

Angiogenese und Antiangiogenese: vom Wirkstoffscreening zur Therapie

Johanna Plendl, Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin

Angiogenese ist die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen. Die physiologische Angiogenese spielt vor allem pränatal beim Wachstum des Embryos und Fetus eine Rolle. Postnatal gibt es physiologischerweise nur in einigen wenigen Fällen eine Neubildung von Blutgefäßen, nämlich bei der Entwicklung des Gelbkörpers im Ovar, der Entwicklung der Milchdrüse, beim Muskelwachstum (bodybuilding) und Fettaufbau. Pathophysiologische Angiogenese dagegen kommt sehr viel häufiger vor, nämlich bei allen Vorgängen, die im Rahmen der Regeneration und Wundheilung ablaufen. Die physiologische und die pathophysiologische Angiogenese sind gekennzeichnet von einer zeitlich strengen Limitierung, d.h. ihre Aktivierung und ihre Beendigung ist kontrolliert. Wenn dies nicht der Fall ist, dann haben wir es mit pathologischen Formen der Angiogenese zu tun. Diese unkontrollierte Angiogenese ist bei zahlreichen Krankheiten wie beispielweise bei verschiedenen Erkrankungen am Auge, bei der Rheumatoiden Arthritis und insbesondere beim Wachstum und der Metastasierung solider Tumoren zu beobachten. Erst durch die neuen Gefäße erhält der Tumor Sauerstoff und Nährstoffe, er kann über eine bestimmte Größe wachsen und metastasieren. Angiogenese zu stimulieren, bedeutet, den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in ein Organ oder Gewebe zu steuern und damit die Ausbildung von Kapillaren in einem ischämischen Gebiet anzuregen und dieses dadurch neu zu vaskularisieren. Umgekehrt könnte die Inhibierung der Angiogenese, die sogenannte Anti-Angiogenese, abnormes Wachstum durch Ausschalten der Blutzufuhr beenden. In jüngster Zeit wurden zahlreiche Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese unterschiedlichster Stoffklassen identifiziert und isoliert. Die Wirkungsmechanismen dieser Substanzen sind sehr vielschichtig und ihre Untersuchung befindet sich meist noch in frühen experimentellen Stadien, nur sehr wenige befinden sich in den Phasen I bis III der klinischen Prüfung. Der klinische Einsatz dieser Stoffe würde neue Möglichkeiten der Therapie von Krankheiten eröffnen, bei denen die Angiogenese eine Rolle spielt. Insbesondere wird große Hoffnung gesetzt in die Ausschaltung der Blutversorgung von Tumoren ("Aushungern") durch antiangiogene Substanzen sowie die Induktion von neuen Blutgefäßen in ischämischen Gebieten durch proangiogene Faktoren.

Im Bereich der Angiogeneseforschung werden zahlreiche Tierversuche durchgeführt, von denen einige sehr umstritten sind. Ganz allgemein werden in den Versuchen lösliche Angiogenesefaktoren injiziert bzw. auf Trägermaterialien in bestimmte Organe und Gewebe eingebracht, um ihre Wirkung zu bestimmen. Auch werden Tumoren implantiert, um ihre angiogene Potenz, d.h. die Produktion von Angiogenesefaktoren durch die Tumorzellen, zu untersuchen. Einer der häufigsten Tests besteht im mikrochirurgischen Einbringen von angiogenen Substanzen oder Tumorzellen in die Cornea des Auges von Kaninchen, Ratten und Mäusen. Das Einsprossen von Blutgefäßen in die Cornea wird dann untersucht. Diese Tests gelten als besonders aussagekräftig, da hier das Einwachsen neuer Blutgefäße in die physiologischerweise gefäßfreie (jedoch - und deshalb sind diese Versuche so umstritten - intensiv sensibel innervierte) Cornea untersucht werden kann. In den Versuchen zur Antiangiogenese wird durch die Applikation antiangiogener Substanzen Gefäßwachstum inhibiert oder rückgängig gemacht. Es ist zu erwarten, daß auf diesem sehr vielversprechenden Gebiet der medizinischen Forschung in nächster Zukunft besonders viele Tierversuche unternommen werden und Angiogenese-

bzw. Antiangiogenesefaktoren vermehrt in die Prüfung im Rahmen behördlicher Zulassungsverfahren einbezogen werden.

Nach dem Tierschutzgesetz sind wir Tierärzte die berufenen Schützer der Tiere. Es besteht somit für uns die Aufgabe von höchster Priorität, Ersatzmethoden zu diesen zwingend vorgeschriebenen Tierversuchen zu entwickeln. Für die Untersuchung der Wirkung potentieller Angiogenese-Stimulatoren oder -Inhibitoren werden also neue in vitro-Systeme benötigt. In der Literatur werden zwar oft Endothelzellkulturen mit "in vitro-Angiogenese" vorgestellt, problematisch ist jedoch, daß keine allgemein gültige Definition für "in vitro-Angiogenese" existiert und jede Bewegung und Umgruppierung von Endothelzellen so bezeichnet wird. Meine Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit der in vitro-Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen verschiedener Spezies, mehrerer Organe und Entwicklungsstadien. Es wurden Endothelzellen kultiviert, welche Angiogenese in einem bisher noch nicht beschriebenen Ausmaß zeigen. Werden die von uns aus dem Corpus luteum von Schlachtrindern isolierten, mikrovaskulären Endothelzellen in eine Kulturschale gesät und mit einem Gemisch von proangiogenen Faktoren für wenige Tage inkubiert, beginnen sie, gefäßähnliche Strukturen aufzubauen. Die Zellen migrieren und proliferieren, sie richten sich dreidimensional aus und bilden echte Zellverbindungen im Sinne von gap und tight junctions. Dadurch entsteht ein komplexes, weitverzweigtes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen und die plastisch wirkenden, gefäßähnlichen Strukturen sind teilweise schon mit bloßem Auge in der Kulturschale erkennbar.

Wenn dieses Modell jemals Tierversuche ersetzen soll, dann muss es möglich sein, damit eine objektive und vergleichbare Aussage über eine pro- oder antiangiogene Wirkung bestimmter Substanzen zu treffen, d.h. es muss eine reproduzierbare Quantifizierung der in vitro-Angiogenese möglich sein und zwar im Routinebetrieb verschiedener Laboratorien unter einem geringen Zeit- und Kostenaufwand. Das von uns etablierte in vitro Modell der Angiogenese kann für professionelle Routineuntersuchungen benutzt werden. Es können alle Stadien der angiogenen Kaskade quantifiziert werden und damit auch die Wirkung löslicher Faktoren, die frühe oder späte Ereignisse der Angiogenese kontrollieren, untersucht werden. Zweitens konnte mit dem gewählten Stichprobenumfang gezeigt werden, daß diese Methode reproduzierbar ist, weil die Angiogenese in allen untersuchten Zellkulturen auf die gleiche Art und Weise erfolgte. Drittens zeigte der Vergleich von Messungen verschiedener Untersucher statistisch vertretbare Ergebnisse. Daher kann diese Methode von verschiedenen Laboratorien durchgeführt werden. Viertens ist diese Methode mit einem geringem Zeit- und Kostenaufwand verbunden, da die Untersuchungen nur 2 x wöchentlich erfolgen und die Ausrüstung erschwinglich ist.

Effiziente Therapiemöglichkeiten zur Verfügung zu stellen, ist letztlich ein wichtiges Ziel der medizinischen Forschung. Dabei sollte es aber möglich sein, Tierversuchsmodelle gegen standardisierte andere Methoden auszutauschen. Dem voraus geht allerdings eine intensive Entwicklungsarbeit von neuen Methoden. Anschließend müssen sogenannte internationale, multizentrische Validierungsstudien durchgeführt werden und erst dann kann die Anerkennung durch die entsprechenden Regierungsbehörden erfolgen. Der Weg vom Wirkstoffscreening zur Therapie ist lang. Um Tierversuche dauerhaft ersetzen zu können, ist eine verstärkte Kooperation von Forschungseinrichtungen, Kliniken, Industrie und Behörden unerlässlich.