



Menschen für Tierrechte • Roermonder Straße 4a • 52072 Aachen

Menschen für Tierrechte
Bundesverband der Tierversuchsgegner e.V.

Versuchstier des Jahres 2012: Die "Atherosklerose-Maus"



Bild: Filo, iStockphoto

Geschäftsstelle Menschen für Tierrechte – Bundesverband der Tierversuchsgegner e.V.:

Roermonder Straße 4a
52072 Aachen
Internet: www.tierrechte.de

Fon 0241-157214
Fax 0241-155642
eMail: info@tierrechte.de

Postbank Köln
BLZ 370 100 50
KTO 100 505

Als gemeinnützig und
besonders förderungs-
würdig anerkannt

Mitglied bei ›European Coalition To End Animal Experiments‹,
›European Coalition for Farm Animals‹, ›The European
Network to END the keeping of Wild Animals in CAPtivity‹

Einleitung

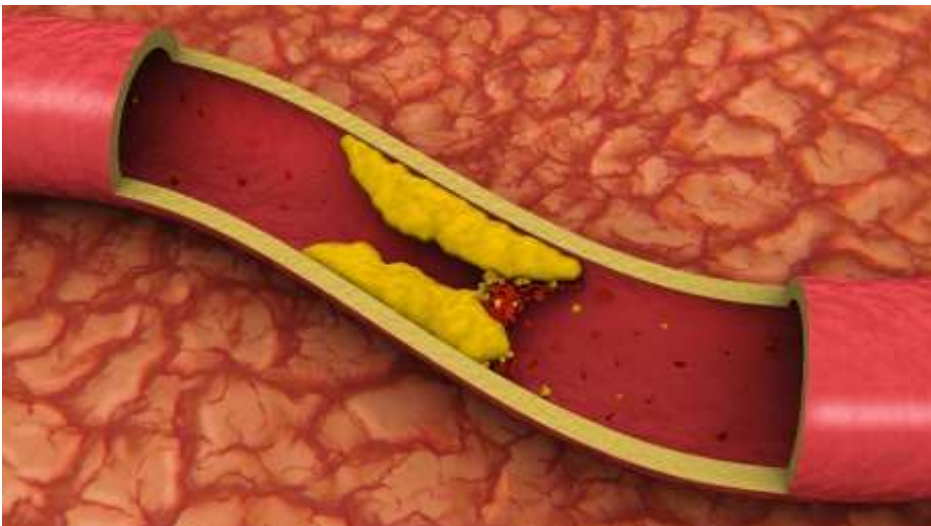
Seit 2003 ernennt der Bundesverband Menschen für Tierrechte in Zusammenarbeit mit seinen Mitgliedsvereinen das „Versuchstier des Jahres“. Damit sollen Tierversuche, die an einer bestimmten Tierart durchgeführt werden, öffentlich gemacht werden. Wir zeigen auf, welche Leiden den Tieren im Labor zugefügt werden, wie ihr Leben in Freiheit aussehen würde und welche Möglichkeiten zur Forschung ohne den Einsatz von Tieren bestehen.

Für das Jahr 2012 hat die Jury des Bundesverbandes Menschen für Tierrechte die „Atherosklerose-Maus“ ausgewählt. Der Mitgliedsverein „Tierschutz Halle e. V.“ hatte diesen Vorschlag eingereicht. Mit der Atherosklerose-Maus wird zum ersten Mal ein gentechnisch verändertes Tier ausgewählt. Dafür gibt es gute Gründe.

Erstens ist die Maus das am häufigsten verwendete Versuchstier. Zweitens beruht der jährliche Anstieg der Tierversuchszahlen um gut 100.000 Tiere ganz entscheidend auf der Verwendung gentechnisch manipulierter Mäuse. Drittens zählt die Atherosklerose weltweit zu den häufigsten Todesursachen des Menschen.

Exkurs Atherosklerose

Die Atherosklerose (auch Arteriosklerose) wird im Volksmund als Arterienverkalkung bezeichnet. Tatsächlich zeichnet sie sich durch krankhaft verdickte Blutgefäßwände aus, die durch Ablagerung von Blutfetten, Bindegewebe und z. T. Kalk (1) zur sogenannten Plaquebildung führen. In den so veränderten Arterien fließt das Blut zunächst langsamer, ohne weitere Symptome hervorzurufen.



Ablagerungen (hier gelb) von Blutfetten, Bindegewebe, Immunzellen und Zellresten verstopfen nach und nach das Blutgefäß und bilden einen Blutpfropf. Das Gewebe wird nicht mehr mit Sauerstoff versorgt. Foto: James Benet, iStockphoto.

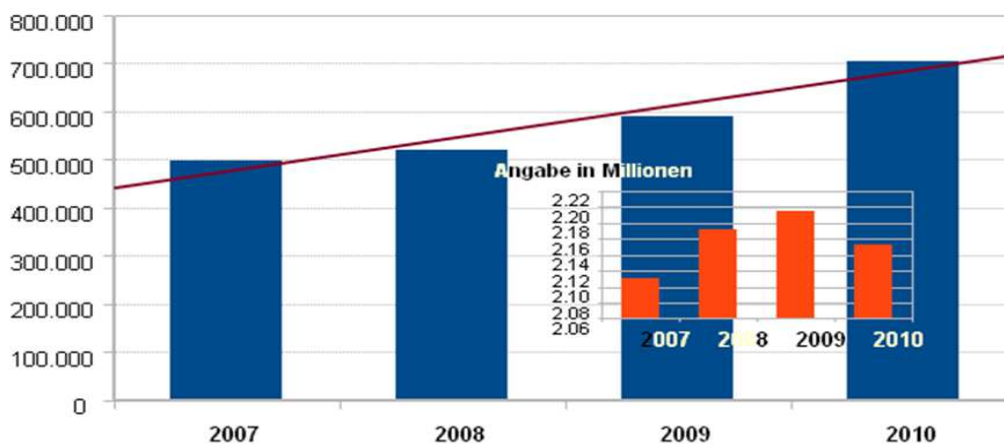
Oft kommt es erst nach Jahren zum Blutstau und anschließender Blutpfropfbildung. Als Folge tritt ein partieller oder totaler Verschluss des Blutgefäßes ein (Thrombose). Das Gewebe wird nun nicht mehr mit Sauerstoff versorgt und stirbt ab (Infarkt). Thrombosen und Infarkte verursachen die meisten Todesfälle in den Industrieländern – etwa in Form von Herzinfarkten oder Schlaganfällen (2, 3).

Die Ursachen der Atherosklerose sind noch immer unklar. Es werden zwei Theorien verfolgt:

- Die Verdickung der Gefäßwand entsteht ursächlich durch eine Verletzung, die mechanisch, z. B. durch Bluthochdruck, durch Viren oder Bakterien ausgelöst sein könnte. An der verletzten Gefäßwand bilden sich Ablagerungen und Wucherungen.
- Eine zweite Theorie sieht die Ursache in Fettablagerungen in den Blutgefäßwänden (vorwiegend Cholesterin). Das Lipoprotein LDL transportiert Cholesterin in alle Bereiche des Körpers, sein Gegenspieler HDL übernimmt die "Säuberung" durch Rücktransport in die Leber. Daher wird HDL-Cholesterin häufig als "gut" und LDL-Cholesterin als "schlecht" bezeichnet. Cholesterin wird zu 90% vom Menschen selbst hergestellt, der kleinere Teil wird über den Konsum tierischer Lebensmittel aufgenommen. Eine Senkung der Blutfettwerte wird durch eine vegetarische Ernährung mit hohem Obst- und Gemüseanteil unterstützt (4, 5, 6).

Der Einsatz von gentechnisch veränderten Mäusen in Tierversuchen

Die Gesamtzahl der in Versuchen verwendeten Tiere stieg zwischen 2007 und 2010 um 9,5% an. Die Zahl der in Tierversuchen verwendeten gentechnisch veränderten Mäuse wuchs im gleichen Zeitraum um gut 40% von 500.000 auf 704.000 Tiere. Nach dem Tierschutzgesetz (§ 7 Abs. 1) ist die Herstellung einer gentechnisch veränderten Mauslinie bis zur dritten Generation ein genehmigungspflichtiger Tierversuch.



Anstieg der transgenen Mäuse im Zeitraum 2007 bis 2010. Kleine Grafik: Entwicklung ohne gentechnisch veränderte Mäuse. Quelle: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).

Von der Statistik werden nur die Tiere mit einer geglückten Genmanipulation erfasst. Wie viele Mäuse bei dem Versuch der gentechnischen Veränderung starben, missgebildet geboren oder bereits als Embryonen abortiert wurden, geht aus der Statistik nicht hervor. Ebenso wenig wie die Zahl der Tiere, die keine Veränderungen des Erbgutes aufweisen. Auch die Elterntiere, deren Eizellen entnommen oder gentechnisch veränderte Embryonen eingepflanzt werden und bei denen z. B. ein Kaiserschnitt erfolgte, um die Nachkommen zu entbinden, sind in der Statistik nicht sicher enthalten. Die Zahlen geben daher keine Auskunft über den wirklichen Tierverbrauch zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Mauslinie.

2010 wurden 185.000 gentechnisch veränderte Mäuse zur Erforschung von Krankheiten benutzt. Die Zahl beinhaltet auch die gentechnisch manipulierten Mäuse, die 2010 zur Erforschung der Atherosklerose verwendet wurden. Da die Bundesversuchstierstatistik immer erst zum Herbst des Folgejahres veröffentlicht wird, liegen die Zahlen für das Jahr 2011 erst im November 2012 vor.

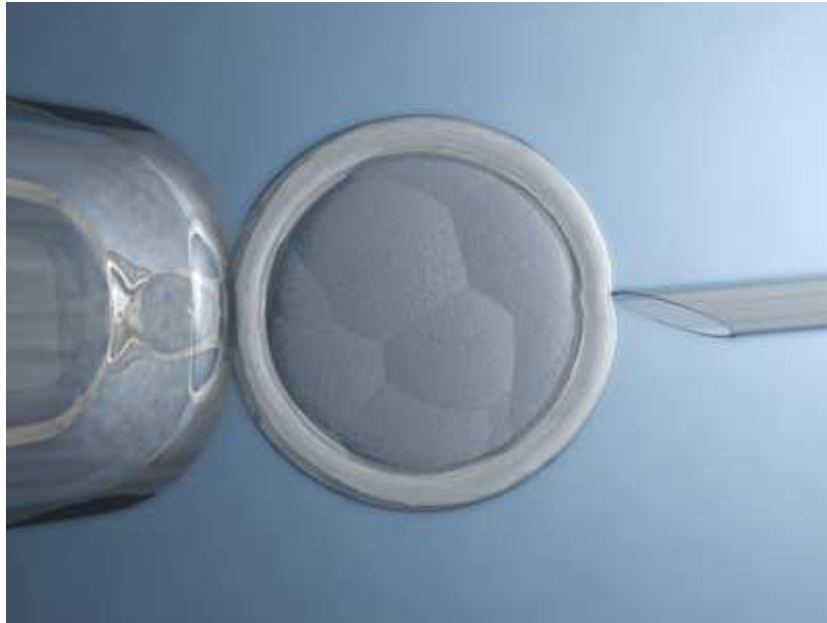
Grundprinzip der Gentechnik

Jedes Lebewesen besteht aus Zellen mit unterschiedlichen Funktionen. Alle Zellen eines Organismus enthalten jeweils die gleichen Erbinformationen in ihrem Zellkern, die von den Eltern geerbt wurden. Die unterschiedliche Entwicklung etwa zur Haarwurzelzelle oder Leberzelle kommt durch das gesteuerte Ablesen bestimmter Gene zustande, der nicht benötigte Teil der Gene ist inaktiv. Mit Hilfe der vier Aminosäuren A, C, G und T, dem „Rückgrat“ der DNA (Desoxiribonukleinsäure), sind auf einem Gen alle wichtigen Informationen geschrieben: Zum Beispiel wie ein bestimmtes Protein hergestellt werden muss, um zu funktionieren. Auch in der Natur kommt es zu Veränderungen der Erbinformationen, im Laufe der Evolution entstand dadurch die Vielfalt an Leben auf unserem Planeten. Der Mensch greift nun selbst in diesen Prozess ein. Durch das Hinzufügen von Genen oder deren "Löschung" erhält die Zelle neue Informationen. Tiere, deren Erbinformationen derartig künstlich verändert werden, werden transgene oder gentechnisch-veränderte (gv) Organismen genannt.

Herstellung gentechnisch veränderter Mäuse

Knock-in Mäuse

Bei der weiblichen Maus werden Hormone in die Bauchhöhle gespritzt, um möglichst vielen Eizellen zur Ovulation zu bringen. Einen Tag nach der Verpaarung mit einem Männchen wird das Weibchen getötet, denn nur die befruchteten Eizellen (= Embryonen) sind für das weitere Verfahren interessant. Den entnommenen, noch einzelligen Embryonen wird die gewünschte Erbinformation (DNA) durch feinste Nadeln eingebracht. Zwischenzeitlich wird ein zweites Weibchen mit einem durch Sterilisation zeugungsunfähigen Männchen verpaart, um so eine Scheinschwangerschaft zu erzeugen. Dieser scheinchwangeren Maus werden unter Narkose zwischen 20 bis 30 der gentechnisch manipulierten Embryonen in die Eileiter eingepflanzt. Als Ammenmutter trägt sie nun die Mäuseembryonen aus.



Mikroinjektion genetischen Materials in eine Zelle.

Foto: sss78, Fotolia.

Frühestens drei Tage nach der Geburt wird bei den Mäusejungen festgestellt, ob die gentechnische Manipulation geklappt hat. Hierzu wird Gewebe entnommen, am häufigsten werden 2 bis 3 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. An dieser Gewebeprobe wird festgestellt, welche der Nachkommen die gewünschte DNA besitzen und transgen sind. Ob diese transgenen Mäuse auch tatsächlich das gewünschte Protein produzieren wird aber erst an ihren Nachkommen, also der zweiten Generation, ermittelt. Hierzu werden die Mäuse der zweiten Generation getötet, weil ihre Organe zum Nachweis des gewünschten Proteins benötigt werden. Würde man die Elterntiere töten, könnten diese keine weiteren transgenen Mäuse produzieren. Nur in seltenen Fällen können die Proteine in Blut oder Urin der Mäuse festgestellt werden.

Eine neue Mauslinie entsteht nur mit transgenen Elterntieren, deren Nachkommen die Umsetzung der neuen Erbinformation durch Produktion des neuen und gewünschten Proteins zeigen.

Erfolg der Genmanipulationen

Die neue DNA, die in die befruchtete Eizelle per Mikroinjektion eingebracht wurde, kann an jeder beliebigen Stelle der natürlichen Erbanlagen eingebaut werden. D.h. Fehler sind vorprogrammiert. „Rutscht“ beispielsweise die neue DNA etwa in ein wichtiges Gen, kann dieses nicht mehr abgelesen werden. Transgene Tiere sind dadurch oft geringfügig bis erheblich belastet, oft sterben sie schon während der Schwangerschaft.

Für die Entwicklung einer neuen "Mauslinie" – also eines erfolgreich transgenen Tieres werden in etwa folgende Tiere „verbraucht“: 10 – 30 Muttertiere, 10 – 30 Ammenmütter, 2-10 sterilisierte männliche Mäuse sowie je 70 Nachkommen der ersten und zweiten Generation. Etwa 50% der befruchteten Eizellen überleben die DNA-Injektion, von diesen

überleben 10-30% der Mäuseembryonen die Schwangerschaft, hiervon sind maximal 25 % transgen, von diesen 25 % zeigen wiederum maximal 75 % die Expression des gewünschten Proteins.

Genetisch unerwünschte Tiere werden aussortiert und getötet. Ein Teil der erfolgreich genmanipulierten Tiere wird zur Zucht, der andere Teil für Versuche verwendet. Sie leben in Plastik Käfigen, pro Maus ist eine Bodenfläche von 60 Quadratcentimetern, also etwa 2/3 einer Postkarte, vorgeschrieben. Die Räume sind standardisiert, wie in der Versuchstierhaltung üblich. Sie unterliegen außerdem besonderen Sicherheitsvorkehrungen nach dem Gentechnikgesetz.



Mäuse, die für den Tierversuch vorgesehen sind. Sie werden unter standardisierten Bedingungen in Plastik Käfigen gehalten. Bild: Filo, iStockphoto.

Knock-out Mäuse

Durch diese Methode, die derzeit nur bei Mäusen routinemäßig möglich ist, kann mittels genetischer Manipulation ein zu untersuchendes Gen gezielt ausgeschaltet („ausgeknockt“) werden. Die Manipulation erfolgt an embryonalen Stammzellen, die aus Blastozysten (Keimbläschen, 4. Tag der Embryonalentwicklung) einer Mauslinie gewonnen werden. In diese embryonalen Stammzellen wird außerhalb des lebenden Organismus in der Petrischale (in vitro) eine zusätzliche Gensequenz zwischen das gewünschte Gen gesetzt, so dass dieses nicht mehr abgelesen und infolge dessen kein Protein mehr hergestellt werden kann.

Meist hängen die Wissenschaftler zusätzlich einen Biomarker mit an, damit der Erfolg der Genmanipulation hinterher erkannt werden kann. Die so manipulierten Stammzellen werden in die Blastozyste einer anderen Maus eingebracht, die als Leih- oder Ammenmutter die Nachkommen (auch als Chimären bezeichnet) austragen muss. Diese Nachkommen werden rückgekreuzt und neu verpaart, bis einige Tiere die Genmanipulation auf beiden Chromosomen aufweisen. Nach der Geburt sind erfolgreich transgene Tiere z. B. an ihrem zweifarbigen Fell zu erkennen, wenn Stammzellenspender und Eizellenspender unterschiedliche Fellfarben hatten. Geschädigte Nachkommen sind häufig schwer

erkennbar, sie zeigen unter anderem einen kleinen Körperwuchs, struppiges Fell, Inaktivität im Verhalten oder zusammengekauerte Körperhaltung.

Die Maus in der Atheroskleroseforschung

Wissenschaftler verwenden am liebsten die Maus für die Atherosklerose-Forschung. Sie ist ein sehr kleines Säugetier, ist leicht zu halten und sehr fruchtbar. Nach nur circa 21 Tagen bringen die weiblichen Tiere 5-15 Junge zur Welt. Außerdem sind ihre Erbanlagen im Vergleich zu anderen Tieren vollständig bekannt und sehr leicht zu verändern. Durch langjährige Forschung hat sich die Veränderung der Erbsubstanz (Genom) bei Mäusen heute zum Routineverfahren entwickelt. Dies zeigt sich insbesondere in dem systematischen Einsatz gentechnisch veränderter Mäuse in Tierexperimenten.

Atherosklerose wurde bisher bei Mäusen natürlicherweise nicht festgestellt (7). Mäuse verfügen über sehr viel die Blutgefäße schützendes HDL (High-Density Lipoprotein). Die Maus unterscheidet sich somit erheblich vom Menschen. Mäuse entwickeln Atherosklerose-Symptome nur bei völlig artfremder Ernährung (z. B. die sogenannte Western-Diät). Diese sehr fett- und cholesterinreiche Nahrung wird von Mäusen sehr ungern angenommen. Forscher können einige gewünschte Symptome ansonsten nur durch eine operativ ausgelöste mechanische Verletzung der Blutgefäße experimentell erzeugen.

Einen Ausweg fanden die Wissenschaftler schließlich durch genetische Veränderung der Tiere. Die so erhaltenen Mäuse werden als "Modelle" einer "Mauslinie" mit Buchstaben- und Zahlenkombinationen abgekürzt. In der Atherosklerose-Forschung sind die "APO-" und "LDL-Mäuse" weit verbreitet. In beiden "Mauslinien" wurden bestimmte Gene durch Gentechnik ausgeschaltet (knock-out Mäuse). Außerdem wurden menschliche Gene in Mäuse eingeschleust (knock-in Mäuse). Hier ist die "Linie" "E3L" für Forscher von Interesse. Diese transgenen Mäuse können das "schädliche" Cholesterin LDL (Low-Density Lipoprotein) nicht mehr gut eliminieren. Sie entwickeln höhere Cholesterin-Werte und schließlich Atherosklerose-Symptome. Eine Fett-Cholesterin-Zufütterung ist hier nicht mehr notwendig, sie verbessert aber die Ergebnisse (8). Jede weitere "Mauslinie" soll die menschliche Krankheit besser darstellen und nicht zuletzt ihren "Erfinder" berühmt werden lassen.

Zusätzliche Kritik

Abgesehen davon, dass die menschliche Krankheit über künstlich erzeugte "Modelle" erforscht werden soll, zeigen sich zwischen Mensch und Maus große Artunterschiede. Das sogenannte "Modell" wiegt 3000mal weniger als sein "Vorbild" – der Mensch (8). Mit einer natürlichen Lebenserwartung von 2-3 Jahren kann eine Krankheit, die sich beim Menschen über Jahrzehnte entwickelt, schon vom Ansatz her gar nicht nachgebildet werden. Und im Labor warten die Forscher lediglich Monate bis zur Auswertung. Bis zur gewünschten Gentechnik-Maus müssen viele Mäuse sterben, die nicht die gewünschten Eigenschaften zeigen. Nicht selten treten aber auch in den schließlich gewünschten Gen-Mäusen unvorhergesehene Veränderungen in Stoffwechsel oder Organen auf. Die Sinnlosigkeit an "Tiermodellen" statt an menschlichen Zellen zu forschen, zeigt sich vor allem darin, dass die Erkrankung bis heute nicht geklärt und Todesursache Nummer Eins geblieben ist.

Tierversuchsfreie Methoden

Alle hier vorgestellten Ersatzmethoden basieren auf dem Einsatz humanen Materials, also auf Blutproben oder Zell-/Gewebeentnahmen bzw. Biopsien. Hinzu kommen die Entwicklungen physikalischer Testsysteme, computer-gestützter in silico-Methoden sowie bildgebender Verfahren.

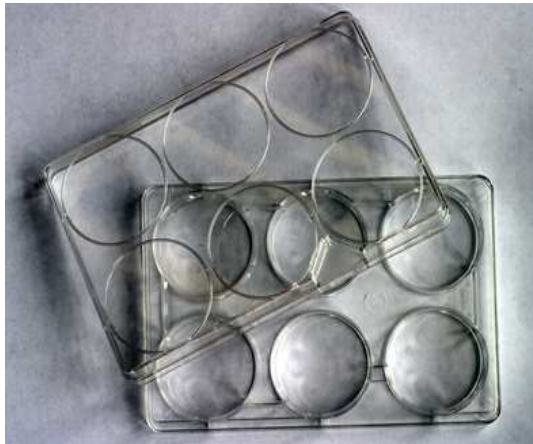
1. Der Einfluss von Blutplättchen auf die Funktion bestimmter Immunzellen (Dendritische Zellen), in vitro untersucht in einem Parallelplatten-Flusskammersystem (9)

Blutspenden gesunder Probanden wurden verwendet, mit Gerinnungshemmern versetzt, fraktionell zentrifugiert und die Blutplättchen (Thrombozyten) isoliert. Zudem isolierten die Forscher Vorläuferstadien Dendritischer Zellen (ein Zelltyp des angeborenen Immunsystems). Sie kultivierten die Dendritischen Zellen mit wachstumsfördernden Substanzen (käuflich erwerbbar). Die Forscher untersuchten dann das Anheftungsverhalten der Dendritischen Zellen unter statischen und unter dynamischen Bedingungen in einem konstruierten Flusskammersystem.



Proband als Blutspender. Foto: Klaus Epele

Für die statische Untersuchung wurden die Thrombozyten in Mikrotiterplatten zusammen mit Collagen (ebenfalls käuflich erwerbbar) zusammen gebracht und für zwei Stunden angezüchtet. Dann gaben sie die Dendritischen Zellen hinzu und ließen das Ganze für 30 Minuten wirken. Nach einem Waschschrift konnte nun das Befestigungsverhalten der Dendritischen Zellen auf den Blutplättchen mit einem Phasenkontrastmikroskop untersucht werden.



Mikrotiterplatte mit 6 Untersuchungskompartimenten (Wells).

Foto: Collpicto, Fotolia.

Für die Untersuchung unter dynamischen Bedingungen wurde ein Glasobjektträger mit Collagen überzogen und dieser in ein Parallelplatten-Flusssystem eingesetzt und mit einer Pufferlösung umschwemmt. Hiernach wurden die Thrombozyten auf das Collagen aufgebracht. Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden gaben die Wissenschaftler Dendritische Zellen in die Pufferlösung.

Das Verhalten der unterschiedlichen Zelltypen wurde per Video aufgezeichnet. In dem Flusskammer-system konnten die Forscher zeigen, dass die Anwesenheit der Thrombozyten die Befestigung und Immunzellreaktion der Dendritischen Zellen *in vitro* auslösen kann. Die Thrombozyten setzen eine Vielzahl an „Entzündungsstoffen“ frei (z. B. Interleukin-1), die auf den Reife- und Funktionsprozess der Dendritischen Zellen Einfluss haben.

Wenn sich die Dendritischen Zellen an die Thromozyten angeheftet haben, werden sie veranlasst, die Entzündungsreaktion zu regulieren. Im Rahmen dessen locken sie einen weiteren wichtigen Immunzelltyp an. Die Dendritischen Zellen verhalten sich dabei unter konstruierten Fließbedingungen ähnlich wie unter *in vivo*-Bedingungen (im lebenden Patienten).

Das konstruierte Parallelplatten-Flusssystem dient dazu, die Situation *in vivo*-ähnlicher zu gestalten: Unter kontrollierten Druckverhältnissen lassen sich neben dem An- und Abtransport von Nähr- und Stoffwechseabfallstoffen auch die auftretenden Scherkräfte simulieren.

Mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersuchten die Forscher, ob die Thrombozyten von den Dendritischen Zellen aufgenommen (phagozytiert) wurden. Anhand bestimmter Tests konnten sie feststellen, dass die Thrombozyten in den Dendritischen Zellen einen programmierten Zelltod (sogenannte Apoptose) auslösen. Dieser Prozess ist ein wichtiges Merkmal beim fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose.

Für die Entwicklung eines Strömungsmodell und der Möglichkeit, realistische Durchfluss-Szenarien in Blutgefäßen für die Atheroskleroseforschung zu untersuchen, hat *Dr. Harald F. Langer* 2006 den Ursula-Händel-Tierschutz-forschungspreis erhalten. Auch andere Gruppen

arbeiten mit Flusskammersystemen: Eine Forschergruppe hat das Parallelplattenmodell zu einem Stufenmodell weiter entwickelt. Letzteres dient u.a. dazu, nicht nur laminare Strömungsverhältnisse, sondern auch einen Scherkraftgradienten, Fließtrennungen und Fließrezirkulationen zu erzeugen, wie sie um Plaques in den Blutgefäßen des Patienten eintreten würden (10).

Kritik:

Diese Untersuchung wurde 2007 parallel gleichzeitig an Mäusen durchgeführt. Falls diese Konstruktion sich für derartige Untersuchungen als zuverlässig und reproduzierbar erweist, könnten die Forscher den Tierversuch unterlassen und nach neuen Wegen suchen, z. B. mit ergänzendem Einsatz bildgebender Methoden am Patienten. Auch können die Befunde durch vorliegende klinische Daten gestützt werden.

2. Dreidimensionales Ko-Kulturenmodell zur Untersuchung der Entstehung Plaques (Ablagerungen), einem späteren atherosklerotischen Stadium (11)

Ein interessantes Modell ist das Ko-Kulturenmodell von *Prof. Dr. Bernhard Dorweiler* aus Mainz. Hier werden humane glatte Muskelzellen zusammen mit menschlichen Endothelzellen in einer abbaubaren Fibrinmatrix kultiviert. In der Kultur bildet sich eine mehrlagige Schicht glatter Muskelzellen sowie eine dicht am Kulturgefäß haftende Endothelschicht. Dadurch wird die innere Wand des Blutgefäßes (sogenannte Neo-Intima) künstlich erzeugt. Sie hat sich als voll funktionsfähig gezeigt, da sie in der Lage war, wichtige Substanzen abzusondern, wie Laminin oder Collagen.

Durch übermäßige Hinzugabe von LDL (low density lipoprotein) wurde ein Überschuss dieses Proteins simuliert, um zu untersuchen, welchen Einfluss dieser LDL-Überschuss auf die Zellsituation in der Kultur hat. Gleichzeitig fügten die Forscher Vorläuferzellen von Immunzellen (Monozyten genannt) des Menschen hinzu. Sie beobachteten, dass die Fette sofort in die Schichten zwischen gewachsenem Endothel und glatten Muskelzellen eindringen und die Monozyten sich an die Endothelwand hefteten. Die Monozyten drangen durch die Endothelzellen, nahmen Fette in sich auf und bildeten nach 6 Tagen sogenannte Schaumzellen. Zudem wurde ein Entzündungsbotenstoff (Interleukin-8) freigesetzt.

In einem anderen Forschungsprojekt wurde mit dem Ko-Kulturenmodell die Funktion eines anderen Immunzelltyps, der neutrophilen Granulozyten untersucht (12). Im Rahmen dessen untersuchten die Forscher Gewebeproben immunhistochemisch und mit dem Transmissionselektronenmikroskop.

Bewertung:

Das 3D-Ko-Kulturenmodell wird aktuell in einer Forschungsarbeit verwendet, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert wird (13). Potenziell halten die Forscher das Modell für geeignet, charakteristische Stadien der Atherosklerose in Langzeit-Kultur (bis zu sechs Wochen) zu studieren. Durch eine Ergänzung mit molekularbiologischen Methoden, so schreiben sie in ihrer Veröffentlichung, kann das Modell auch zur Untersuchung von intra- und extra-zellulären Signalwegen eingesetzt werden. Sie sind überzeugt, mit ihrem Modell die Lücke zwischen einer in vitro-Monokultur und dem fragwürdig übertragbaren Tierversuch schließen zu können und so zu einer Reduktion der Tierversuche beizutragen.

3.: Humane Endothelzellen in Kultur zur Untersuchung der Endothelphysiologie, Endothelbiopsie (14)

In bestimmten Fragestellungen kann es ausreichend sein, im Gegensatz zum eben beschriebenen Ko-Kulturenmodell mit einem einzelnen Zellkulturtyp zu arbeiten. Veränderungen des Endothels stellen ein Primäreignis bei der Entstehung von Gefäßkrankheiten dar (14). Die Forscher untersuchten den Einfluss zu hohen Blutzuckers auf Endothelzellen, indem sie sich mit der Umsetzung der Gene in ein Protein (Genexpression und Proteinexpression) befassten. Sogenannte HUVEC-Zellen (humane umbilical vein endothelial cells) können zu diesem und anderen Zwecken käuflich erworben werden. Sie werden aus der Nabelschnurvene Neugeborener gewonnen (15).

Zirkulierende Endothelzellen lassen sich aber auch im Blut von Diabetes-Typ2-Patienten und gesunden Probanden (Vergleich) finden. Sie können aus der Blutprobe isoliert und analysiert werden (16). Die Forscher gewannen von Probanden mit fortgeschrittener Gefäßkrankheit und gesunden Freiwilligen Gewebematerial. Mittels eines sehr dünnen Drahts in J-Form, der durch einen Gefäßkatheter in die Armvene eingebracht wurde, konnten Endothelzellen vorsichtig der Blutgefäßwand entnommen werden. Nach dem Procedere befanden sich an der Drahtspitze einzelne Zellen, die die Wissenschaftler in ein Probengefäß mit Pufferlösung überführten. Sie reinigten die Zellen und lösten sie auf, um eine bestimmte Form genetischen Materials (ribosomale Nukleinsäure = RNA) nach einem bestimmten gentechnischen Verfahren isolieren zu können.

Die RNA dient naturgemäß als Vorlage für die Herstellung von Proteinen. Das gewonnene genetische Material wurde vervielfältigt und in eine komplementäre Matrize (copy-DNA) umgeschrieben. Diese Matrize vervielfältigten die Forscher abermals. Mit Hilfe bestimmter gentechnischer Methoden wurde das Genmaterial analysiert und die Daten der erkrankten und gesunden Probanden miteinander verglichen. Verschiedene Methoden der Endothelbiopsie für die Atheroskleroseforschung diskutieren auch andere Wissenschaftler (17).

4. Untersuchung zirkulierender Monozyten aus humanem Blut (18), (19)

In einigen Fällen lassen sich Erkenntnisse auch direkt aus dem Blut von Patienten erzielen und der Funktionsmechanismus durch Vergleich mit gesunden Probanden klären. In einem Fall wurde untersucht, ob und wie zwei unterschiedliche Immunzell-Vorläuferzelltypen (Monozyten), die sich durch ein Oberflächenmolekül unterscheiden, auf ein in vitro-Milieu mit übermäßigem Cholesterin reagieren. Dafür wurden die Monozyten aus dem Blut kranker und gesunder Probanden isoliert und mit oxidiertem LDL sowie nicht-denaturierten LDL von Gesunden zusammengebracht. Die Reaktion der Immunzellen wurde durchflusszytometrisch analysiert, ein Teil unter dem Laserscanning-Mikroskop untersucht.

In einer anderen Studie wurde die Beziehung zwischen blutzirkulierenden Immunzellen (Monozyten) von Patienten mit erblich bedingter Hypercholesterinämie (zu hoher LDL-Cholesterinspiegel wegen Gendefekt auf dem LDL-Rezeptor), erhöhten Blutfetten und dem Lipoproteinstoffwechsel untersucht (18). Hierfür wurden Proben sowohl von Patienten genommen, die den Gendefekt auf beiden Chromosomen zeigten (homozygot), als auch solche Proben von Patienten, die den Gendefekt nur auf einem Chromosom hatten (heterozygot). Zum Vergleich wurden Proben von gesunden Freiwilligen untersucht.

Die Monozyten wurden isoliert, gereinigt und ihr Reinheitsgrad durchflusszytometrisch bestimmt. Per Gaschromatographie-Massenspektrometer maßen die Forscher die Cholesterol- und oxidierte Cholesterol-Metabolitenkonzentration im Blutserum. Von den isolierten Immunzellen wurden sogenannte Genexpressionsprofile angefertigt und per Mikroarray-Verfahren die Menge an Genprodukten bestimmt. Die verschiedenen Proteine wurden per Westernblot-Verfahren untersucht. Die Wissenschaftler verglichen alle Ergebnisse der Zellphysiologie der zirkulierenden Monozyten erkrankter Personen mit den Befunden der gesunden Probanden.

5. Arterien-auf-dem-Chip-Modelle (20)

Mittlerweile haben Forscher mikrofluidische Chipplattformen entwickelt, in denen kleinste Blutgefäße mit einem Durchmesser von 0,25 Millimeter und 1,5 Millimeter Länge für Testzwecke genutzt werden. Solcher Art kleinste Gefäße künstlich herzustellen ist derzeit noch eine große Herausforderung. Die Arterien müssen voll funktionsfähig sein und erlauben möglicherweise in Zukunft eine Reduktion der Tierversuchszahlen, z. B. bei der Wirkstoffentwicklung gegen Atherosklerose (sogenanntes Drug screening).

Die Wissenschaftler zielen bei der Miniaturierung durch Chip-Modelle darauf ab, eine Vielzahl an Proben gleichzeitig bearbeiten zu können (sogenanntes Hochdurchsatzverfahren). Bis vor Kurzem haben sich z. B. kanadische Forscher der Universität Toronto noch der filigranen Gefäße der Maus bedient, um z. B. eine Belastbarkeit und Beständigkeit sehr kleiner Arterien bei unterschiedlichen Druckverhältnissen testen zu können (20). Fortschritte bei den tiereinsatzfreien Verfahren sind aber auch hier bereits erzielt worden.

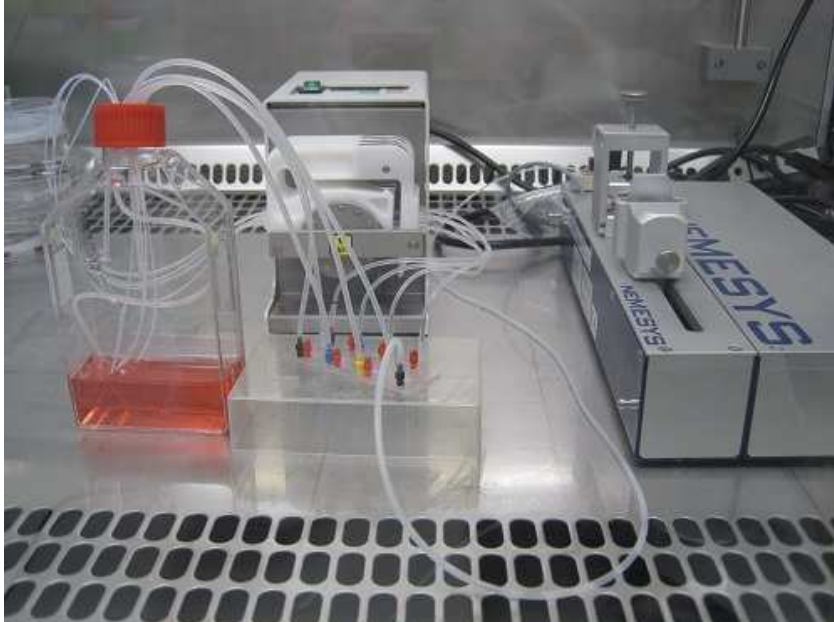
Die Herstellung künstlicher Blutgefäße fällt in den Bereich des Tissue Engineering (21, 22). Am Hamburger universitären Herzzentrum hat man bereits Blutgefäße aus Polyurethan künstlich herstellen können, die von menschlichen Fibroblasten und glatten Muskelzellen erfolgreich besiedelt wurden. Dies war bis zu einem Gefäßdurchmesser von 3 Millimetern erfolgreich. Sie behielten ihre Funktionsfähigkeit hinsichtlich Schwerkraft, Druck und Fluss (21). Die Forscher sind zuversichtlich, derartige Modelle zukünftig in der Atheroskleroseforschung einsetzen zu können.

Erfolgversprechende Ergebnisse haben auch Forscher aus Jena, u.a. die Arbeitsgruppe um *Sandy Mosig* erzielt. Auf einem Chip sind vier Kompartimente über Kanäle miteinander verbunden (siehe Abbildung im Folgenden). In jedem Kompartiment wächst in dreidimensionaler Form ein anderer Zelltyp: in einem Kompartiment werden Blutgefäße nachgebildet, in einem anderen Lebergewebe, auf einem weiteren wächst Lungengewebe. Die künstlichen Gewebe werden mit notwendigen Nährstoffen über ein Leitungssystem mit zwei Pumpen versorgt (siehe Foto 2). Der Nährlösung lassen sich Immunzellen, Medikamente oder andere zu untersuchende Substanzen hinzufügen.



Chip mit vier verschiedenen Kompartimenten zur Anzucht unterschiedlicher Humangewebetypen in dreidimensionaler Form.

Foto: Arbeitsgruppe Mosig, Jena.



Chipsystem verbunden mit Zuleitungen und einem Pumpensystem für die Versorgung mit Nährlösung und Untersuchungssubstanzen.

Foto: Arbeitsgruppe Mosig, Jena.

Dabei legen die Wissenschaftler Wert darauf, dass das wachsende Gewebe von oben und unten mit Nährstoffen versorgt werden kann und nicht an einer Seite fest mit dem Untergrund verwachsen ist, sondern sich möglichst natürlich dreidimensional ausbilden kann. Die Vernetzung verschiedener Gewebe macht Sinn, denn so lassen sich z. B.

gegenseitige Stoffwechselbeeinflussungen bei der Forschung an toxischen Stoffen oder Medikamenten studieren. Die Forschung an den künstlichen Miniblutgefäßen wird von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) beim Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) finanziell unterstützt.

5. In silico: Konstruktion eines Atherosklerose-Simulationsmodells aus Magnet-Resonanz-Imaging Bildern (MRI) (23)

Für die Herstellung der Computersimulation entnahmen die Wissenschaftler zunächst zehn Beinschlagadern von verstorbenen Patienten. Es wurden sowohl Blutgefäße verwendet, die geringgradige als auch hochgradige atherosklerotische Blutgefäßschädigungen aufwiesen. Die Gefäßabschnitte wurden ihrer natürlichen Länge nach gestreckt und ein Gefäß eingeführt, das normalerweise zur Therapie verengter arterieller Blutgefäße eingesetzt wird, indem man von innen das Blutgefäß durch eine Art Ballondruck dehnen kann und damit gegen die Gefäßverengung arbeitet (Ballonangioplastie, 23). Das Gerät wurde durch die jeweilige Gefäßhülle geschoben und an den geschädigten Stellen positioniert.

Dann wurden Magnetresonanzaufnahmen gemacht. Die Arterien wurden mit dem Gerät und unterschiedlichen Drücken, wie sie auch durch den Blutdruck bzw. Bluthochdruck vorkommen würden nach und nach von einem klinische Ganzkörpermagnetresonanztomografen gescannt. Mit Ausnahme der Stellen mit den atherosklerotischen Schäden wurden die Arterien an allen anderen Stellen bis auf zu 6 bar „aufgepumpt“ und auf diese Weise fotografiert. Die Arterien wurden jeweils in Hälften geschnitten und für histopathologische Untersuchungen genutzt. Die erhaltenen Bilderstapel wurden zu dreidimensionalen Oberflächen zusammengesetzt und zwar entsprechend der unterschiedlichen Druckstadien.

Auf diese Weise konnte ein morpho-mechanisches Modell der erkrankten menschlichen Beinschlagadern hergestellt werden. Die Wissenschaftler konnten verschiedene Stadien der atherosklerotischer Plaques darstellen. Auf der Basis des hrMRI (high resolution Magnetresonanz-Imaging) ließen sich genetische Veränderungen am Computer simulieren. Die Forscher geben an, dass das Modell um verschiedene Aspekte erweitert und zu einem Simulationsprogramm weiter entwickelt werden kann.

Eine weitere in silico-Methode basiert auf einer Datenbank mit Variationen einzelner Basenpaare im DNA-Strang, allerdings stammen diese Informationen über Variationen von genetisch modifizierten Mäusen. Im Modell wird versucht, einen Einfluss dieser Variationen auf die Merkmalsausprägung zu ermitteln, wobei dies schwierig ist, weil eine Vielzahl an Genen hierbei eine Rolle spielen, aber auch Umweltfaktoren und Spontanmutationen üben einen Einfluss aus (23). Diese Datenbank sollte mit humanspezifischen Daten gefüllt werden.

6. Kinetische Modelle (24)

Es gibt bereits kinetische Modelle auf Computerbasis zur Berechnung der Zeit, bis sich ein bestimmtes Atherosklerosestadium (z. B. der Gefäßverschluss) entwickelt hat. Jedoch basieren die Erkenntnisse derzeit noch auf Grundlagen aus dem Tiereinsatz (24). Hier stehen die Arbeiten erst ganz am Anfang.

7. Kleine Einzeltests

Die unter dieser Rubrik erfassten Tests sind kleine Tests und dienen innerhalb einer Untersuchung oft als ein Baustein innerhalb einer Testreihe. Sie untersuchen meist die Eigenschaften und das Verhalten der verwendeten Zellen oder Gewebe. Meist werden sie in Kombination durchgeführt und werden Zelldifferenzierungstest, Proliferationstest, Zelladhäsionstest, Apoptosetest, Phagozytosetest oder Ziel-molekülttest genannt.

Fazit

Noch ist der Tiereinsatz trotz der vielfältig geäußerten Kritik an der Übertragbarkeit der Tierversuchsergebnisse nicht beendet worden. Zwischen 2007 und 2010 haben sich Forscher deutlich intensiver mit tierversuchsfreien Verfahren in der Atherosklerose-Forschung auseinandergesetzt als ab 2011. Viele Einzelmethoden wurden bereits entwickelt. Sie werden entweder ergänzend zum Tierversuch eingesetzt, um Detailkenntnisse zu erhalten oder der Tierversuch wird ergänzend eingesetzt, um die Erkenntnisse aus den in vitro-Methoden zu überprüfen.

Da die Einzel-Methoden nicht geeignet sind, den Tierversuch vollständig abzulösen, erscheint es sinnvoll, aus der Gesamtheit der Tierversuchersatzmethoden mehrere zu kombinieren, wie vergleichsweise dem Vorgehen in der Toxikologie: Hier zieht die Mehrzahl der Wissenschaftler und forschenden Unternehmen an einem Strang, um den Tierversuch durch humanspezifische Methoden abzulösen. Gleiches muss auch für die Erforschung von Krankheiten, in diesem konkreten Fall der Atherosklerose erfolgen.

Literaturquellen

- (1) <http://www.deutsche-gefaessliga.de/krankheitsbilder.html>
- (2) Li, Xiangdong; Liu, Yuanwu; Zhang, Hua; Ren, Liming; Li, Qiuyan; Li, Ning (2011): Animal models for the atherosclerosis research: a review, *Protein Cell* 2(3): 189–201.
- (3) Breitbach, M. (2007): Zelluläre Ersatztherapie unter Verwendung von Knochenmarkzellen beim Herzinfarkt in der Maus, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- (4) <http://www.curado.de/Diabetes-mellitus/Diabetes-Folgeerkrankungen-Arteriosklerose-3119/>
- (5) Key T. J. & Appleby, P. N. (2001): Vegetarianism, coronary risk factors and coronary heart disease. p. 33-54. In: Sabaté, J. (ed). *Vegetarian nutrition*. CRC Press, Boca Raton, p. 35-37.
- (6) Hoffmann, I., Groeneveld, M. J. et al. (2001): Giessen Wholesome Nutrition Study: relation between a health-conscious diet and blood lipids. *Eur J Clin Nutr* 55 (10), 887-95.
- (7) Cullen, P.; Baetta, R. ; Bellosa, S. et al. (2003): Rupture of the Atherosclerotic Plaque : Does a Good Animal Model Exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 535-542.
- (8) DeLuna, A. (2008): Mouse models in atherosclerosis, *Drug Discovery Today: Disease Models* 5/3.
- (9) Langer, H. F. et al. (2007): Platelets Recruit Human Dendritic Cells via MAC-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function In Vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 1463-1470.
- (10) Won, D. et al. (2007): Relative Reduction of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression and transcription in Atherosclerosis-Prone Regions of the Mouse Aorta and in an in Vitro Model of Disturbed Flow. *The American Journal of Pathology* 171/5: 1691-1704.
- (11) Dorweiler, B. & Vahl, C.-F. (2007): Pathogenese der Atherosklerose: Evaluation eines Modells zur In-vitro-Simulation der Plaqueentstehung. *Z. Herz-, Thorax-Gefäßchir.* 21: 225-235.
- (12) Dorweiler, B. et al. (2008): Subendothelial infiltration of neutrophil granulocytes and liberation of matrix-destabilizing enzymes in an experimental model of human neo-intima. *Thrombosis and Haemostasis* 99/2: 373-381.
- (13) <http://gepris.dfg.de/gepris/OCTOPUS/&module=gepris&task=showDetail&context=projekt&id=53059602>
- (14) Onat, D. et al. (2011): Human Vascular Endothelial Cells. A Model System for Studying Vascular inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. *Curr. Diab. Rep.* 11: 193-202.
- (15) <http://www.millipore.com/stemcell/stma/endothelial&type=endothelia?cid=bios-x-goog-1027-1004-ds&gclid=CO7g4YutmbACFca-zAodLBUyWQ>

(16) Onat, D. et al. (2007): Vascular endothelial sampling and analysis of gene transcripts: a new quantitative approach to monitor vascular inflammation. *J. Appl. Physiol.* 103: 1873-1878.

(17) Fadini, G. P. & Avogaro, A. (2010): Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovascular Research* 87: 12-21.

(18) Mosig, S. et al. (2009): Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *The FASEB Journal* 23: 866-874.

(19) Mosig, S. et al. (2008): Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Medical Genomics* 1: 60 (<http://www.biomedcentral.com/1755-8794/1/60>)

(20) Günther, A. et al. (2010): A microfluidic platform for probing small artery structure and function. *Lab on a Chip* 10/18: 2341-2349.

(21) Gulbins, H. et al. (2009): Künstliche Gefäße – ein potenzielles in vitro-Modell zur Arterioskleroseforschung? *Clin. Res. Cardiol.* 98, Suppl. 1.

(22) Cornelissen, A. (2011): Vascular Composite Graft. Entwicklung einer kleinlumigen Gefäßprothese auf der Basis einer Fibringelmatrix. Optimierung von Gussverfahren, Bioreaktor und Kulturbedingungen. Dissertation RWTH Aachen.

(23) Auer, M. et al. (2010): In vitro Angioplasty of Atherosclerotic Human Femoral Arteries: Analysis of the Geometrical Changes in the Individual Tissues Using MRI and Image Processing. *Annals of Biomedical Engineering* 38/4: 1276-1287.

(24) Singh, V. et al. (2009): Models to Study Atherosclerosis: A Mechanistic Insight. *Current Vascular Pharmacology* 7: 75-109.; Bellosa, S. et al. (2003): Rupture of the Atherosclerotic Plaque : Does a Good Animal Model Exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 535-542.