

Schlaganfälle behandeln mit Erythropoietin und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)

Hugo H. Marti

Einleitung

In der Diagnostik und im Verständnis von Schlaganfall-Krankheiten sind in den letzten Jahren grosse Fortschritte gemacht worden. Die therapeutischen Möglichkeiten sind – mit Ausnahme der Thrombolyse – jedoch nach wie vor begrenzt. Unsere Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut der Universität Zürich sucht daher zusammen mit anderen weltweit tätigen Forschern nach neuen Behandlungsansätzen. Schlaganfälle sind eine häufige Todesursache und führen oft zu bleibenden Schäden und Behinderung. Als Folge eines Verschlusses einer Hirnarterie sinkt die Durchblutung gewisser Hirnareale, so dass Neuronen und Gliazellen zunächst in ihrer Funktion gestört sind, später aber absterben, weil ihnen zu wenig Sauerstoff und Glukose zur Verfügung stehen. Im Kern des Infarktes treten bereits innert Minuten irreversible Schäden auf, während im Randbereich, der Penumbra, die Sauerstoffversorgung zunächst ausreicht, um die vorübergehend in ihrer Funktion gestörten Zellen am Leben zu erhalten. Hält die Mangel durchblutung allerdings zu lange an, wird die Schädigung auch in der Penumbra irreversibel, und die Zellen gehen zu Grunde. Nur wenn es gelingt, die Durchblutung der Penumbra rasch zu verbessern oder die Zellen spezifisch vor dem Absterben zu schützen, können die Neuronen und Gliazellen überleben und ihre Funktion wieder aufnehmen.

Wir untersuchen nun, wie das Gehirn selbst auf schädigende Einflüsse mit gewissen Schutzmechanismen reagiert. Diese tragen wahrscheinlich zu der oft beobachteten Verbesserung der Symptomatik von Schlaganfallpatienten bei, reichen allerdings oftmals nicht aus, um dauerhafte Schäden zu verhindern. Könnten nun diese Mechanismen gezielt aktiviert und verstärkt werden, so unsere Überlegung, wäre dies eine attraktive Möglichkeit für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für Schlaganfallpatienten.

Physiologische Adaptation an Hypoxie

Wenn der Sauerstoffbedarf in einem Gewebe durch das Angebot nicht gedeckt werden kann, entsteht ein Mangel, welcher je nach Dauer als akute oder chronische Hypoxie bezeichnet wird. Hypoxische Zustände entstehen sowohl während physiologischer Vorgänge (Aufstieg ins Hochgebirge, Embryonalentwicklung) als auch im Verlaufe pathologischer Prozesse (ischämische Erkrankungen, Tumorwachstum). Die Anpassung des Organismus an Hypoxie erfolgt auf systemischer (Aktivierung des Herz-Kreislauf-Systems und der Atmung; Erhöhung der Erythrozytenzahl), lokaler (Gefässneubildung) und zellulärer Ebene (Aktivierung der Glykolyse) und führt immer auch zu einer verstärkten Transkription bestimmter Gene. Vor knapp zehn Jahren wurde mit der Identifizierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) ein zentraler Bestandteil der durch Hypoxie vermittelten Signalkaskade identifiziert [1]. Da bereits ein leichtes Absinken des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe zu einer starken Aktivierung von HIF-1 führt, ist dieser Faktor bei der physiologischen Adaptation an Hypoxie von entscheidender Bedeutung [2]. Aber auch bei ischämischen Erkrankungen spielen HIF-1 und durch Hypoxie induzierte Gene eine wichtige Rolle [3], welche durch die Aktivierung von HIF-1 im Infarktgebiet bei zerebraler Ischämie illustriert wird. Wir untersuchten daher Faktoren, die durch HIF-1 aktiviert werden (Abb. 1), wie das erythroide Wachstumshormon Erythropoietin (EPO) oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF).

Die Rolle von EPO im Gehirn

Bisher glaubte man, dass EPO hauptsächlich in der Niere gebildet wird und ausschliesslich auf die erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark wirkt. Wir konnten jedoch zeigen, dass EPO im Gehirn von Maus, Affe und Mensch exprimiert und durch Hypoxie induziert wird.

Verwendete Abkürzungen:

EPO: Erythropoietin
HIF-1: hypoxia-inducible factor-1
MAPK: mitogen-activated protein kinase
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEGFR: VEGF-Rezeptor

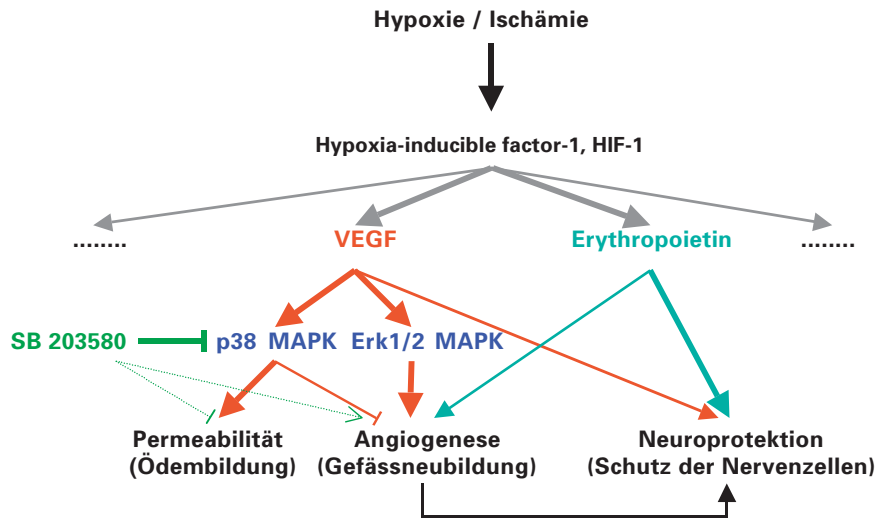
Korrespondenz:

PD Dr. med. Hugo H. Marti
Physiologisches Institut
Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich

marti@physiol.unizh.ch

Abbildung 1.

Schematische Darstellung der postulierten Kaskade der körpereigenen Schutzreaktion im Gehirn. Hypoxie und Ischämie führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1, welcher im Gehirn die Expression verschiedener Gene, wie zum Beispiel EPO und VEGF, steigert. EPO ist in der Lage, Neuronen vor dem Absterben zu schützen (Neuroprotektion), und führt auch zu einer gewissen Neubildung von Blutgefässen (Angiogenese). VEGF wirkt vor allem angiogen (über eine Aktivierung der Erk1/2 MAPK), hat aber auch neuroprotektive Effekte. Die neugebildeten Blutgefässe tragen durch Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen zum Überleben der Neuronen bei. VEGF führt aber zusätzlich über die Aktivierung der p38-MAPK zu erhöhter vaskulärer Permeabilität und somit zur Ödem-bildung. Der spezifische Hemmstoff der p38-MAPK, SB-203580, verhindert die Ödembildung und steigert gleichzeitig die Angiogenesereaktion.



Dabei wird EPO hauptsächlich von Astrozyten, aber auch von Neuronen gebildet, während der EPO-Rezeptor auf Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen vorkommt [4, 5]. Eine japanische Arbeitsgruppe konnte dann zeigen, dass das endogen im Gehirn gebildete EPO ein wichtiger Überlebensfaktor für Neuronen ist [6]. Wir fanden zur selben Zeit eine zeit- und zellspezifische Aktivierung von EPO und seinem Rezeptor im Verlaufe der zerebralen Ischämie und konnten in Zellkulturen nachweisen, dass EPO Nervenzellen vor dem Absterben schützt, indem es einerseits die durch Glutamat vermittelte Toxizität hemmt und andererseits über eine Stimulierung der Endothelzellproliferation zur Neubildung von Gefässen (Angiogenese) führt, welche vermehrt Sauerstoff in das hypoxische Gewebeareal transportieren [7]. Schliesslich wurde gezeigt, dass EPO und sein Rezeptor auch im Gehirn des Menschen nach einem Schlaganfall zeit- und zellspezifisch aktiviert werden [8]. EPO scheint im Gehirn also als angiogener und neuroprotektiver Faktor eine zweifache Funktion zu erfüllen [9].

VEGF und das Gehirn

Der Aspekt der Angiogenese führte uns dann zur Untersuchung von VEGF, dem wichtigsten angiogenen Faktor im Organismus. Wir zeigten, dass die Expression von VEGF *in vivo* unter Hypoxie in Gliazellen und Neuronen induziert ist [10]. Während zerebraler Ischämie entsteht in der Penumbra ein hypoxisches Areal, wo VEGF verstärkt exprimiert wird. Danach folgt eine Induktion von beiden VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, zunächst in der Penumbra selbst und später auch in gefässartigen Strukturen, welche in den Kernbereich des Infarktes einwachsen. Zwei Tage nach Verschluss der Arterie war schliesslich die Angiogenese-

reaktion voll ausgebildet. Ausser auf Endothelzellen konnten wir die VEGF-Rezeptoren unerwartet auch auf glialen und neuronalen Zellen nachweisen [11]. Diese Resultate liessen den Schluss zu, dass VEGF nicht nur eine angiogene Wirkung hat, sondern auch ein neuroprotektiver Faktor sein könnte. In der Tat konnte mittlerweile in verschiedenen Studien *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, dass VEGF sowohl neuroprotektiv als auch neurotroph wirkt [12]. Somit ist VEGF ähnlich wie EPO als multifunktionaler Wachstumsfaktor im Gehirn zu betrachten.

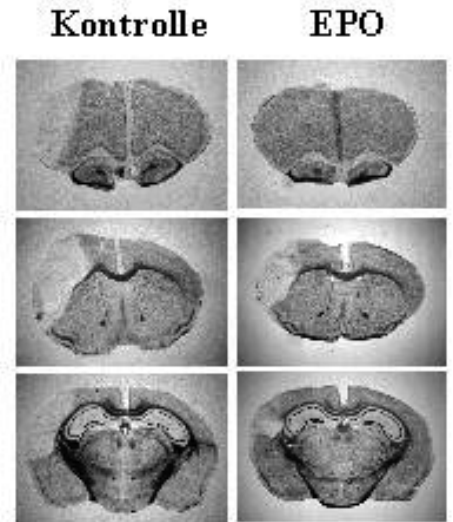
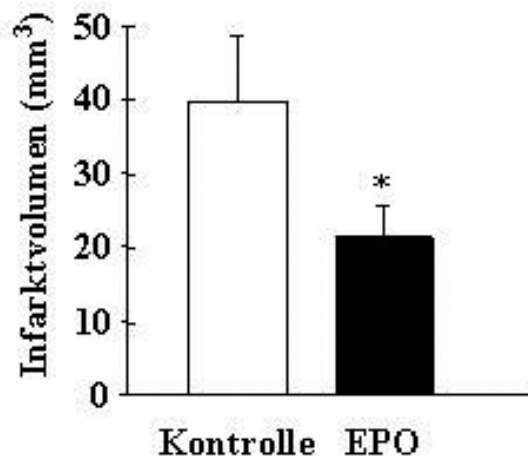
Angiogenese und Neuroprotektion als Therapie

Die Aktivierung von EPO und VEGF durch mangelhafte Durchblutung ist ein intrinsischer physiologischer Versuch des Organismus, auf die schädigende Ischämie zu reagieren. Das Nervengewebe kann dadurch zum Teil vor Schäden bewahrt werden: zum einen durch einen direkten Schutz der Nervenzellen (*Neuroprotektion*), zum andern durch die *Angiogenese*, welche die Durchblutung und damit die Sauerstoffversorgung der geschädigten Regionen verbessert.

Nun ergibt sich die Frage, ob eine exogene Unterstützung dieser körpereigenen Schutzreaktion durch eine therapeutische Gabe von VEGF oder EPO zur Verminderung des ischämischen Gewebes Schadens beitragen kann. Tatsächlich haben wir bei Mäusen zeigen können, dass EPO in der Lage ist, den durch einen Schlaganfall verursachten Schaden zu begrenzen. Bei den mit EPO behandelten Tieren war das abgestorbene Hirnareal nur halb so gross wie bei den nicht therapierten (Abb. 2) [9]. Auf Grund dieser Resultate wird die Substanz nun auch bei

Abbildung 2.

Protektiver Effekt von Erythropoietin (EPO) bei zerebraler Ischämie. (links) Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm SD ($n = 8-10$) des Infarktolumens; * $P < 0,0002$ gegenüber der Kontrollgruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist der Infarkt deutlich kleiner bei Tieren, welche mit EPO behandelt wurden. (rechts) Auf den repräsentativen koronaren Schnitten dreier Gehirnregionen ist das geringere Infarktausmass bei Tieren, welche mit EPO behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erkennbar. Die Gehirne wurden 24 Stunden nach permanentem Verschluss der A. cerebri media entnommen und mit Thionin gefärbt (adaptiert aus [9]).



Schlaganfall-Patienten erprobt. Eine Pilotstudie an der neurologischen Klinik der Universität Göttingen zeigte ermutigende positive Resultate [13]. Der rasche experimentelle Einsatz von EPO in der Klinik zur Behandlung des Schlaganfalls wird sicher dadurch erleichtert, dass dieses Hormon seit mehr als zehn Jahren als Medikament zugelassen ist und daher bereits klinische Sicherheitsdaten von Hunderttausenden von Patienten verfügbar sind. VEGF dagegen eignet sich in unveränderter Form nicht zur Behandlung von Schlaganfällen, denn das Molekül macht neben den erwünschten Effekten (Neuroprotektion, Angiogenese) auch die Gefässe durchlässig. Durch diese gesteigerte vaskuläre Permeabilität kann es zum Hirnödem kommen, einer lebensbedrohlichen Komplikation nicht nur bei Schlaganfällen, sondern auch nach Schädel-Hirn-Verletzungen, bei Hirntumoren und der Höhenkrankheit [14]. Wir untersuchten darum die intrazellulären Signalwege, über die VEGF seine Effekte vermittelt. Kürzlich gelang es uns, eine spezifische Proteinkinase, die p38-MAPK (mitogen activated protein kinase), zu identifizieren (Abb. 1), welche die beiden Prozesse Angiogenese und vaskuläre Permeabilität voneinander trennt. Die Hemmung der Aktivität von p38-MAPK unterband die durch VEGF vermittelte Steigerung der Permeabilität, unterstützte aber die durch VEGF induzierte Angiogenese-Reaktion [15], und wir sind zuversichtlich, hier einen viel versprechenden Ansatz zur Therapie sowohl des Hirnödems als auch der zerebralen Ischämie gefunden zu haben.

Ausblick

Mit EPO und VEGF haben wir zwei Faktoren identifiziert, welche in der Pathophysiologie

der zerebralen Ischämie eine Rolle spielen. Neueste Befunde von verschiedenen Gruppen der Universität Zürich deuten nun zudem darauf hin, dass EPO auch bei der Schädigung von Nervenzellen in der Netzhaut des Auges gebildet wird und hier ebenfalls eine Schutz- und Reparaturfunktion ausübt [16]. Auch bei anderen Erkrankungen des Gehirns könnte EPO eine heilsame Wirkung haben. So konnte in einem experimentellen Tiermodell für den Morbus Parkinson gezeigt werden, dass EPO in der Lage ist, dopaminerge Neuronen vor dem Absterben zu schützen [17]. Ebenso konnte in einem Epilepsiemodell der Beginn des *Status epilepticus* verzögert und die Mortalitätsrate bei denjenigen Tieren, welche mit EPO vorbehandelt worden waren, reduziert werden [18]. Die gleiche Arbeitsgruppe fand ausserdem heraus, dass in einem Tiermodell der multiplen Sklerose, der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), die Gabe von EPO zu einer signifikanten Verzögerung des Krankheitsverlaufes und zu einer Abnahme der klinischen Symptomatik führte [18]. Schliesslich zeigen jüngste Befunde, dass EPO auch bei Schädigungen des Rückenmarks eine neuroprotektive Wirkung hat und somit als mögliches Therapeutikum bei Querschnittgelähmten in Frage kommt [19–21]. Klinische Versuche werden hier hoffentlich bald zeigen, ob sich diese im Tiermodell erhobenen Befunde auf den Menschen übertragen lassen und EPO auch zur Behandlung dieser Krankheiten eingesetzt werden kann.

Für VEGF hingegen ist die Datenlage derzeit nicht ausreichend, um einen Einsatz am Schlaganfallpatienten zu rechtfertigen. Allerdings wird VEGF bereits klinisch getestet zur Behandlung anderer ischämischer Erkrankungen wie des Herzinfarktes und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Es fehlen aber

bisher gut kontrollierte und aussagekräftige Doppelblindstudien am Menschen, um sich ein abschliessendes Urteil über die Wirksamkeit dieses Therapieansatzes bilden zu können [22–24].

In unserer Grundlagenforschung verwenden wir daher verschiedene transgene Mauslinien, welche konstitutiv oder induzierbar mehr VEGF als normal im Gehirn bilden, um die verschiedenen Effekte von VEGF (Angiogenese, Permeabilitätssteigerung, Neuroprotektion) besser analysieren zu können. Und schliesslich suchen wir nach weiteren körpereigenen Faktoren mit therapeutischem Potential, welche ähnlich wie EPO und VEGF durch Hypoxie oder HIF-1 aktiviert sind und sowohl angiogene als auch neuroprotektive Effekte haben (Abb. 1). Die aktuellen Forschungsergebnisse zusammenfassend können wir feststellen, dass nur die Kombination verschiedener therapeutischer Ansätze zur Behandlung des Schlaganfalles Er-

folg verspricht. Anhand von EPO und VEGF haben wir gezeigt, dass dabei den durch Hypoxie induzierten, pleiotropen Faktoren im Gehirn eine besondere Bedeutung zukommt.

Danksagung

Ich danke meinen Lehrern und Mentoren, Prof. Christian Bauer und Prof. Werner Risau (†1998), für ihre nachhaltige Unterstützung. Ebenso möchte ich die langjährige und ausgezeichnete Zusammenarbeit mit Dr. Edwige Petit (Université de Caen, CNRS), Prof. Roland H. Wenger (Institut für Physiologie, Leipzig) sowie den Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim, insbesondere PD Dr. Matthias Clauss, erwähnen. Unsere Forschung wird unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds (31-67256.01), der Hartmann-Müller-Stiftung und der Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich.

Literatur

- 1 Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16:1151–62.
- 2 Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271: C1172–C1180.
- 3 Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000;14:1983–91.
- 4 Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996;8:666–76.
- 5 Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000;30:271–8.
- 6 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4635–40.
- 7 Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643–51.
- 8 Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101:271–6.
- 9 Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: A dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 2000;15:225–9.
- 10 Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 15809–14.
- 11 Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000;156: 965–76.
- 12 Marti HH. Vascular endothelial growth factor. *Adv Exp Med Biol* 2002;513:375–94.
- 13 Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495–505.
- 14 Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 2002;125:2549–57.
- 15 Issbrücker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, et al. p38 MAP kinase – a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J* 2003; 2003;17:262–4.
- 16 Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Maysen H, Seeliger M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature Med* 2002;8:718–24.
- 17 Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001; 298:139–41.
- 18 Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526–31.
- 19 Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konak S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2258–63.
- 20 Gorio A, Gökmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9450–5.
- 21 Goldman SA, Nedergaard M. Erythropoietin strikes a new cord. *Nature Med* 2002;8:785–7.
- 22 Thackray SD, Witte KK, Khand A, Dunn A, Clark AL, Cleland JG. Clinical trials update: highlights of the scientific sessions of the American Heart Association year 2000: Val HeFT, COPERNICUS, MERIT, CIBIS-II, BEST, AMIOVIRT, V-MAC, BREATHE, HEAT, MIRACL, FLORIDA, VIVA and the first human cardiac skeletal muscle myoblast transfer for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:117–24.
- 23 Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2001;142:872–80.
- 24 Isner JM. Myocardial gene therapy. *Nature* 2002;415:234–9.