformierte Keratinozyten weiter ohne Ausbildung von Zell-Zellkontakten [11]. Biochemische Analysen zeigten in der SDS-Gelelektrophorese das Vorkommen der für die Ausbildung von Zell-Zellkontakten verantwortlichen Proteine wie E-Cadherin, Vinculin, Adducin, β-Catenin, Desmoglein oder Desmoplakin. In immuncytochemischen Untersuchungen konnte jedoch nur eine diffuse Lokalisation dieser Proteine im Zytoplasma der Onkogen-transformierten Keratinozyten in hohen Ca^{++}-Konzentrationen beobachtet werden [11, 12]. Hingegen zeigte sich in normalen Keratinozyten eine Konzentration von Zellkontakt Proteinen im Bereich der Zellmembranen benachbarter Zellen. In der Immunpräzipitation wurde ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von Zellkontakt-assoziierten Proteinen in transformierten Zellen festgestellt; im Vergleich mit normalen Keratinozyten [11]. Es zeigte sich, daß die Phosphorylierung von Zellkontaktproteinen in transformierten Keratinozyten durch Zugabe von Tyrosinkinase-Inhibitoren reduziert werden konnte [11]. Morphologisch zeigte sich die Ausbildung eines dichten Gewebeverbandes mit der Konzentration von Zellkontaktproteinen im Bereich der Zellmembranen benachbarter Zellen, wie sie bei normalen Keratinozyten beobachtet wurde.

Neben Monolayer-Kulturen humaner Keratinozyten können diese Zellen auch in dreidimensionalen Kulturen gezüchtet werden. Die dreidimensionale Züchtung humaner Keratinozyten erlaubt es, in der Kultur eine künstliche Epidermis herzustellen, die einer natürlichen Epidermis sehr nahe kommt. Diese Technik eröffnet die Möglichkeit, Krankheitsprozesse an einem humanen Organsystem nachzuvollziehen.

Literatur

[1] Amagai, M. et al., Cell **67,** 869 (1991)
[2] Amagai, M. et al., J. Clin. Invest. **90,** 919 (1992)
[3] Nishikawa, T. et al., J. Dermatol. Sci. **12,** 1 (1996)
[4] Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. **104,** 146 (1995)
[5] Amagai, M. et al., J. Invest. Dermatol. **106,** 351 (1996)
[6] Hashimoto, T. et al., Epithelial Cell Biol. **4,** 63 (1995)
[7] Seishima, M. et al., J. Invest. Dermatol. **104,** 33 (1995)
[8] Lyubimov, H. et al., Isr. J. Med. Sci. **31,** 42 (1995)
[9] Kowalewski, C., Kaiser, H. W. et al., Eur. J. Dermatol. **4,** 238 (1994)
[10] Kaiser, H.-W. et al., J. Cell Biol. **109,** 557 (1989)
[11] Johnen et al., J. Invest. Dermatol. submitted
[12] Becker et al., J. Invest. Dermatol. submitted

Von Mäusen und Menschen: Tiermodelle für humane Keratin-Erkrankungen

Thomas Magin

Universität Bonn, Institut für Genetik, Abteilung Molekulargenetik, Bonn

Das Cytoskelett eukaryontischer Zellen wird von Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten gebildet. Keratine bauen die Intermediärfilamente aller Epithelien auf und werden von zwei Gen-Familien mit zusammen mehr als 30 Genen kodiert. In verschiedenen Epithelien sind unterschiedliche Kombinationen von Keratinen exprimiert, dabei ist mindestens ein Mitglied jeder Gen-Familie erforderlich, um Filamente aus heterodimeren Untereinheiten zu bilden. Aufgrund ihrer besonderen Domänenstruktur entstehen Keratinfilamente durch „self-assembly" ihrer Untereinheiten, ohne daß Cofaktoren beteiligt sind (Fuchs and Weber 1994, Lane 1993). Alle Keratine sind aus drei Domänen aufgebaut: Eine zentrale alpha-Helix von etwa 310 Aminosäuren Länge, die coiled-coils ausbildet und das Rückgrat der Filamente darstellt, wird flankiert von Kopf- und Schwanzdomänen unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz, die an der Längenpolymerisation beteiligt sind (Franke et al. 1988).

Die Funktion von Keratinfilamenten war lange unbekannt, bis vor wenigen Jahren gezeigt wurde, daß eine Gruppe bullöser Dermatosen durch Mutationen in Keratin-Genen verursacht werden (Corden and McLean 1996). Zu diesen meist dominant vererbten Erkrankungen, die mit einer Häufigkeit von etwa 1 : 20 000 auftreten und in seltenen Fällen tödlich verlaufen können, gehören unter anderem Epidermolysis bullosa simplex, epidermolytische Hyperkeratose und Ichthyosis bullosa Siemens (Corden and MecLean 1996, Fuchs and Weber 1994). Als Folge von Punktmutationen in denjenigen Keratin-Genen, deren Proteine in Epidermis exprimiert werden, kommt es zur Aggregation des Cytoskeletts, zur Cytolyse und makroskopisch zu Blasen und/oder Verhornungsstörungen. Solche Befunde zeigten, daß Keratine eine wesentliche Aufgabe als epidermales Cytoskelett besitzen. Die Korrelation zwischen Art und Lage der Mutation in einem bestimmten Keratin und dem Phänotyp der Erkrankung ist noch unklar. Eine kausale Therapie steht für diese Erkrankung bisher nicht zur Verfügung.

Mit Hilfe von gene targeting haben wir ein erstes Mausmodell für die humane Erkrankung epidermolytische Hyperkeratose etabliert, die durch Punktmutationen in Keratin 1 oder 10 verursacht wird (Corden and McLean 1996). Homozygote Keratin 10-Knock-out-Mäuse haben eine äußerst fragile Epidermis mit zahlreichen Blasen und Erythemen und sterben unmittelbar nach der Geburt. Heterozyte Tiere sind bei der Geburt unauffällig und entwickeln nach etwa zwei Wochen eine Acanthose und eine Hyperkeratose an den Pfoten, den Ohren und am Schwanz, die im Alter zunimmt (Porter et al. 1996). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten typische Keratin-Aggregate und Cytolyse in der oberen Epidermis von Mäusen. Neben diesen histologischen Veränderungen kommt es in der oberen Epidermis von Keratin 10-Knock-out-Mäusen und bei Patienten zu einer Neuexpression von Keratin 6 und 16, die als Marker für Wundheilung und alternative Differenzierung gelten (Porter et al. 1996, Reichelt et al. 1997). Mit Hilfe von Proliferationsmarkern konnten wir zeigen, daß die Hyperkeratose nur teilweise durch eine erhöhte Mitoserate basaler Keratinozyten verursacht wird, während ein wichtiger Beitrag von einer verminderten Desquamation der oberen Epidermis kommt (Porter et al. 1997). Erste elektronenmikroskopische Befunde legen nahe, daß Keratinfilamente eine wichtige Rolle bei der Bildung des „cornified envelope" spielen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese haben wir bei In-vivo-Messungen sowohl eine gestörte Wasserbarriere als auch eine veränderte Lipidzusammensetzung der Epidermis bei Keratin 10 Knock-out-Mäusen festgestellt.

Mit Hilfe neuer gene targeting-Verfahren („cre/lox" und „double replacement") (Rajewsky et al. 1996) sind wir gegenwärtig dabei, solche Punktmutationen in das Keratin 10-Gen der Maus einzuführen, wie sie bei Patienten mit epidermolytischer Hyperkeratose beschrieben sind. Damit soll die Korrelation zwischen Mutation und Phänotyp genauer untersucht werden. Hauterkrankungen sind wegen der Zugänglichkeit der Epidermis und der Verfügbarkeit von Keratinozyten ein besonders attraktives Modell für Gentherapie (Roop 1995). Da die Mehrzahl der Erkrankungen, die durch Keratin-Mutationen verursacht werden, durch die Wirkung dominant-negativ wirkender Protein-Untereinheiten verursacht werden, kommt für eine mögliche Gentherapie die Überexpression normaler Keratine wahrscheinlich nicht in Frage. In einem ersten Ansatz haben wir humane Keratinocyten eines Patienten mit Epidermolysis bullosa simplex stabil mit dem muskelspezifischen Intermediärfilament-Protein Desmin transfiziert. In solchen Keratinozyten bildet Desmin ein stabiles, Keratin-unabhängiges Cytoskelett (Magin et al. 1998). Die Funktionsfähigkeit dieses Ansatzes soll zunächst in organotypischen Kulturen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Kaiser (Bonner Universitäts-Hautklinik) getestet werden.

Um die Funktion von Keratinen in einfachen Epithelien wie denen des Darms und der Leber zu untersuchen, haben wir Keratin 18 Knock-out-Mäuse hergestellt, die in Hepatocyten überhaupt kein Intermediärfilament mehr besitzen (Magin et al. 1998, Magin 1997). Während junge Mäuse phänotypisch unauffällig sind, treten in Hepatocyten alter Tiere sogenannte Mallory-Körperchen auf, wie sie bei alkoholischer Hepatitis oder bestimmten Leberkarzinomen beobachtet werden. Bisherige Untersuchungen zeigen gleichartige Veränderungen in Hepatocyten von Patienten mit alkoholischer Hepatitis und von Keratin 18 Knock-out-Mäusen, die darauf hinweisen, daß Keratine über ihre Funktion als Cytoskelett hinaus eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Leber spielen (Magin et al. 1997b). Dies wird durch die kürzlich berichtete Entdeckung einer Punktmutation in Keratin 18 bei einem Patienten mit cryptogener Leberzirrhose untermauert (Ku et al. 1997).

Literatur

Corden, L. D., McLean, W. H., Human keratin diseases: hereditary fragility of specific epithelial tissues. Exp. Dermatol. **5,** 297 (1996)

Franke, W. W., Margin, T. M., Hermann, H., Ordnungsstrukturen der Zelle: Filamente und Plaques. Verh. Ges. Dt. Naturforsch. Ärzte 153 (1989)

Fuchs, E., Weber, K., Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease. Annu. Rev. Biochem. **63,** 345 (1994)

Ku, N. O., Wright, T. L., Terrault, N. A. et al., Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. J. Clin. Invest. **99,** 19 (1997)

Lane, E. B., Keratins. In: Connective Tissue and Its Heritable Disorders, S. 237–247, Wiley-Liss (1993)

Magin, T. M., Leitgeb, S., Schröder, R. et al., The limits of promiscuity: Insights from keratin 18 null mice. J. Cell Biol. (1998), in press

Magin, T. M., Stumptner, C., McCullough, S. et al., Genetic Model for Alcoholic Hepatitis: The Essentials for Mallory Body Formation (1998), in preparation

Magin, T. M., Lessons from keratin transgenic and knockout mice. In: Intermediate Filaments. H. H. a. J. R. Harris (ed.), Plenum Publishers, in press

Magin, T. M., Morley, S., Lane, E. B. et al., Expression of the type III IF gene desmin in keratinocytes from an epidermolysis bullosa simplex patient: a potential route to gene therapy (1998), in preparation

Porter, R. M., Leitgeb, S., Melton, D. W., et al., Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus: severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis. J. Cell Biol. **132,** 925 (1996)

Porter, R. M., Reichelt, J., Lunny, D. P. et al., The relationship between hyperproliferation and epidermal thickening in a mouse model for BCIE (1997), submitted

Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R. et al., Conditional gene targeting. J. Clin. Invest. **98,** 9721 (1996)

Reichelt, J., Bauer, C., Porter, R. M. et al., Out of balance. J. Cell Sci. **110,** 2175 (1997)

Roop, D., Defects in the barrier. Science **267,** 474 (1995)

Tiermodelle zur Untersuchung von Adipositas, Insulinresistenz und Typ-II-Diabetes

Hans-Georg Joost

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Medizinische Fakultät, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Aachen

Diabetes mellitus Typ II ist gekennzeichnet durch eine langsam progrediente Insuffizienz der Insulin-sezernierenden B-Zellen, die sich meistens nach einer länger bestehenden, zunächst klinisch unauffälligen Insulinresistenz und Hyperinsulinämie entwickelt. Insulinresistenz wird durch Adipositas ausgelöst und verstärkt; damit ist für den Typ-II-Diabetes die Kombination von drei Faktoren, Adipositas, Insulin-Resistenz und B-Zellversagen, verantwortlich. Diese Faktoren sind durch verschiedene genetische Konstellationen prädisponiert, und es wird angenommen, daß eine ganze Reihe von noch unbekannten, in der Population aber häufig vorkommenden Genvarianten für den Krankheitskomplex verantwortlich sind. Epidemiologische Daten zeigen außerdem, daß die Ausprägung der Erkrankung nur unter bestimmten Lebensbedingungen (unlimitiertes Nahrungsangebot, fettreiche Ernährung) erfolgt. Typ-II-Diabetes ist demnach das Paradigma einer zwar genetisch determinierten, aber durch exogene Faktoren erheblich beeinflußten Erkrankung.

In den letzten Jahren haben Untersuchungen an Nagermutanten wesentlich zur Aufklärung der Pathogenese von Adipositas und Insulinresistenz beigetragen. Den größten Fortschritt brachte die Aufklärung des genetischen Defekts der ob/ob-Maus, die eine autosomal rezessive Hyperphagie, extreme Adipositas, Insulinresistenz, eine Störung der Thermoregulation sowie eine Störung der Gonadotropinfreisetzung zeigt. ob/ob-Mäuse produzieren eine verkürzte, inaktive Variante des vom Fettgewebe gebildeten Hormons Leptin (Zhang et al. 1994). Leptin wird in Abhängigkeit von der Fettzellgröße und vom Seruminsulin (Igel et al. 1996 b) freigesetzt und hemmt über einen hypothalamischen Rezeptor die Nahrungsaufnahme. Eine Unterbrechung dieses Regelkreises, der zum Konstanthalten des Fettdepots dient, ist in ob/ob- und db/db-Mäusen für alle metabolischen und endokrinen Effekte dieser Tiere verantwortlich. Besonders auffällig ist, daß es eine (noch nicht völlig aufgeklärte) direkte Beziehung zwischen dem Leptinregelkreis und der Regulation der Insulinempfindlichkeit geben muß, da die Unterbrechung der Leptinregulation in diesen Mäusen sehr früh, noch bevor Hyperphagie und Adipositas sichtbar sind, zur massiven Insulinresistenz führt (Igel et al. 1996 b). Die Verbindung zwischen hypothalamischer Leptinwirkung und peripherer Insulinresistenz könnte in der Regulation der Thermogene liegen; hierbei könnten entkoppelnde Proteine (UCP's, uncoupling proteins) in den Zielgeweben des Insulins eine wichtige Rolle spielen.

Kürzlich wurden zwei Patienten mit einem defekten ob-Gen indentifiziert, der zu der erwarteten extremen Hyperphagie und Adipositas führte. Dennoch ist es sehr unwahrscheinlich, daß das Fehlen von Leptin oder seinem Rezeptor, wie in den monogenen Nagemutanten ob/ob, db/db und fa/fa gefunden, bei der menschlichen Adipositas/Insulinresistenz eine größere Rolle spielt. Die menschliche Adipositas ist polygen und ähnelt deshalb eher der Adipositas mehrerer anderer Nagermodelle mit mäßiger Adipositas. Diese Modelle haben deshalb große Bedeutung für die Aufklärung der molekularen Grundlagen des Syndroms; ihre Aufklärung wird nicht nur grundsätzliche Erkenntnisse zur Regulation von Nahrungsaufnahme und Insulinempfindlichkeit liefern, sondern auch Kandidatengene für die menschliche Erkrankung identifizieren. Die Identifizierung von Kandidatengenen für die menschliche Adipositas/Insulinresistenz ist nötig, weil es z.Zt. unrealistisch erscheint, durch Linkage-Analyse die verantwortlichen Gene beim Menschen zu identifizieren.

Geeignete polygene Mausmodelle mit verschiedengradiger Adipositas und Insulinresistenz sind die New Zealand obese Maus (NZO), die KK-Maus und die NON-Maus, die in Aachen auf Störungen des Leptinregelkreises untersucht werden. NON-Mäuse haben eine normale Sequenz von Leptin und seinem Rezeptor, zeigen aber im Verhältnis zu ihrer Adipositas dysproportional niedrige Leptinspiegel (Igel et al. 1996 a). NZO-Mäuse haben erhöhte Leptinserumspiegel mit normaler Sequenz und eine signifikante Leptinresistenz. Die Sequenz ihres Leptinrezeptors zeigt drei Proteinpolymorphismen, deren Bedeutung für die Signaltransduktion des Rezeptors noch nicht völlig geklärt ist. KK-Mäuse haben ebenfalls einen polymorphen Leptinrezeptor, dessen möglicherweise gestörte Signaltransduktion zu ihrer Adipositas beitragen könnte. Bei allen drei Mausstämmen tragen diese Störungen des Leptinregelkreises nur zu einem Teil der Stoffwechselstörung bei, können sie aber nicht völlig erklären. Es wird deshalb wichtig sein, die anderen, für das Syndrom verantwortlichen Gene zu identifizieren.

Die von uns untersuchten polygenen Mausmodelle werden nicht nur wesentliche Informationen zur Pathophysiologie der Erkrankung liefern, sondern können auch Tiermodelle zur Erprobung gezielter pharmakotherapeutischer Ansätze sein. Monogene Mausmodelle haben schon jetzt Zielmoleküle für therapeutische Interventionen identifiziert, wie z. B. die im ZNS exprimierten Rezeptoren für Neuropeptid Y (NPY5-Rezeptor) und Melanocortin (MC4-Rezeptor), deren Hemmung bzw. Stimulation eine Reduktion der Nahrungsaufnahme bewirkt (Friedman 1997). Ein anderes neues Zielsystem zur Entwicklung von pharmakotherapeutischen Ansätzen ist die Thermoregulation durch entkoppelnde Proteine in Muskel, Leber und Fettgewebe. Hier hat die kürzlich erfolgte Klonierung von gewebsspezifisch exprimierten Isoformen des UCP die Sicht auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Thermogenese, Adipositas und Insulinresistenz eröffnet.

Literatur

Friedman, J. M., The alphabet of weight control. Nature **385,** 119 (1997)

Igel, M., Kainulainen, H., Brauers, A. et al., Long-term and rapid regulation of ob mRNA levels in adipose tissue from normal (Sprague-Dawley rats) and obese (db/db mice, fa/fa rats) rodents. Diabetologia **39,** 758 (1996 b)

Igel, M., Becker, W., Herberg, L. et al., Evidence that reduced leptin levels, but not an aberrant sequence of leptin or its receptor, contribute to the obesity syndrome in NON mice. Horm. Metab. Res. **12,** 669 (1996 a)

Igel, M., Becker, W., Herberg, L. et al., Hyperleptinemia, leptin resistance and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese (NZO) mouse. Endocrinology **138,** 4234 (1997)

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M. et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature **372,** 425 (1994)

Vom Metabolischen Syndrom zum NIDDM-Phänotypen kleiner Nager

Lieselotte Herberg

Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Als 1959 zum ersten Mal über eine spontan fettsüchtig-hyperglykämische Maus berichtet wurde, ahnte niemand, welche Vielfalt von Mutanten wir einmal für Stoffwechseluntersuchungen zur Verfügung haben würden. Insbesondere an die Möglichkeiten, das Zusammenspiel von endogenen, hereditären Komponenten mit exogenen, gezielt einsetzbaren Faktoren an diesen Tieren zu verstehen und somit weitgehende Rückschlüsse auf die Verhältnisse beim Menschen ziehen zu können, dachte zu dieser Zeit kein Forscher. Inzwischen hat sich das Spektrum der Mutanten erweitert und wir kennen spontan hyperglykämische

kleine Nager, die, entweder durch einen Autoimmunprozeß bedingt, in ihrem Phänotyp dem humanen Typ I Diabetes ähneln [1], oder aufgrund ineinandergreifender Störungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels eine Adipositas entwickeln und Stoffwechselbesonderheiten zeigen, wie sie von der Morbiden Adipositas über das Metabolische Syndrom bis zum nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) hin bekannt sind [2, 3].

Den Stoffwechselbesonderheiten der spontan adipösen Nager liegt entweder eine Einzelgenmutation zugrunde oder es entwickelten sich Stämme, deren Stoffwechselsyndrom polygenetisch bedingt ist [4]. Bei beiden Gruppen wird der Phänotyp durch Ernährung, Alter und auch Haltungsbedingungen beeinflußt [5, 6].

Die in der Stoffwechselforschung am häufigsten verwendeten kleinen Nager sind die Zucker Ratte mit ihren Sublinien, die Einzelgenmutationen Obesitas und Diabetes Maus und die polygen adipösen NZO (New Zealand obese) sowie KK (Kuo Kondo) Mäuse.

1961 wurde die Zucker Ratte, Gensymbol $Lepr^{fa}$, erstmalig beschrieben. Das autosomal rezessive fatty Gen (fa) trat spontan in einem Stamm mit ausgeprägt heterogenem Gesamtgenom auf, der auf Körpergröße gezüchtet worden war. Das fatty Gen liegt auf dem Chromosom 5 in einer Region, die derjenigen entspricht, die bei der Diabetes Maus auf dem Chromosom 4 das $Lepr^{db}$ trägt. Aus dem Symbol beider Gene läßt sich ersehen, daß der Stoffwechselstörung bei Zucker Ratte und Diabetes Maus ein Defekt zugrunde liegt, der den Leptin Rezeptor (OB-R) betrifft. Leptin wird nicht mehr an den Rezeptor gebunden, die Funktion des Leptin-Leptinrezeptor-Komplexes, die Energieaufnahme zu stoppen, entfällt, es kommt zur Adipositas. Zu vermuten, der OB-R-Defekt sei die alleinige Ursache der Stoffwechselstörung, ist jedoch irrig. So liegt der Körperlipidgehalt bei restriktiv ernährten, jedoch spontan hyperphagen Zukker Ratten – und ebenfalls bei allen uns bekannten Mausmutanten – deutlich höher als bei ad lib ernährten, gleichgewichtigen Kontrollen.

Eine weitere, auffallende Besonderheit der Zucker Ratte ist die extreme Insulin-Resistenz des Muskel- und Fettgewebes. Dabei ist die Insulin-Sekretion bei fettsüchtigen Tieren um das ca. Fünffache im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Die basalen Blutglukosekonzentrationen liegen im Normbereich, unter einer Glukosebelastung offenbart sich die Insulin-Insensitivität in extrem erhöhten Blutglukosespiegeln. Zucker Ratten sind weiterhin durch eine ausgeprägte Dyslipoproteinämie charakterisiert: Triglyceride und Gesamtcholesterinspiegel liegen in der Regel um das Sechsfache höher als bei Kontrollen. Häufig sind die Blutdruckwerte leicht erhöht, an den Gefäßen läßt sich jedoch keine Makroangiopathie erkennen.

Der Schweregrad dieser Symptome ist nicht einheitlich. Abhängig von dem Gesamtgenom, das durch Abtrennung verschiedener Linien, die isoliert nach unterschiedlichen Zuchtschemata weitergeführt wurden, können sich Phänotypen entwickeln, die dem Bild der Morbiden Adipositas, oder, falls der Schweregrad zunimmt, dem Bild des Metabolischen Syndroms ähneln. Heute existiert sogar eine Linie, bei der basal eine Hyperglykämie vorliegt, der Phänotyp der gesamten Kolonie (Zucker diabetic fatty – ZDF) spiegelt die Symptome des humanen NIDDM wider.

In bezug auf den Schweregrad der Adipositas sind Diabetes-($Lepr^{db}/Lepr^{db}$) und Obesitas-(Lep^{ob}/Lep^{ob}) Mäuse vergleichbar, unabhängig davon, ob das db oder ob Gen auf dem BLKs/J- oder BL/6J-background liegt. Bei Ks/J-$Lepr^{db}/Lepr^{db}$) oder 6J-$Lepr^{db}/Lepr^{db}$ ist insbesondere der Kohlenhydratstoffwechsel stärker entgleist als bei Ks/J-Lep^{ob}/Lep^{ob}- oder BL/6J-Lep^{ob}/Lep^{ob}-Mäusen.

An Tieren dieser beiden Stämme wurde in zahlreichen Studien der Effekt des Gesamtgenoms in seiner Interaktion mit der Mutation untersucht. Bei Tieren beider Genome, unabhängig von der speziellen Mutation, erkennt man im Prinzip die Symptome, die auch die Zucker-Ratte auszeichnen: Hyperphagie, vermehrte Fettgewebebildung auch bei restriktivem Energieangebot, Insulinresistenz, erhöhte Insulinsekretion und herabgesetzte Glukosetoleranz sind permanent zu beobachten. Bei der Ks/J-Diabetes Maus steigen häufig mit zunehmendem Alter die Seruminsulinspiegel an, während die Blutglukose absinkt. Inwieweit die Insulinresistenz in diesem Geschehen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Eine proteinreiche Kostform begünstigt das Sekretionsverhalten der B-Zellen und schützt sie vor destruktiven Prozessen.

Beide, Obesitas- und Diabetes-Maus spiegeln die Symptome aller drei Stoffwechselstörungen wider: je nach dem Alter der Tiere erkennt man Ähnlichkeiten zum Bild der Morbiden Adipositas, des Metabolischen Syndroms oder des NIDDM.

Von dem ursprünglichen Gensymbol der Obesitas Maus, ob wurde das Symbol für das Leptin Gen (OB) und das Leptin-Rezeptor-Gen (OB-R) abgeleitet. Wie aus dem heute gebräuchlichen Symbol Lep^{ob} abzulesen ist, liegt bei der Obesitas-Maus ein Defekt im Leptin-Gen vor. Ein aberrantes Leptin kann nicht an den Rezeptor binden, es kommt wie bei der Zucker-Ratte und der Diabetes-Maus zu einer Hyperleptinämie bei ungebremster Energieaufnahme. Während bei diesen drei Stämmen noch eine völlige Unkenntnis über die Anzahl der in das Stoffwechselgeschehen weiterhin involvierten Gene besteht, konnten bisher 3 Positionen als mögliche Genorte bei der NZO-Maus nachgewiesen werden (Leiter, pers. Mitteilung). Über Genbeteiligungen an der ebenfalls durch Züchtungsversuche verifizierten polygenen Ursache des Syndroms der KK-Mäuse liegen keine Befunde vor. Stoffwechselmäßig spiegeln NZO- und KK-Mäuse vornehmlich eine morbide Adipositas wider.

Literatur

[1] Parish, N. M., Cooke, A., Animal models of autoimmune endocrine disease and their uses in developing new methods of intervention. Baillierès Clin. Endocrinol. Metab. **9,** 175 (1995)

[2] Herberg, L., Coleman, D. L., Laboratory Animals Exhibiting Obesity and Diabetes Syndromes. Metabolism **26,** 59 (1977)

[3] Herberg, L., Rat Models of Morbid Obesity and Syndrome X. In: Progr. Obesity Res. 7, A. Angel, H. Anderson, C. Bouchard et al. (eds.), pp. 539–553, John Libbey & Co Ltd. (1996)

[4] Leiter, E. H., Herberg, L., The Polygenetics of Diabesity in Mice. Diabetes Rev. **5,** 131 (1995)

[5] Herberg, L., Animal Models for Studies of Relationships between Diet and Diabetes. Comp. Anim. Nutr. **6,** 111 (1988)

[6] Leiter, E. H., Herberg, L., Aging, Pancreatic Islets, and Glucose Homeostasis in Inbred Mice. In: Pathobiology of the aging mouse. U. Mohr, D. L. Dungworth, C. C. Capen (eds.), pp. 153–170, ICSI Press, Washington DC (1996)

Pharmakologie von Insulin-Sensitizern an Tiermodellen des metabolischen Syndroms/NIDDM

Hans F. Kühnle

Boehringer Mannheim GmbH, Präklinische Forschung und Entwicklung, Diabetes, Mannheim

Der nicht Insulin-abhängige Diabetes mellitus (NIDDM) ist eine weltweit verbreitete Erkrankung des Intermediärstoffwechsels mit rapide wachsender Prävalenz. Heute wird die Anzahl der Typ-II-Diabetiker auf ca. 140 Millionen geschätzt, wobei in den nächsten 10 Jahren mit einer Verdoppelung gerechnet werden muß. Die Erkrankung ist durch eine große Heterogenität charakterisiert und kann daher wohl nicht durch einen singulären pathophysiologischen Mechanismus beschrieben werden. Darüber hinaus variiert die Prävalenz des NIDDM beträchtlich in verschiedenen Regionen der Welt, und diese Tatsache läßt sich am besten durch einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund und unterschiedliche Umweltfaktoren erklären.

Ein voll entwickelter Diabetes mellitus kann lediglich als ein Endzustand einer langen Kette von Ereignissen im pathophysiologischen Geschehen dieses Krankheitsbildes gesehen werden. Zu diesem Zeitpunkt können bereits bei vielen Patienten Komplikationen wie Makroangiopathie, Albuminurie, Retinopathie, Hypertension und Hypertriglyzeridämie beobachtet werden, und dieses „Metabolische Syndrom" ist die eigentliche Ursache für die gesteigerte Morbidität dieser Patienten.

Aufgrund der nur mangelhaften Kenntnisse der Pathophysiologie des Typ-II-Diabetes war das Interesse bei der Suche nach oral wirksamen Therapeutika zunächst auf die gestörte Insulin-Sekretionsdynamik gerichtet, die als eigentliche Ursache dieses Krankheitsbildes galt. Mit der mehr oder weniger zufälligen Entdeckung des Sulfonylharnstoffes „Carbutamid" und seiner Insulin-ausschüttenden Wirkung konnte bald darauf das erste orale Antidiabetikum in die Therapie eingeführt werden. Zur Weiterentwicklung dieser Substanzen wurden als Tiermodelle nunmehr vor allem Kaninchen und Ratten eingesetzt, die nach Applikation von wirksamen Testsubstanzen mit einer prompten Insulinausschüttung und einer entsprechenden Hypoglykämie reagierten. Es stellte sich dabei heraus, daß vor allem das Kaninchen bezüglich dieser Wirkungsqualität eine hohe Relevanz zum Menschen zeigt, und daher wurde die Optimierung der Sulfonylharnstoffe hauptsächlich unter Einsatz dieses Tiermodells durchgeführt. Dies führte in relativ kurzer Zeit zur Auffindung von hochpotenten Substanzen mit geringer Nebenwirkungsrate, die als Sulfonylharnstoffe der II. Generation in die Therapie eingeführt wurden. Darüber hinaus wurde mit den Biguaniden eine neue Substanzklasse aufgefunden, die ihre Wirkung zumindest teilweise durch eine Hemmung der hepatischen Glukoneogenese entfalten. Diese Verbindungen wurden vor allem am nüchternen Meerschweinchen getestet, da dieses Tiermodell aufgrund seiner dem Menschen ähnlichen cytosolisch-mitochondrialen Verteilung der glukoneogenetischen Schlüsselenzyme als besonders geeignet erschien.

In den letzten Jahren konnte nunmehr in einer Vielzahl von klinischen Studien gezeigt werden, daß es bei einer genetisch prädisponierten Population zusammen mit Umweltfaktoren zu einer Entwicklung einer peripheren Insulin-Resistenz kommt, die eine wesentliche, wenn nicht die entscheidende Komponente der Pathophysiologie des NIDDM darstellt. Diese sowohl peripher im Muskel, als auch im Fettgewebe sowie in der Leber nachweisbare Resistenz wird zunächst durch eine vermehrte Insulin-Ausschüttung kompensiert. Eine signifikante Hyperglykämie entwickelt sich jedoch dann, wenn die Insulinsekretionskapazität von Insulin-resistenten Individuen nachläßt, und eine deutliche Erhöhung der Glykämie wird dann bei einer relativ geringen Verminderung der Insulinsekretion beobachtet. Insulinresistenz allein führt daher nicht zu ausgeprägtem Diabetes, sondern eine zusätzliche Störung der Insulin-Sekretion ist ebenfalls erforderlich und auch dieser Defekt scheint genetisch determiniert zu sein.

Ausgehend von diesen Befunden und von dem rapide wachsenden Kenntnisstand über die Insulin-Signaltransduktionskaskade von der Bindung dieses Hormons an seinen Rezeptor bis zu den metabolischen Endpunkten wie Glukosetransport und Metabolismus ergab sich nunmehr eine zuvor nicht denkbare Chance zur Auffindung von neuen, an der Pathophysiologie des NIDDMs orientierten Therapieregimen. Allerdings wird eine solche Entwicklung heute noch dadurch erschwert, daß die Insulin-Signaltransduktion äußerst kompliziert und bis heute noch nicht vollständig verstanden ist.

Kritisch für die Optimierung dieser neuen Therapieformen ist natürlich die Bereitstellung von Tiermodellen, die das humane metabolische Syndrom repräsentieren. Glücklicherweise stehen uns heute eine Vielzahl von sogenannten spontan-diabetischen Tieren zur Verfügung, die aus Spontanmutationen und nachfolgender Züchtung hervorgegangen sind. Der zeitliche Verlauf des Auftretens des Metabolischen Syndroms bei diesen Modellen wird sowohl von dem genetischen Hintergrund als auch vom Alter und der Nahrungszusammensetzung beeinflußt. Da die biochemische Ursache der Insulin-Resistenz noch weitgehend unbekannt ist, sind allerdings Unterschiede zwischen diesen Modellen und den Verhältnissen beim Menschen nicht auszuschließen.

Die Erforschung der ersten zur Beeinflussung der Insulinresistenz und metabolischen Syndroms geeigneten Substanzklasse, den sogenannten Thiazolidindionen, hat sich nunmehr gezeigt, daß die uns zur Verfügung stehenden Tiermodelle tatsächlich zum Auffinden und zur Optimierung dieses Therapieprinzips geeignet sind. So konnte z. B. bei der oralen Applikation von hochwirksamen Thiazolidindionen bei der ob/ob-Maus, die durch eine moderate Hyperglykämie bei ausgeprägter Insulinresistenz und Hyperinsulinis-

mus charakterisiert ist, eine Normalisierung der Blutglukosekonzentrationen sowie eine Reduktion der Insulinspiegel bei gleichzeitiger Senkung der Konzentration der freien Fettsäuren und der Triglyzeride im Serum beobachtet werden. Ähnliche Effekte waren auch im Humanversuch nach chronischer Therapie bei Typ-II-Diabetikern nachweisbar. Db/db-Mäuse zeigen in einem bestimmten Lebensabschnitt eine ausgeprägte Hyperglykämie bei sinkenden Insulin-Spiegeln und nachlassender Sekretionskapazität und gleichzeitiger Degeneration der B-Zellen. Nach chronischer oraler Gabe von Thiazolidindionen oder anderen hochwirksamen Substanzen mit Wirkung auf die pheriphere Insulinresistenz konnte bei diesem Modell ebenfalls eine ausgeprägte Reduktion der Hyperglykämie gezeigt werden. Interessanterweise fielen bei diesem Tiermodell die bereits erniedrigten Insulin-Spiegel nicht weiter ab, sondern es wurde ein, wenn auch geringfügiger, jedoch dosisabhängiger Anstieg der Insulin-Konzentration im Serum nachgewiesen. Simultan kann durch immunologische Methoden eine Regranulation der B-Zellen des Inselapparates beobachtet werden. Dies läßt auf eine Erholung der Insulin-Sekretionskapazität nach Wiederherstellung der Insulin-Empfindlichkeit der Peripherie schließen. Ob dieser Befund auch beim Menschen vorliegt und evtl. zur Primärprävention nutzbar gemacht werden kann, wird zur Zeit in einer breitangelegten NIH-Studie geprüft.

Die fa/fa-Ratte mit ihrer extremen Insulin-Resistenz bei ausgeprägter Hyperinsulinämie und daher nur geringfügig erhöhten Blutglukose-Konzentration, jedoch mit pathologischer Glukosetoleranz, eignet sich besonders zur Durchführung von euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp-Studien, mit denen der Effekt von Testsubstanzen auf die periphere und hepatische Insulin-Resistenz direkt nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Aufgrund der ausgeprägten Resistenz dieses Tiermodells ist selbst nach Zuführung von hohen Insulin-Dosen zur Aufrechterhaltung der Normoglykämie nur eine geringe Glukosezufuhr erforderlich. Nach chronischer Applikation von wirksamen Testsubstanzen ist dagegen zur Vermeidung einer Hypoglykämie eine drastische Steigerung der Glukoseinfusionsrate erforderlich.

ZDF-Ratten weisen bei ihrem altersabhängigen Verlauf der Glukose- und Insulin-Spiegel große Ähnlichkeit mit den Verhältnissen am Menschen auf und sind daher offensichtlich für die Entwicklung von an der Pathophysiologie des NIDDM orientierten Therapieregimen besonders geeignet. Auch bei dieser Spezies kann nach chronischer Gabe von wirksamen Substanzen eine signifikante Reduktion der in frühem Lebensalter zu beobachtenden Hyperglykämie und Hyperinsulinämie nachgewiesen werden. Wird die Therapie vor der Entwicklung der Hyperglykämie begonnen, so führt dies offensichtlich zu einer deutlichen Verzögerung der Diabetes-Manifestation.

Neben den erwähnten Nagetier-Modellen des diabetischen Syndroms soll auch noch die Existenz einiger Kolonien verschiedener diabetischer Affenspezies erwähnt werden, deren Verfügbarkeit natürlich eingeschränkt ist.

In der Zukunft wird sich hoffentlich die Möglichkeit eröffnen, basierend auf dem zunehmenden Wissensstand über die biochemischen Grundlagen der Insulin-Resistenz, transgene Tiermodelle zu entwickeln, die die Heterogenität des humanen NIDDM repräsentieren und damit die Entwicklung einer entsprechenden Differentialtherapie ermöglichen sollten.

Literatur

Kühnle, H. F., Schmidt, F. H., Deaciuc, I. V., In vivo and in vitro Effects of a New Hypoglycemic Agent 2-(3-Methylcinnamylhydrazono)-Propionate (BM 42.304) on Glucose Metabolism in Guinea Pigs. Biochem. Pharmacol. **33,** 1437 (1984)

Freund, P., Wolff, H. P., Kühnle, H. F., (-) BM 13.0913: A New Oral Antidiabetic Agent That Improves Insulin Sensitivity in Animal Models of Type II (non-insulin-dependent) Diabetes mellitus. Metabolism. **44,** 570 (1995)

Apweiler, A., Kühnle, H. F., Ritter, G. et al., Effect of the New Oral Antidiabetic Agent (-)-BM 13.0913. Na on Insulin Resistance in Lean and Obese Zucker Rats. Metabolism. **44,** 577 (1995)

Kühnle, H. F., Wolff, H.-P., Pill, J., BM 13.1258: Ein hochpotentes Thiazolidindion mit Wirkung auf die periphere Insulinresistenz. Diabetes Stoffwechsel **6,** 124 (1997)

Kühnle, H. F., New therapeutic agents for the treatment of NIDDM. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes **104,** 93 (1996)

Animal Models in Osteoporosis Research

Frieder Bauss

Boehringer Mannheim GmbH, Preclinical Research and Development, Bone Metabolism, Mannheim (Germany)

Osteoporosis as a consequence of the menopause has become a major healthcare problem since the average age of the population is rapidly rising. The disease is characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone fragility and susceptibility to fractures [1]. It also results in substantial morbidity and mortality. Thus, interest in bone research relating to this disease has grown considerably over the past decade. Besides intensive clinical investigations, one of the most important issues to investigate is the availability of relevant animal models for reflecting the clin-

ical situation in the most appropriate way. This will facilitate studies on the underlying mechanisms and, thus, optimal drug development for the treatment of the disease.

For drugs intended to prevent or reverse osteoporosis, the animal model should at least possess the following characteristics: increased bone turnover after cessation of ovarian function, with bone resorption exceeding formation, leading to osteopenia that is not spontaneously reversible and affecting both cancellous and cortical bone tissue at relevant skeletal sites such as vertebrae, metaphysis and diaphysis of long bones, and skeletal fragility.

The choice of animal species is partly dependent upon the histodynamic characteristics of basal and stimulated bone remodeling patterns and their comparability to humans. Also required is a similar skeletal response to established therapy with estrogens, anti-estrogens, bisphosphonates, parathyroid hormone (PTH), calcitonin, vitamin D or exercise. Accordingly, the most relevant species for the initial demonstration of drug efficacy seem to be the rat and the mouse, i.e. two species that were unjustifiably rejected for several decades as unreliable in osteoporosis research because they show little, or often no, Haversian remodeling in cortical bone, as occurs in humans [2, 3]. This re-acceptance has now been confirmed worldwide by various authorities that require proof of anti-osteoporotic drug efficacy in rats as a prerequisite for approval. Because of its lack of appropriate Haversian remodeling, the rat is regarded as a modeling species, and other larger animals, e.g. dogs, sheep, minipigs, ferrets or non-human primates, i.e. remodeling species, are additionally required. While the monkey is the most readily accepted species in this respect, the others are under controversial discussion for various reasons, e.g. reproducibility of bone loss, nutritional aspects, poor characterization, availability of animals or their handling. While proof of drug activity in vivo could be obtained in young growing animals, long-term treatment is recommended in skeletally mature individuals, with a duration corresponding to 4 years' treatment in humans. Thus, the bone remodeling period (sigma) of each species has to be taken into account.

A variety of methods exist for inducing bone loss. Those inducing a high skeletal turnover include ovariectomy, orchidectomy, dietary manipulation, e.g. calcium deprivation in lactating or non-lactating animals, high phosphate or vitamin deficiency, tumor inoculation or tumor-related protein infusion, induction of osteoclast activity (in thyroparathyroidectomized animals) by parathyroid (PTH), vitamin D or retinoids, administration of anti-gonadal hormones (anti-estrogens, anti-androgens) or hormone-releasing factors (e.g. luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonists). Low turnover is induced by immobilization (e.g. plaster casts, sciatic denervation, tenotomy), skeletal unloading (e.g. hindlimb suspension) or administration of corticosteroids. All models express their own specificity for periosteal and endosteal bone resorption as well as different effects on trabecular and cortical bone loss at different skeletal sites [4, 5]. Although it is common knowledge that even established osteoporosis reflects a high turnover, models expressing low turnover are also desired. These models would be sensitive even to small drug effects regarding bone formation, whereas such effects would be diminished or attenuated in high turnover models, and thus provide a reliable tool for the detection and optimization of anabolic drugs.

Assessment of bone mass and architecture should combine invasive and non-invasive methods that reflect both clinical applicability and animal-specific methods. Non-invasive determination of bone mass by single and dual photon absorptiometry (SPA, DPA) or single and dual X-ray absorptiometry (SXA, DXA) are usually employed in humans and animals. The detection of bone mass by direct mineral analysis, e.g. determination of bone ash and calcium content of whole bones, is mainly restricted to animals. Also, the detection of biomechanical properties by bending, torsion, indentation and crash tests as part of the bone quality program have to be specifically based on animals, although considerable effort is being expended in developing surrogate parameters, e.g. peripheral computerized tomography (pQCT) or ultrasound. Such analyses have to include trabecular bone and cortical bone in both long bones and vertebrae. The same is true for histomorphometric analyses, which are primarily designed to demonstrate normal bone (micro)structure and architecture, determined by textural analyses of bone matrix (lamellar or woven bone), static and dynamic histomorphometry, including the presence of adequate mineralization and cellular response, and no deterioration in (micro)-fracture repair.

Another non-invasive method for the investigation of bone turnover is the determination of bone markers in serum or urine. These markers show varying degrees of specificity to bone tissue, although their clinical reliability depends on the turnover status and needs further elucidation. Markers for bone formation are bone-specific alkaline phosphatase, type I C-terminal propeptide (PICP) and procollagen type I N-terminal propeptide (PINP), whereas bone resorption is best expressed by urinary excretion of pyridinoline crosslinks and their associated peptides (CTX, NTX, etc.) hydroxyproline, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), or calcium. Osteocalcin is an indicator of bone turnover rather than bone formation. Unfortunately, PICP, PINP, CTX, and NTX are currently only available for human diagnostics.

Since each of the applied models and methods possess their own level of specificity, correlations with each other and with clinical parameters are essential. The greater the significance demonstrated between methods, models and species, the more likely the acceptance of surrogate parameters by authorities in the future. An example of the preclinical development of a bisphosphonate in some of the above-mentioned models is provided in [6].

References

[1] Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am. J. Med. **94,** 646 (1993)

[2] Kalu, D. N., The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. **15,** 175 (1991)

[3] Frost, H. M., Jee, W. S. S., On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner. **18,** 227 (1992)

[4] Kimmel, D. B., In vivo animal models in osteoporosis research. In: Osteoporosis, R. M. Marcus (ed.), pp. 354–382, Blackwell Scientific Publications, Boston (1994)

[5] Geddes, A. D., Animal models of bone disease. In: Principles of Bone Biology. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, G. A. Rodan (eds.), pp. 1343–1354, Academic Press, San Diego–London (1996)

[6] Bauss, F., Ibandronate in malignant bone diseases and osteoporosis – preclinical results. Onkologie **20,** 204 (1997)

Fibrose-Tiermodelle (Leber, Niere, Lunge)

Volkmar Günzler, Martin Bickel, Martin Gerl, Georg Tschank und Ulrich Werner

Hoechst Marion Roussel, Frankfurt/Main

Mit der Aufklärung von Struktur und Funktion der Proteine der extrazellulären Matrix wurde die Suche nach fibrosehemmenden Substanzen ein Schwerpunkt pharmakologischen Interesses. Dabei steht die Entwicklung von aussagekräftigen Tiermodellen im Vordergrund. Bei Hoechst wurden Tiermodelle für fibrotische Erkrankungen der Leber, der Lunge und der Niere teils im Hause, teils in Kooperation mit externen Arbeitsgruppen bearbeitet.

1. Leberfibrosemodelle

Einige Modelle, z. B. die Thioacetamid- und die Galaktosamin-induzierte Leberfibrose, scheiden aus praktischen Gründen (zu lange Versuchsdauer, schlechte Reproduzierbarkeit) für die präklinische Entwicklung von Fibrosehemmstoffen aus.

CCl_4-induzierte Leberfibrose der Ratte

Die experimentell durch CCl_4 induzierte Leberfibrose ist das am häufigsten verwendete Modell. Zweimalige wöchentliche Gaben von CCl_4 (1 ml/kg Körpergewicht) führen im Verlauf von zwölf Wochen bis zu einer Verzehnfachung des Kollagengehaltes der Leber (gemessen als Hydroxyprolin). Nach einem ausgeprägten Fettleberstadium mit Zunahme des Organgewichtes kommt es im weiteren Verlauf zu einer Abnahme des Lebergewichtes, in Extremfällen bis auf ein Drittel des Ausgangsgewichtes.
Werden ausreichend große Gruppen verwendet, beobachtet man sehr früh eine Abweichung der Hydroxyprolin-Werte von der Normalverteilung. Diese nimmt mit längerer Versuchsdauer zu und führt zu einer extremen Steigerung der Varianz. Die statistische Analyse verlangt nichtparametrische Verfahren. Um eine Substanzwirkung von 35 % (Hemmung des Hydroxyprolin-Gehaltes der Leber) nach acht Wochen Versuchsdauer statistisch sichern zu können, sind Gruppengrößen von mindestens 60 Tieren erforderlich. Die Verteilung der Meßwerte von klinisch-chemischen Parametern und von Markern der Matrixsynthese, z. B. N-terminales Prokollagen Typ III-Peptid, (PIIINP) oder Fragmenten von Typ IV-Kollagen entspricht der Verteilung der Hydroxyprolin-Werte. Die Mehrzahl der bisher publizierten Arbeiten zur CCl_4-induzierten Leberfibrose berücksichtigt diese Gegebenheiten nicht. In der Regel werden viel zu kleine Gruppen und zur statistischen Analyse der t-Test verwendet. Dies führt oft zu erkennbar falschen Resultaten und unkorrekten Signifikanzberechnungen. Zusätzliche Zufuhr von Ethanol im Trinkwasser von Ratten unter CCl_4 beschleunigt weder den fibrogenetischen Prozeß, noch steigert sie den Fibrosegrad.

Gallengangsligatur der Ratte

Die Gallengangsligatur führt durch Stauung des Gallenabflusses zu einer kontinuierlichen Vergrößerung und Fibrosierung der Leber. Im Verlauf von sechs Wochen kommt es ohne ausgeprägte Fettleberphase zu einer Verdreifachung des Organgewichtes und einer Zunahme des Leber-Hydroxyprolin-Gehaltes um etwa das Vierfache des Ausgangswertes. Zwischen den einzelnen Rattenstämmen bestehen große Unterschiede in der postoperativen Überlebensdauer. Die Leber-Hydroxyprolin-Werte (ebenso wie alle anderen Parameter) sind ebenfalls nicht normalverteilt; zur statistischen Sicherung einer Hemmwirkung von 35 % nach 5 Wochen sind Gruppengrößen von mindestens 40 Tieren erforderlich.

Dimethylnitrosamin-induzierte Leberfibrose der Ratte

Die Applikation von 10 µl Dimethylnitrosamin/kg Körpergewicht an fünf Tagen in der Woche führt im Verlauf von fünf Wochen zu einer ausgeprägten Leberfibrose, welche dem Bild der CCl_4-induzierten Fibrose nach 8–10 Wochen Versuchsdauer, auch im Hinblick auf die Verteilung der Meßwerte, entspricht. Dem Vorteil der kürzeren Versuchsdauer steht der Nachteil der extremen Giftigkeit des Dimethylnitrosamins gegenüber. Unsere Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Kivirikko, Oulu (Finnland) durchgeführt.

Fibrose durch Cholin-defiziente, Ethionin-supplementierte Diät

Bei diesem Modell handelt es sich nicht um ein reines Leberfibrosemodell, da auch andere Organsysteme eine Erhöhung des Kollagengehaltes erfahren. Weil nach längerer Versuchsdauer vermehrt Lebertumoren auftreten, wird diese Diät auch als Karzinogenese-Modell verwendet. Im Verlauf von 16 Wochen kommt es zu einer Verdoppelung des Leber-Hydroxyprolin-Gehaltes. Die Verteilung der Meßwerte ist nur in den ersten Wochen günstiger als bei den anderen Modellen. Die Entwicklung der Fibrose in der Anfangsphase ist jedoch nur schwer zu interpretieren, da es dann zu einer Arretierung der Körpergewichtsentwicklung und einer Abnahme des Lebergewichtes kommt. Unsere Versuche wurden zum Teil in Kooperation mit Dr. Steinberg, Mainz, durchgeführt.

Andere Leberfibrosemodelle

Als weitere Fibrosemodelle wurden die ethanolinduzierte Schädigung der Leber beim Schwein und die Schistosomiasis der Maus (in Zusammenarbeit mit Dr. Mike Phillips, Philadelphia, USA) verwendet. Zur genaueren Analyse der Daten fehlen hier repräsentative Versuche mit großen Gruppen. Nach 3-monatiger Verfütterung von Ethanol an Schweine (5 g/kg p.o. täglich) war ein signifikanter Anstieg von PIIINP nachzuweisen. Nach Literaturangaben sind histologisch faßbare fibrotische Veränderungen frühestens nach 12 Monaten zu erwarten. Von der Varianz der Meßwerte her und der Stärke der Schädigung scheint es sich bei der Schistosomiasis um ein ausgezeichnetes Modell zu handeln.

2. Strahleninduzierte Lungenfibrose der Ratte

Die strahleninduzierte Lungenfibrose bei der Ratte entspricht exakt der des Menschen. Nach einer Latenzzeit von 6–8 Wochen nach der Bestrahlung setzt die Fibrogenese ein, die im Verlauf von weiteren 6–9 Monaten zur Verdoppelung des Hydroxyprolin-Gehaltes des Lungengewebes führt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Kollagengehalt der gesunden Lunge etwa zehnfach höher ist als der der Leber. Die Varianz ist mit 10–15 % des Mittelwertes (SD) sehr klein. In unseren Versuchen wurde die rechte Lunge bestrahlt. Durch genaue Lokalisation des Strahlenfeldes läßt sich eine Schädigung der linken Lunge und des Herzens vermeiden. Der fibrotische Umbau des Organs reicht nicht aus, um eine Erhöhung des Serum-PIIINP zu bewirken. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Baumann, Dresden, durchgeführt.

3. Ureterligatur bei der Ratte

Bei der Ratte läßt sich durch unilaterale Ureterligatur eine fortschreitende Nierenfibrose erzeugen. Bereits eine Woche nach der Ligatur ist der Hydroxyprolin-Gehalt des Organs signifikant erhöht. Innerhalb von vier Wochen wird die ligierte Niere komplett bindegewebig umgebaut, der Hydroxyprolin-Gehalt steigt auf das Achtfache. Die Varianz ist mit 10–30 % des Mittelwertes günstig. Der fibrotische Umbau des relativ kleinen Organs bewirkt nur eine mäßige Erhöhung des Serum-PIIINP.

Tiermodelle zur Pathogenese und Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Norbert Wagner

Universitätskinderklinik Bonn und Institut für Genetik der Universität zu Köln

Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa treten mit einer Häufigkeit von etwa 1–2 : 1000 auf und betreffen Patienten im Kindes- wie im Erwachsenenalter. Eine kausale Behandlung für CED existiert bisher nicht und die Pathogenese dieser Erkrankungen ist weitgehend unklar. In den letzten Jahren sind u. a. mittels gezielter Inaktivierung von Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind, Tiermodelle (Maus) etabliert worden, die zur Aufklärung der Äthiopathogenese von CED beitragen können. Diese Tiermodelle können zudem zur Entwicklung neuer Therapieansätze verwandt werden. Auf die einzelnen Tiermodelle soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Interleukin-10-defiziente Maus

Interleukin 10 (IL-10) wurde ursprünglich als Zytokin identifiziert, welches von TH2 Zellen produziert wird und die Synthese von Zytokinen der TH1 Zellen inhibiert. IL-10 wird von B-1 Zellen, Makrophagen und Keratinozyten produziert. IL-10 supprimiert die Aktivierung von Makrophagen und inhibiert die Produktion proinflammatorischer Zytokine. IL-10 defiziente Mäuse entwickeln eine CED, die mit zunehmendem Gewichtsverlust, Anämie und einer erhöhten Mortalität einhergeht. Histologisch ist die CED gekennzeichnet durch eine Enterokolitis, die das gesamte Intestinum befällt. Die entzündlichen Veränderungen sind dabei regional unterschiedlich stark ausgeprägt, so daß eine gewisse Ähnlichkeit mit der Enteritis regionalis (M. Crohn) des Menschen besteht. Das intestinale Epithel ist degenerativ oder hyperregenerativ verändert. Die Mukosa ist hyperplastisch und die Darmwände sind deutlich verdickt. Zum Teil entwickeln sich Pseudopolypen. Es besteht ein ausgeprägtes lymphoplasmozytäres und histiozytäres Infiltrat der Lamina propria sowie der Submukosa. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der MHC (major histocompatibility complex) Klasse II Expression des Darmepithels. Unter SPF (specific pathogen free) Bedingungen in der Tierhaltung erkranken die IL-10-defizienten Tiere in abgeschwächter Form. Eine mögliche pathogenetische Erklärung für die Entstehung der CED in den IL-10-defizienten Tieren ist das Überwiegen der TH1 Antwort auf pathogene Keime im Darmlumen. Dabei führt das Fehlen von IL–10 zu einer mangelnden Suppression von z. B. Makrophagen. Zudem werden proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1 und IFN-γ überproduziert. Die CED der IL-10-defizienten Tiere kann durch die Applikation von IL-10 erfolgreich behandelt werden.

Interleukin-2-defiziente Maus

IL-2 wird von aktivierten T Zellen produziert und unterstützt die T-Zellproliferation sowie die Differenzierung von B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen. Die Zytotoxizität von T-Zellen wird wesentlich verstärkt durch IL-2. In Il-2-defizienten Mäusen ist die

B-Zell-Differenzierung insoweit gestört, als daß preferentiell IgG1 und IgE synthetisiert werden, während die T-Zellentwicklung im Thymus nicht verändert erscheint. IL-2-defiziente Tiere erkranken im Alter von etwa 6 Wochen an einer Splenomegalie, Lymphadenopathie und einer Anämie, woran etwa die Hälfte der Tiere verstirbt. Die andere Hälfte der IL-2-defizienten Tiere entwickelt mit 100%iger Penetranz eine CED. Die CED ist beschränkt auf das Colon, wobei das gesamte Colon zumeist kontinuierlich betroffen ist. Es zeigt sich ein lymphoplasmozytäres Infiltrat mit zerstörter Kryptenarchitektur. Die histologischen Veränderungen ähneln der Colitis ulcerosa des Menschen. Keimfrei gehaltene IL-2-defiziente Tiere erkranken nicht an einer CED. Dies weist auf die essentielle Bedeutung der Darmkeime bzw. der Immunantwort für die Entstehung der CED hin. Kreuzungsexperimente mit anderen Mausmutanten deuten auf eine zentrale pathogenetische Rolle von CD4+ T-Zellen bei der Entstehung der CED der IL-2-defizienten Tiere hin, während CD8+ Zellen hierfür entbehrlich erscheinen. Da in IL-2-defizienten Tieren Autoantikörper gegen Colon detektierbar sind, spielt möglicherweise eine durch fehlendes IL-2 nicht kontrollierte B-Zell-Immunantwort auf Darmkeime eine kausale Ursache für die Entstehung der CED. IL-12 scheint wesentlich an der Entwicklung von TH1-Zellen, die Colitis induzieren können, beteiligt zu sein.

CD3ε-transgene Maus

Mäuse, die ein humanes CD3-Transgen exprimieren, entwickeln einen frühen T-Zell-Defekt, der durch das Fehlen einer regulären Thymusentwicklung gekennzeichnet ist. Wenn diese Tiere mit T-Zell-depletiertem Knochenmark nichtmutanter Mäuse transplantiert werden, entwickeln sie mit hoher Penetranz eine CED. Diese ist durch vorwiegenden Befall des Colons, chronische Diarrhoe und schweren Gewichtsverlust gekennzeichnet. Histologisch zeigt sich eine Beteiligung der Mukosa und Submukosa des Colons mit Verdickung der Darmwand. Die Becherzellen verschwinden und Kryptenabszesse entstehen. Es besteht ein ausgeprägtes vorwiegend lymphozytäres Infiltrat in der Lamina propria. Der Dünndarm ist auch mikroskopisch nicht betroffen. In diesem Modell einer CED wird die wesentliche Bedeutung von T-Zellen für die Pathogenese deutlich, da der Transfer von Colitis induzierenden peripheren T-Zellen in B Zell defiziente (RAG-1-defiziente) Mäuse eine CED auslöst. Zudem können TCRγδ T-Zellen die Erkrankung ebenso auslösen, wie TCRαβ T-Zellen; die Erkrankung korreliert in beiden Fällen mit der Produktion von IFN-γ durch die T-Zellen.

Zusammengefaßt resultiert vermutlich die T-Zell-Entwicklung in einem aberranten Thymus in T-Zellen, die eine pathogene Immunantwort im Darm auslösen können.

CD45RBhi-induzierte CED

SCID (severe combined immunodeficiency) Mäuse leiden an einem Immundefekt, der durch Fehlen von T- und B-Zellen gekennzeichnet ist. Wenn diese Mäuse mit einer Subpopulation von T-Zellen, den CD45RBhi CD4+ T-Zellen, rekonstituiert werden, entwickelt sich eine CED. Drei bis 5 Wochen nach der Rekonstitution zeigt sich ein Gewichtsverlust mit entzündlichen Veränderungen im Zökum, Colon und Rektum. Histologisch findet sich ein lymphozytäres Infiltrat in der Mukosa, Submukosa und Muscularis mucosae mit Ulzerationen und tiefen Fissuren. Die Dysbalance von regulatorischen T-Zellen als auslösende Ursache der Erkrankung wird deutlich, da der gemeinsame Transfer von CD45RBlo CD4+ T-Zellen mit den Colitis induzierten CD45RBhi CD4+ T-Zellen die Entstehung der CED verhindert. Ebenso verhindert die Administration von anti-IFN-γ monoklonalen AK oder von IL-10 das Auftreten der CED nach Transfer von CD45RBhi CD4+ T-Zellen in SCID Mäuse. Vermutlich ist daher eine polarisierte TH1-Immunantwort im Darm wesentlich an der Pathogenese der CED in diesem Modell beteiligt. Die durch CD45RBhi CD4+ T-Zellen ausgelöste Erkrankung kann mittels mAk gegen die Adhäsionsmoleküle Integrin α4β7 und MAdCAM-1 erfolgreich behandelt werden.

TNBS-behandelte Maus

Die intrarektale Applikation des Haptens TNBS induziert eine CED in der Maus. Die Tiere entwickeln eine schwere Diarrhoe, Gewichtsverlust und einen Rektumprolaps. Die Krankheitsdauer beträgt 2 Monate. Histologisch zeigt sich eine transmurale Entzündung mit vorwiegend granulozytärem und lymphozytärem Infiltrat, die Becherzellen sind reduziert, sowohl Ulzerationen als auch Granulome treten auf. Immunologisch findet sich eine vorwiegende Aktivierung von TH1-Zellen mit Produktion von IFN-γ. Die Administration von mAk gegen IL-12 und TNF-α oder von antisense Oligonukleotiden gegen die p65 Untereinheit von NF-κB verhindert die Entstehung der Erkrankung.

Literatur

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M. et al., A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature **389,** 737 (1997)

Holländer, G. A., Simpson, S. J., Mizoguchi, E. et al., Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. Immunity **3,** 27 (1995)

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D. et al., Interleucin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell **75,** 263 (1993)

Ludviksson, B. R., Gray, B., Strober, W. et al., Dysregulated intrathymic development in the IL-2-deficient mouse leads to cilitis-inducing thymocytes. J. Immunol. **158,** 104 (1997)

Neurath, M. F., Petterson, S., Meyer zum Büschenfelde, K. H. et al., Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-κB abrogates established experimental colitis in mice. Nature Med. **2,** 998 (1996)

Picarella, D., Hurlbut, P., Rottman, J. et al., Monoclonal antibodies specific for β7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T-cells J. Immunol. **158,** 2099 (1997)

Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S. et al., Inhibition of Th1 responses prevent inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T-cells. Immunity **1,** 553 (1994)

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H. et al., Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell **75,** 253 (1993)

Simpson, S. J., Mizoguchi, E., Allen, D. et al., Evidence that CD4+, but not CD8+ T-cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. Eur. J. Immunol. **25,** 2618 (1995)

Wagner, N., Löhler, J., Kunkel, E. J. et al., Critical role for β7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. Nature **382,** 366 (1996)

Tiermodelle für rheumatische Erkrankungen und regulatorische Immunantworten

Jürgen Lindner

Hoechst Marion Roussel, Pharma-Forschung, Frankfurt/Main

Bei der rheumatischen Arthritis (RA) handelt es sich um ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild, dessen Ursachen noch nicht abschließend geklärt sind. Neue Wirkstoffe werden heute meist aufgrund von Ergebnissen aus In-vitro-Testsystemen gefunden. In diesen In-vitro-Testsystemen wird die Beeinflussung von Faktoren gemessen, welche bei der rheumatoiden Arthritis verändert sind und von deren Beeinflussung man sich therapeutisch positive Effekte erhofft. Aus ethischen Gründen ist vor dem Einsatz von neuen Wirkstoffen beim Menschen zu belegen, ob in krankheitsrelevanten Tiermodellen die Beeinflussung dieser Faktoren tatsächlich zu einem positiven therapeutischen Effekt führt. An diese krankheitsrelevanten Tiermodelle ist vor allem der Anspruch zu stellen, daß sie die pathophysiologischen Vorgänge der rheumatoiden Arthritis, soweit sie bekannt sind, möglichst exakt widerspiegeln. Zur Beurteilung der Eignung verschiedener Tiermodelle bei der Auffindung neuer Wirkstoffe ist daher eine Betrachtung der pathophysiologischen Vorgänge bei der rheumatoiden Arthritis notwendig.

Epidemiologische Untersuchungen haben ergeben, daß es bei der RA eine gewisse genetische Prädisposition bezüglich des HLA (human leucocyte antigen)-Systems (z. B. HLA DR4) gibt [1]. Diese Untersuchungen haben aber auch eindeutig belegt (z. B. relativ geringe Korrelation des Auftretens der RA bei eineiigen Zwillingen), daß es sich bei der RA um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung handelt, bei der auch Faktoren wie Umweltbedingungen und Ernährung eine Rolle spielen [2]. Heute existiert die Ansicht, daß der Auslöser für eine rheumatoide Arthritis zunächst eine bakterielle oder virale Infektion darstellt [3]. Im Rahmen dieser primären Infektion entsteht eine sogenannte reaktive Arthritis. Die weitere Entwicklung zur rheumatoiden Arthritis ist bisher unklar, sie mündet jedoch in dysregulierten Entzündungs- und Abwehrreaktionen des Organismus und einem destruktivem Wachstum der Synovialis in den Knorpel [3]. Diese fehlgesteuerten Reaktionen des Immunsystems scheint sich entweder gegen körpereigenes Gewebe (Autoimmunität), persistierende Xenoantigene oder persistierende Infektionserreger zu richten. Das destruktive Wachstum der Synovalis könnte zum einen durch die ablaufenden entzündlichen Reaktionen verursacht werden oder aber das Ergebnis einer tumorartigen Veränderung von Synovialzellen sein.

Tierexperimentelle Untersuchungen an bakteriell induzierten spontanen chronischen Arthritiden haben gezeigt, daß eine gegen den Erreger gerichtete Therapie nur während den ersten 5–7 Tagen einer Infektion möglich ist [4]. Später sind diese bakteriell induzierten Arthritiden, wie die menschlichen Polyarthritis nur noch geringgradig zu beeinflussen [4]. Die Ursache für dieses nicht Ansprechen der antibakteriellen Therapie in einer späteren Phase dieser Arthritiden sind wie bei der rheumatoiden Arthritis beim Menschen in der Persistenz von Infektionserregern (z. B. latent ruhend) im Gelenk, in der Persistenz von bakteriellen Antigenen (z. B. Zellwandfragmenten) und/oder einem Zusammenbrechen der Selbsttoleranz aufgrund der vorangegangenen bakteriellen Entzündung zu sehen.

Tiermodelle für RA sollten daher die verschiedenen pathophysiologischen Umstände der RA widerspiegeln, welche klinisch nach dem Auftreten der reaktiven Arthritis beobachtet werden.

Die Collagen-Typ II-Arthritis ist eine reine Autoimmunerkrankung und wird durch eine Immunisierung gegen das für den Knorpel spezifische Typ II-Collagen induziert. Die Tiere entwickeln eine lokale Autoimmunreaktion gegen Knorpel und man kann wie bei vielen RA Patienten im Serum Antikörper gegen Collagen Typ II nachweisen. Die Erkrankung kann sowohl mit Hilfe von Anti-Collagen-Typ II-Antikörpern als auch durch Autoreaktive T-Zellklone übertragen werden [5]. Die Collagen-Typ II-Arthritis kann in verschiedenen Spezies wie Maus, Ratte und Affen induziert werden. Histologisch beobachtet man, wie bei der RA, eine Beteiligung der Synovialis an der Arthritis. Außer den Gelenken wird auch der Knorpel der Ohren, das Gehör- und Gleichgewichtsorgan von dieser Erkrankung betroffen. Durch Infektionen der Versuchstierkolonie kann die Inzidenz der Erkrankung und damit die Auswertbarkeit der Versuche sehr stark beeinflußt werden. In diesem Modell sind nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs), Steroide und zytotoxische Substanzen wirksam. Penicillamine ist effektive, Levamisole zeigt keine Wirkung während Goldverbindungen die Erkrankung verstärken.

Das Modell der Adjuvanz-Arthritis (AA) stellt eine systemische Autoimmunerkrankung mit Beteiligung der Gliedmaßen und Gelenke dar. Sie wird durch subplantare oder subdermale Injektion von abgetöteten Mykobakterien (tuberculosis, phlei oder butyricum), welche in Freudschen Adjuvanz aufgenommen werden, induziert. Die Erkrankung kann nur bei Ratten hervorgerufen werden. Nach einer akuten Entzündung im Bereich der Injektionsstelle, welche 4 bis 5 Tage anhält und sich anschließend zurückbildet, entwickelt sich eine schwere systemische Autoimmunerkrankung von der hauptsächlich die Gliedmaßen aber auch andere Organe betroffen sind. Bei der histologischen Untersuchung der entzündlichen Gliedmaßen ist der Knochen stärker von den entzündlichen Prozessen betroffen als die Gelenke und die Synovialis. Die AA in der Lewis Ratte ist ein sehr gut reproduzierbares Modell mit einer Responserate von über 90 %. In diesem Modell zeigen NSAIDS, Steroide, zytotoxische Agentien und Immunsuppressiva eine sehr gute Wirksamkeit, während DMARD's (disease modifying antirheumatic drugs) nur eine geringe bis keine Wirkung besitzen. Die Erkrankung kann durch T-Zellen jedoch nicht durch Antikörper übertragen werden. Tiere, welche die AA überlebt haben (> 100 Tage) haben T-Zellen entwickelt, welche eine protektive Wirkung gegen die AA besitzen. Mit Hilfe dieser T-Zellen (regulatorische T-Zellen) kann eine Resistenz gegen die chronische Phase der AA auf andere Tiere übertragen werden.

Bei der Streptokokkenzellwand (SCW) handelt es sich um eine Arthritis, welche unter anderem durch die Persistenz von bakteriellen Antigenen (Xenoantigenen) und einer daraus resultierenden fehlgeleiteten Immunreaktion hervorgerufen wird.

Die SCW-induzierte Arthritis kann in Ratten und Mäusen induziert werden. Hierzu werden Peptidoglykanfragmente der SCW intraperitoneal gespritzt, die sich innerhalb kurzer Zeit im Synovialisgewebe der Gelenke anreichern und dort zunächst zu einer akuten Entzündungsreaktion führen. Diese Peptidoglykan-Fragmente persistieren über mehrere Monate hinweg im Gelenk und sind an der Aufrechterhaltung einer chronisch entzündlichen Reaktion beteiligt. Die SCW-induzierte Arthritis verläuft in zwei Phasen. Die initiale akute Entzündungsphase beginnt 24 Stunden nach der Injektion der Zellwandfragmente, erreicht ihr Maximum nach 3 bis 5 Tagen und geht dann langsam zurück. Bei dieser initialen akuten Entzündungsreaktion spielt zunächst das Komplementsystem und anschließend weitere humorale inflammatorische Effektorsysteme eine zentrale Rolle. Unter anderem wird in dieser Phase TNF-α (Tumornekrosefaktor α) und Interleukin-1 von Makrophagen gebildet und für die Initiation einer Kaskade von entzündlichen Vorgängen verantwortlich gemacht [6]. T-Zell abhängige Reaktionen haben in dieser Phase keine Bedeutung. Ungefähr 2 bis 3 Wochen nach der Injektion der SCW exazerbiert die Arthritis und hält für mehrere Monate an. Diese chronische Phase der Arthritis ist ein T-Zell-abhängiger Prozess und wird histologisch durch ein destruktives invasives Wachstum der Synovialis in den Knorpel geprägt. Bei der SCW-induzierten Arthritis zeigen NSAIDs, Steroide, zytotoxische Substanzen und Immunsuppressiva eine gute Wirksamkeit. Dagegen zeigen DMARD's keinen Effekt.

Interessanterweise können durch Immunisierung gegen Heat-Shock-protein 60 (HSP 60) regulatorische T-Zellen induziert werden, welche gleichzeitig die Entwicklung der SCW induzierten Arthritis, der Collagen-Typ II-Arthritis als auch der AA unterdrücken können [7]. Dieser Befund zeigt, daß die Entwicklung regulatorischer T-Zell-Antworten bei diesen drei unterschiedlichen Arthritistypen (lokale Autoimmunreaktion, systemische Autoimmunreaktion und Reaktion gegen bakterielle/virale Antigene) zu einem kurativen Therapieergebnis führen können.

Die Induktion einer regulatorischen Immunantwort scheint daher ideal geeignet zu sein chronisch entzündliche Erkrankungen zu behandeln, welche durch Xeno- (bakterielle/virale) oder Selbst-Antigene hervorgerufen werden.

Kürzlich haben wir erstmals die Unterschiede zwischen protektiv/regulatorischen T-Zellen und proinflammatorische/zytotoxische T-Zellen dargelegt [8]. Protektiv/regulatorische T-Zellen sind weniger (suboptimal) aktiviert als proinflammatorische/zytotoxische T-Zellen und besitzen daher weniger Heat-Shock-Proteine (HSP) aber auch eine geringere Stoffwechselaktivität als proinflammatorische/zytotoxische T-Zellen [8]. Durch diese geringere Ausstattung mit HSP werden regulatorische/protektive T-Zellen durch das entzündliche Milieu (mit Sauerstoffradikalen, NO und anderen toxischen Agentien) leichter zerstört als proinflammatorische/zytotoxische T-Zellen. Dies bedeutet, daß sich eine chronisch entzündliche Reaktion mit den Charakteristika einer Autoimmunreaktion aus einem akuten unspezifischen Entzündungsprozeß aufgrund der Elimination der protektiven regulatorischen T-Zellen entwickeln kann. Hiermit ist verständlich, weshalb sich unter bestimmten Umständen aus einer reaktiven Arthritis bakterieller oder viraler Genese eine chronisch entzündliche Arthritis entwickeln kann, welche zum Teil den Charakter einer Autoimmunerkrankung besitzt.

Mit Leflunomid, der Muttersubstanz der Substanzklasse der Malononitrilamide, befindet sich für das Indikationsgebiet RA eine Verbindung in der klinischen Entwicklung, welche das pharmakodynamische Potential besitzt protektiv/regulatorische Immunantworten zu induzieren.

Die Substanzen der Malononitrilamide-Familie inhibieren das Enzym DHODH und damit die Neusynthese von Pyrimidinen. Ruhende und wenig aktivierte Zellen (z. B. protektive T-Zellen) erhalten ausreichende Mengen von Pyrimidinvorstufen (Uridin) über sogenannte Salvage-Pathways, so daß diese Zellen durch die Malononitrilamide weniger geschädigt werden als optimal aktivierte proinflammatorische T-Zellen, welche zusätzlich auf ihre endogene Pyrimidin-Synthese angewiesen sind [8]. Daher kann durch den Einsatz der Malononitrilamide eine regulatorische/protektive Immunantwort induziert werden. Folglich sollte mit dieser Substanzklasse eine kurative Therapie von Erkrankungen, welche durch Immunreaktionen gegen Eigen-, Allo- oder Xeno-Antigen verursacht werden, möglich sein.

Bei der RA ist jedoch zu bedenken, daß neben einer Autoimmunantwort bzw. Immunreaktion gegen bakterielle und virale Antigene auch noch weitere Ursachen wie eine aktive bakterielle bzw. virale Infektion oder eine maligne Veränderung von Synovialiszellen als Ursache für die RA in Betracht kommen. Bei diesen zuletzt genannten Möglichkeiten ist davon auszugehen, daß die Induktion einer regulativen/protektiven Immunantwort nur einen geringen und kurzfristig andauernden Effekt auf die RA ausüben kann.

Literatur

[1] Alsalameh, S., Burmester, G. R., Kalden, J. R., Basic mechanisms in rheumatoid arthritis: the role of T lymphocytes in rheumatoid synovitis. Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. **22,** 289 (1994)

[2] Brackertz, D., Aspekte der chronischen Polyarthritis. In: Pathomechanismen entzündlicher rheumatischer Erkrankungen bei Mensch und Tier. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1989)

[3] Ford, D. K., Understanding Rheumatoid Arthritis. J. Rheumatol. **24,** 464 (1997)

[4] Schulz, L. C., Zur vergleichenden Bedeutung von Tiermodellen in der Rheumaforschung. In: Pathomechanismen entzündlicher Erkrankungen bei Mensch und Tier. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1989)

[5] Cremer, M., Type II collagen-induced arthritis in rats. In: Handbook of animal models for the rheumatic diseases, Volume I. R. A. Greenwald, H. S. Diamond (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida (1988)

[6] Fusler, J. W., Conner, E. M., Davis, J. M. et al., Cytokine and nitric oxide production in the acute phase of bacterial cell wall-induced arthritis. Inflammation **21,** 113 (1997)

[7] Anderton, S. M., van der Zee, R., Prakken, B. et al., Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. J. Exp. Med. **181,** 943 (1995)

[8] Lindner, J. K., Zantl, N., Synergism of the malononitrilamides 279 and 715 with cyclosporine A in the induction of long-term cardiac allograft survival. Transplantation Int. (in press)

Rundtischgespräch

Krankheitsmodelle und Patentschutz

Helga Kolb

Hoffmann · Eitle, Patent- und Rechtsanwälte, München – London

Erfindungen neuer Krankheitsmodelle sind dem Patentschutz zugänglich. Dies trifft für In-vitro-, In-vivo- und Ex-vivo-Modelle zu. Insbesondere soll im folgenden unterschieden werden zwischen zellulären Modellen (in vitro) und Tiermodellen (in vivo).

Aus patentrechlicher Sicht bestehen Unterschiede zwischen den genannten Modelltypen. In-vitro-Modelle können durch eine Reihe von Patentanspruchskategorien geschützt werden, nämlich

- Produktansprüche
- Product-by-Process-Ansprüche
- Verfahrensansprüche und
- Verwendungsansprüche.

Bei Patentierung von Tiermodellen sind insbesondere zwei Rechtsvorschriften zu berücksichtigen, die die Möglichkeiten der Anspruchskategorien einschränken und damit die kommerzielle Verwertung dieser Krankheitsmodelle erschweren können. Bei diesen Rechtsvorschriften handelt es sich im Europäischen Patentübereinkommen (EPÜ) um die Artikel 52 (4) und 53 a und b.

Gemäß Artikel 52 (4) EPÜ sind Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers und Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden, nicht dem Patentschutz zugänglich. Durch diese Rechtsbestimmung, die sich auch im Deutschen Patentschutz findet, soll die Freiheit des Arztes zur Anwendung jeweiliger Therapieschritte und diagnostischer Methoden gewahrt bleiben. Praktisch bedeutet dies, daß ein Verfahrensanspruch nicht so formuliert sein darf, daß er einem Therapieverfahren am Tier(modell) entspricht.

Artikel 53 a nimmt Erfindungen vom Patentschutz aus, die gegen die öffentliche Ordnung oder die guten Sitten verstoßen würden, d. h. diese Rechtsvorschrift berücksichtigt ethische Aspekte in bezug auf Tierversuche. Das Europäische Patentamt (EPA) vertritt in seiner Rechtsprechung die Meinung, daß bei der Bewertung der Patentierbarkeit von durch den Menschen manipulierten Tieren eine Abwägung zwischen dem Nutzen für die Menschen und dem Leiden der Tiere vorzunehmen ist.

Artikel 53 b nimmt Pflanzensorten und Tierarten vom Patentschutz aus. Diese Rechtsbestimmung hat in letzter Zeit vielfach zu Diskussionen geführt. Die Rechtsprechung wartet diesbezüglich auf eine endgültige Entscheidung durch die Große Beschwerdekammer des EPA, wobei die Europäische Direktive zur Patentierung biotechnologischer Erfindungen eine Rolle spielen dürfte.

Eine dem Artikel 53 entsprechende Gesetzesbestimmung gibt es auch im Deutschen Patentgesetz. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß wenn Organe oder Teile von Tieren als Krankheitsmodelle (Ex-vivo-Modell) eingesetzt werden, diese nicht dem Artikel 53 EPÜ bzw. der entsprechenden deutschen Gesetzesbestimmung unterliegen.

Die folgende Übersicht zeigt, welche Patentanspruchskategorien für In-vivo- und Ex-vivo-Modelle möglich sind:

Patentierbarkeit betreffend Tiere und Tierorgane nach dem EPÜ.

	Tierarten*)	Höhere Gruppen von Tieren*)	Tierorgane
Produktansprüche	– (Art. 53 b EPÜ) Ausnahme bei nichtvererbbaren Merkmalen möglich	(±) in der Rechtsprechung noch nicht geklärt	+
Verfahrensansprüche	+ jedoch – wenn Behandlung im Sinne von Art. 52(4) EPÜ	+ jedoch – wenn Behandlung i.S.v. Art. 52(4) EPÜ	+
Verwendungsansprüche	+	+	+

*) Sofern kein Einwand nach Art. 53 a EPÜ.

Tierschutzrelevante Aspekte von Krankheitsmodellen

Rolf Beckmann

Schering AG, Allgemeine Pharmakologie, Berlin
Vorsitzender der Tierschutzkommission der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Die tierexperimentelle Forschung ist gehalten, die Belastung der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Dies gilt besonders für erkrankte Tiere und alle Krankheitsmodelle, in denen gesunde Tiere durch Eingriffe krank gemacht werden. Dies gilt auch, wenn sie durch genetische Manipulationen krank gemacht werden. Bei jedem Tierversuch an Wirbeltieren muß abgewogen werden, ob die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind (§ 7 (3) TSchGes).

Eine Abschätzung der Belastung der Tiere im Krankheitsmodell wird sich an klinischen Erfahrungen orientieren (Wie sehr leiden die Patienten?), sollte aber letztendlich auf dem Vergleich zwischen krankem und gesundem Tier beruhen. Die Belastung des Versuchstieres ist sehr davon abhängig, ob ein akutes oder ein (sub)chronisches Geschehen untersucht wird. Die ethische Vertretbarkeit wird entscheidend von der Schwere der Krankheit bestimmt.

Wird in einem Tierversuch in Narkose akut ein Krankheitszustand erzeugt, z. B. in Infarktmodellen, in denen Blutgefäße eingeengt oder verschlossen werden, stellt dies keine zusätzliche Belastung dar, wenn die Tiere nicht mehr aus der Narkose erwachen. Schließt der Versuch einen Beobachtungszeitraum ein, in dem der Verlauf der Krankheit und der Erfolg therapeutischer Maßnahmen beurteilt wird, sind nach dem Erwachen aus der Narkose Belastungen aufgrund des Eingriffs und seiner Folgen tierschutzrelevant. Dies trifft auch auf chronische Modelle zu, in denen Erkrankungen/Krankheitsbilder z. B. durch Verabreichung von Substanzen, durch Injektion biologischen Materials, durch Diäten oder durch chirurgische oder gentechnische Eingriffe erzeugt werden.

Bei Krankheitsmodellen, in denen Tiere andauernden Belastungen ausgesetzt sind, besteht für den Versuchsverantwortlichen und alle Versuchsbeteiligten eine verstärkte Aufsichtspflicht. Eine tierschutzgerechte Versuchsdurchführung ist nur gesichert, wenn alle Beteiligten Belastungen beurteilen können. Aus Tierschutzaspekten ist deshalb die Etablierung von Maßnahmen und Protokollen zum Erkennen und Registrieren sowie zum Vermeiden von Schmerzen, Leiden und Schäden im Verlauf von Tierversuchen gefordert [1, 2].

Ganz besondere Aufmerksamkeit erfordern alle Modelle, in denen fortgeschrittene Stadien einer Krankheit untersucht werden. Wo – wie z. B. in der Onkologie – aus der Klinik bekannt ist, daß in der Mehrzahl der Fälle die Erkrankungen im fortgeschrittenen Stadium zu unerträglichen Leiden führen, die ärztliches Eingreifen notwendig machen, ist auch im Tierversuch davon auszugehen, daß tumortragende Tiere ausgeprägte anhaltende Schmerzen erleiden, die spezielle Pflege, Behandlung und intensive Überwachung erfordern.

Tierschutzrelevante Aspekte von Tumormodellen werden in der experimentellen Krebsforschung seit langem diskutiert, und schon 1988 wurden UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia veröffentlicht [3], in denen unter anderem gefordert wird:

- Bei Tumormodellen muß besonderer Wert auf die Erkennung und Behandlung von Schäden und die Festlegung humaner Endpunkte gelegt werden. Bei soliden Tumoren sollte eine maximale Größe definiert werden, die im Experiment nicht überschritten werden darf.
- Jedes tumortragende Tier sollte mindestens einmal täglich inspiziert werden, und es sollten zusätzliche eingehendere Untersuchungen durchgeführt werden, wenn sie erforderlich sind.
- Alle Versuchsbeteiligten müssen ihre individuellen Verantwortlichkeiten kennen, und eine eindeutige Konsultationskette sollte etabliert werden, so daß bei allen auftretenden Problemen unverzüglich Maßnahmen ergriffen werden können.

Alle Versuchsbeteiligten sollten eine angemessene Schulung (Training) und Anleitung und Überwachung erhalten.

Immer dann, wenn in einem Krankheitsmodell den Versuchstieren erhebliche Gesundheitsschäden mit möglicher Todesfolge zugefügt werden, sollte ein humaner Endpunkt definiert werden, bei dem die betroffenen Tiere schmerzlos zu töten sind. Wird dieser Zustand erst nach tage- oder wochenlanger Krankheitsdauer erreicht, muß durch regelmäßige klinische Untersuchungen (klinischer Untersuchungsplan/Belastungsprotokoll) sichergestellt werden, daß der Endzustand bei allen Tieren rechtzeitig erkannt wird [4].

Auch transgene Versuchstiere müssen während ihrer gesamten Lebenszeit sorgfältig beobachtet werden [5]. Die „kranken" Tiere sollten von kompetenten Personen überwacht werden, die mit dem normalen Aussehen und Verhalten der gesunden Tiere vertraut und in der Lage sind, Zeichen neurologischer Störungen oder Verhaltensänderungen zu erkennen, die Anzeichen für Leiden sein können.

Fazit: Krankheitsmodelle in der Arzneimittelforschung sind in vielen Fällen mit Schmerzen, Leiden und Schäden für die Versuchstiere verbunden. Ein angemessener Tierschutz ist bei diesen Modellen nur dann möglich, wenn alle Versuchsbeteiligten kompetent sind. Sie sollten eine angemessene Schulung (Training) erhalten. Nur ein detaillierter Versuchsplan (Versuchs- und Pflege-/Belastungsprotokolle), dessen Einhaltung überwacht wird, und gut ausgebildete, vollständig informierte / exakt angewiesene Versuchsbeteiligte können ein Maximum an Tierschutz gewährleisten.

Literatur

[1] Gärtner, K., Militzer, K., Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren. Verlag Paul Parey, Berlin – Hamburg (1993)

[2] Morton, D. B., Griffiths, P. H. M., Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. Veterinary Record **116**, 431 (1985)

[3] UKCCCR Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. Lab. Anim. **22**, 195 (1988); Cancer Metastasis Rev. **8**, 82 (1989)

[4] Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere. Der Tierschutzbeauftrage 1/97, 15 (1997)

[5] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML): Die Erzeugung und Zucht transgener Mäuse und Ratten unter Tierschutzgesichtspunkten. Der Tierschutzbeauftragte 3/96, 241 (1996); Tierschutzbericht der Bundesregierung 1997, 107 (1997)

Modelle für „krankhaften" Arzneimittelstoffwechsel

Michel Eichelbaum

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart

Für nahezu alle Enzyme, die an der Biotransformation von Arzneimitteln und Xenobiotika beteiligt sind, wurden während der vergangenen Jahre genetische Polymorphismen oder seltene Defekte beschrieben. Diese Defektmutationen, die man als humanes Äquivalent zur Knock out-Maus ansehen kann, bieten die Gelegenheit, die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen dieser Enzyme zu untersuchen.

Im Falle der Cytochrom P450-Enzyme verursachen Mutationen der steroidogenen P450-Enzyme stets gravierende Erkrankungen. Anders stellt sich die Situation der für den menschlichen Arzneimittelstoffwechsel relevanten Cytochrom P450-Enzyme 1A1/2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4–5/7 dar. Hier beobachtet man für eine Reihe von Enzymen Mutationen, die zum völligen Funktionsverlust führen oder mit einer erheblichen Einschränkung der katalytischen Aktivität einhergehen. Die Tatsache, daß diese Defekte bis heute in der Bevölkerung nachzuweisen sind, ist dahingehend zu interpretieren, daß sie offensichtlich im Hinblick auf die Reproduktion oder das Überleben keinen gravierenden Nachteil darstellen. Analog anderen Polymorphismen beobachtet man hinsichtlich der Allelfrequenz deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Rassen. Diese Daten kann man dahingehend interpretieren, daß zu einem früheren Zeitpunkt in der Evolution das Vorhandensein dieser Mutationen einen selektiven Nachteil in bestimmten Populationen dargestellt haben könnte.

Krankheitswert haben diese Polymorphismen erst, wenn der Merkmalsträger Arzneimitteln gegenüber exponiert wird. Erfolgt der Abbau eines Arzneimittels im wesentlichen über ein polymorphes Enzym, so ist mit einer großen Variabilität im Hinblick auf Wirkung und Nebenwirkung zu rechnen.

Da auch viele kanzerogene Substanzen und Umweltgifte durch die arzneimittelabbauenden Enzyme metabolisiert werden, können bestimmte Genotypen Prädispositionsfaktoren für chemisch induzierte Karzinome darstellen. Die Tatsache, daß für CYP3A4, dem wohl wichtigsten Cytochrom P450, keine Mutationen beschrieben worden sind, die mit einem völligen Funktionsverlust oder deutlich eingeschränkter metabolischer Kapazität einhergehen, deutet darauf hin, daß ein Funktionsverlust dieses Enzymes mit dem Überleben nicht vereinbar ist.

Lassen sich Krankheitsmodelle durch In-vitro-Verfahren ersetzen?

Thomas Eschenhagen

Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Pharmakologisches Institut, Hamburg

Der vorliegende Beitrag möchte den Stellenwert von In-vitro-Verfahren im Vergleich zu Krankheitsmodellen am Beispiel der Herzinsuffizienz kritisch beleuchten.

Ein wesentlicher Grund für die in den letzten Jahren relativ erfolgreiche Entwicklung von Arzneistoffen zur Behandlung der Herzinsuffizienz liegt in der Verfügbarkeit von Ganztier-Krankheitsmodellen, die fast das gesamte Spektrum der beim Menschen vorkommenden Formen und Ursachen der Herzinsuffizienz abdecken. Natürlich vorkommende, idiopathische Kardiomyopathien verschiedener Tierspezies (z. B. Hamster, Truthahn, Rind) lassen sich abgrenzen von einer Vielzahl von experimentell induzierten Formen der Herzinsuffizienz, beispielsweise auf der Basis von Herzinfarkten, chronischer Druck- und Volumenüberlastung, Tachykardie oder Noxen. In zunehmendem Maß kommen Tiermodelle hinzu, bei denen durch genetische Manipulation (Überexpression oder Ausschaltung einzelner Gene) kardiovaskuläre Erkrankungen induziert werden.

Den Krankheitsmodellen stehen in der Herz-Kreislaufforschung verschiedene In-vitro-Verfahren gegenüber, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Auf der einen Seite stehen Versuche an explantierten, in ihrem Gewebeverband erhaltenen Herz- oder Gefäßmuskelpräparaten verschiedener Versuchstiere. Zu dieser Gruppe gehören das klassische retrograd perfundierte Langendorff-Herz, isolierte Vorhof-, Ventrikel-, Sinusknoten und Purkinjefaserpräparationen und gehäutete Herzmuskelfasern ebenso wie perfundierte Gefäße bzw. Gefäßringe. Auf der anderen Seite werden zunehmend Versuche an isolierten Einzelzellen vorgenommen. An diesen können unmittelbar nach Zellisolation Ionenströme, Zellverkürzungen oder intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen gemessen werden. Oder die Zellen werden wie im Fall von embryonalen und neonatalen Herzmuskelzellen für längere Zeit in Kultur genommen. Methodisch zwischen intakten Gewebepräparaten und Zellkultur steht ein kürzlich von uns entwickeltes System, bei dem embryonale Herzmuskelzellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix in vitro zu einem funktionellen Herzmuskelgewebe rekonstituiert werden. Seit dem Aufschwung von Herztransplantationen können Versuche heute auch an isolierten Herzmuskelpräparaten (z. B. Trabekel) sowie isolierten Einzelzellen von explantierten menschlichen Herzen vorgenommen werden.

Sind die verschiedenen In-vitro-Verfahren geeignet, Ganztier-Krankheitsmodelle zu ersetzen? Dazu muß man sich fragen, was letztere überhaupt leisten sollen. Krankheitsmodelle des ganzen Tieres sollen Aussagen zur Wirksamkeit eines (neuen) Arzneistoffs erlauben. Wirksamkeit ist definiert als Besserung, Linderung oder Heilung eines Krankheitszustands und damit abzugrenzen von Wirkung, d. h. eine Veränderung, die in einem biologischen System durch einen Reiz hervorgerufen wird. Wirksamkeit setzt Wirkung voraus. Andererseits können Arzneistoffe experimentell nachweisbare Wirkungen entfalten, ohne bei einer Krankheit wirksam zu sein (Beispiel Antiarrhythmika). Umgekehrt kann ein Stoff an bestimmten Präparaten keine oder eine unerwünschte Wirkung entfalten, tatsächlich aber klinisch wirksam sein. Beispielsweise wirken β-Blocker an isolierten Herzpräparaten negativ inotrop, tragen aber langfristig zur Lebensverlängerung von Patienten mit Herzinsuffizienz bei. Die Wirksamkeit bei Herzinsuffizienz ist hier, ebenso wie bei allen anderen erfolgreichen Herz-Kreislauf-Pharmaka, Folge eines Eingriffs in komplexe und chronische neurohumorale Anpassungsmechanismen. Dies läßt sich nur in Krankheitsmodellen (z. B. Herzinfarktmodell der Ratte) untersuchen und wäre durch In-vitro-Verfahren an isolierten Systemen niemals aufgezeigt worden.

Je besser die Ursache einer klinischen Wirksamkeit bekannt ist, desto leichter und treffsicherer lassen sich präklinische Ergebnisse auf den Patienten übertragen. Seitdem beispielsweise das Prinzip der Blockade von Angiotensin-Rezeptoren bei der Hypertonie als wirksam erkannt worden ist, können „me-too-Präparate" relativ leicht in vitro an Zellinien, die den betreffenden klonierten Rezeptor in großer Dichte exprimieren, auf günstige pharmakologische Eigenschaften untersucht werden. Hier ist die Reduktion der Komplexität wünschenswert, weil die experimentelle Situation stabil und überschaubar ist und Effekte um ein Vielfaches größer sind als in natürlichen Systemen. Fragen wie die Potenz und die Effektivität oder gewisse kinetische Eigenschaften lassen sich schon an diesem Punkt gut vorhersagen.

Schwieriger als die Optimierung von bereits erprobten Arzneimitteln ist aber die Identifizierung eines geeigneten Wirkprinzips, was in der Regel das Verständnis der Physiologie und Molekularbiologie sowie der Ursachen und pathophysiologischen Zusammenhängen der zu behandelnden Erkrankung voraussetzt. Es ist unbestritten, daß hier die Grundlagenforschung mit ihren verschiedensten In-vitro-Verfahren dominiert. Als Beispiele seien die pharmakologische Analyse von Rezeptorsubtypen, die Klonierung von Genfamilien, die Reindarstellung von Proteinen, ihre Strukturaufklärung und heterologe Expression in zellulären Systemen genannt. Diese Arbeiten sind unverzichtbar, um neue Targets für die Arzneistoffentwicklung zu identifizieren, an denen synthetische oder natürlich vorkommende Stoffe auf die Wirkung überprüft werden können. Der Weg von der Wirkung zur Wirksamkeit geht dann jedoch erneut über Krankheitsmodelle.

Welcher Stellenwert kommt also den In-vitro-Verfahren in der Arzneistoffentwicklung zu?

1. Das erkrankte menschliche Myokard ebenso wie der einzelne Myozyt verhalten sich anders als gesundes Myokard des Menschen oder verschiedener Versuchstiere. Beispielsweise wirken Phosphodi-

esterase-Hemmstoffe zwar am gesunden menschlichen Myokard positiv inotrop, an isolierten Herzmuskelpräparaten von explantierten insuffizienten menschlichen Herzen jedoch nicht oder deutlich verringert. Dies liegt an spezifischen molekularen Veränderungen im erkrankten Myokard und kann nur an diesem untersucht werden.

2. Arzneistoffe wirken an Herzen verschiedener Spezies anders als beim Menschen. So ist der positiv inotrope Effekt von α_1-Adrenorezeptoragonisten am Rattenherzen stark, am menschlichen Ventrikel jedoch gering und am insuffizienten Myokard noch geringer. Daher sollten (neue) Arzneistoffe zur Therapie der Herzinsuffizienz grundsätzlich auch an explantierten menschlichen Herzmuskelpräparaten getestet werden.
3. Der Vielzahl von molekularbiologisch identifizierten Genen steht eine nur kleine Zahl von Genen gegenüber, deren Funktion bisher tatsächlich verstanden ist. Die grundsätzliche Funktionsweise sowie die Interaktion mit anderen Proteinen in der Zelle kann in stark reduzierten Zellsystemen (z. B. E. coli, Hefe oder SF9-Zellen) untersucht werden. Es gibt aber bislang wenig Informationen darüber, wie die betreffenden Proteine im physiologischen Kontext der Herzmuskelzelle funktionieren bzw. welche Bedeutung quantitativen oder qualitativen Veränderungen bei Herzinsuffizienz zukommt. Dies wird heute zunehmend mit transgenen Tiermodellen überprüft, in denen ein Gen unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors im Versuchstier an- oder abgeschaltet wird und die Aussagen zur Gendosis-Wirkungs-Beziehung erlauben. Nachteilig sind der experimentelle Aufwand und die Schwierigkeiten, die Promotoraktivität in vivo zu kontrollieren. Hier liegt die Bedeutung von Zellkulturmodellen, in denen Herzmuskelzellen erheblich einfacher und überschaubarer als im ganzen Tier pharmakologisch, mechanisch oder genetisch manipuliert werden können. Zellkulturmodelle haben beispielsweise wesentlich zur Identifikation von Hypertrophieprozessen beigetragen, die an dem wahrscheinlich prognostisch ungünstigen „remodeling" beteiligt sind. So wurde die Entwicklung von Angiotensin- und Endothelin-Angiotensin durch Versuche stimuliert, in denen diese Peptidhormone in Zellkulturmodellen wachstumsfördernd wirkten. Am ganzen Tier hätten vaskuläre Effekte die direkten Effekte aufs Herz überlagert.

Zusammenfassend können In-vitro-Verfahren Krankheitsmodelle in der Arzneistoffentwicklung sicher nicht vollständig ersetzen, da Wirksamkeit grundsätzlich nur beim Menschen bzw. wenn überhaupt am erkrankten Tier untersucht werden kann. In-vitro-Untersuchungen an frisch gewonnenen menschlichen Präparaten sind aber unverzichtbar, um unter kontrollierten Bedingungen krankheits- und speziesspezifische Funktionsunterschiede zu identifizieren und bei der Arzneistoffentwicklung zu berücksichtigen. Zellkulturmodelle sind unverzichtbar, um grundlegende Wirkungsmechanismen verstehen und direkte Wirkungen von Arzneistoffen auf die betreffende Zelle von indirekten Effekten unterscheiden zu können. Sie spielen auch eine wichtige Rolle, um relativ leicht erste Informationen zur Funktion von (neuen) Genprodukten im physiologischen Kontext zu gewinnen, die dann im ganzen Tier und schließlich am Menschen überprüft werden können. Die verschiedenen experimentellen Verfahren stehen also nicht als Alternative nebeneinander, sondern in einer hierarchischen Ordnung.

Anschriften der Referenten

Dr. Frieder Bauss
Boehringer Mannheim GmbH
Präklinische Forschung und Entwicklung
– Knochenstoffwechsel –
Sandhofer Str. 116, D-68298 Mannheim

Dr. Rolf Beckmann
Schering AG
Allgemeine Pharmakologie
D-13342 Berlin

Dr. Adrian J. Carter
Boehringer Ingelheim Pharma KG
Abteilung Biologische Forschung
Neuropharmakologie
D-55216 Ingelheim

Prof. Dr. Michel Eichelbaum
Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut
für Klinische Pharmakologie
Auerbachstr. 112, D-70376 Stuttgart

Priv.-Doz. Dr. Thomas Eschenhagen
Universitäts-Krankenhaus Eppendorf
Pharmakologisches Institut
Martinistr. 52, D-20246 Hamburg

Dr. Daniel Guerrier
Groupe Lipha Lyon
Lipha – Research and Development Centre
115 Avenue Lacassagne, F-69003 Lyon

Dr. Volkmar Günzler
Hoechst Marion Roussel
Pharma-Forschung
D-65926 Frankfurt/Main

Dr. Dietrich Häfner
Byk Gulden Lomberg
Chemische Fabrik GmbH
Byk-Gulden-Str. 2, D-78467 Konstanz

Dr. Guido Hanauer
Byk Gulden Lomberg
Chemische Fabrik GmbH
Byk-Gulden-Str. 2, D-78467 Konstanz

Prof. Dr. Dr. Lieselotte Herberg
Diabetes-Forschungsinstitut
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Auf'm Hennekamp 65, D-40225 Düsseldorf

Dr. Stefan Hergenröder
BASF Pharma
D-67008 Ludwigshafen

Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Joost
Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der RWTH Aachen
Wendlingweg 2, D-52057 Aachen

Priv.-Doz. Dr. Hans Wilhelm Kaiser
Universitäts-Hautklinik Bonn
Bonner Forum Biomedizin
Sigmund-Freud-Str. 25, D-53127 Bonn

Dr. Helga Kolb
Hoffmann · Eitle
Patent- und Rechtsanwälte
Arabellastr. 4, D-81925 München

Dr. Hans F. Kühnle
Boehringer Mannheim GmbH
Pharma-Forschung
Sandhofer Str. 116, D-68298 Mannheim

Dr. Jürgen Lindner
Hoechst Marion Roussel
Pharma-Forschung – DG Rheumatologie
D-65174 Wiesbaden

Dr. Thomas Magin
Universität Bonn
Institut für Genetik
Bonner Forum Biomedizin
Römerstr. 164, D-53117 Bonn

Prof. Dr. Martin Paul
Institut für Klinische Pharmakologie und
Toxikologie, Klinikum Benjamin Franklin
Freie Universität Berlin
Garystr. 5, D-14195 Berlin

Priv.-Doz. Dr. Axel Schmidt
Bayer AG
Pharma-Forschungszentrum
PH-R AI 1, Geb. 405
Aprather Weg, D-42096 Wuppertal

Dr. Laszlo Szabo
Knoll AG
Abteilung Neuropharmakologie
D-67008 Ludwigshafen

Dr. Christine Tober
Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Pharmakologische Forschung
Meißener Str. 35, D-01445 Radebeul

Priv.-Doz. Dr. Norbert Wagner
Universitätskinderklinik Bonn
Adenauerallee 119, D-53113 Bonn