

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig - Holstein, Campus Kiel
an der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel

DIE BEDEUTUNG DER AT₁ - UND AT₂ - REZEPTOREN IM GEHIRN BEI DER
ZEREBRALEN ISCHÄMIE

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel

vorgelegt von
ALEXANDRA FUNK
aus Radolfzell

Kiel 2009

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Culman

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Kuhlenbäumer

Tag der mündlichen Prüfung:

13. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

13. August 2009

gez.: Prof. Dr. Kalthoff
(Stellvertr. Ausschussvorsitzender)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Einführung	1
1.2.	Der zerebrale Insult	1
1.3.	Das RAS und die AT ₁ - und AT ₂ - Rezeptoren	2
1.4.	Die Bedeutung von Ang II bei zerebraler Ischämie	4
1.5.	Induzierbare Transkriptionsfaktoren im Gehirn	5
1.6.	Ziel der Studie	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Versuchstiere und ihre Haltung	8
2.2.	Verwendete Pharmaka und Chemikalien	8
2.2.1.	Narkotika	8
2.2.2.	I.v. applizierte Pharmaka und Substanzen	8
2.2.3.	I.c.v. applizierte Pharmaka und Substanzen	8
2.2.4.	Andere Substanzen	9
2.3.	Chirurgische Methoden	10
2.3.1.	Implantation osmotischer Minipumpen und von i.c.v. - Kanülen	10
2.3.2.	Implantation arterieller und venöser Katheter	11
2.3.3.	Modell der fokalen Gehirnischämie mit Reperfusion	12
2.4.	Allgemeine Methoden	13
2.4.1.	Intraarterielle Blutdruckmessung	13
2.4.2.	Bestimmung der aufgenommenen Trinkmenge	13
2.4.3.	Quantifizierung des neurologischen Defizits	13
2.4.4.	Evaluierung des neurologischen Defizits nach Bederson et al. (1986)	14
2.4.5.	Evaluierung des neurologischen Defizits nach Garcia et al. (1995)	14
2.4.6.	Bearbeitung der Gehirne	17
2.4.7.	Messung des Infarktvolumens	18
2.4.8.	Statistische Verfahren	18
2.4.9.	Protokolle der Experimente	19
3.	ERGEBNISSE	24
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	42
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44
7.	DANKSAGUNG	50
8.	LEBENS LAUF	51

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Ang II	Angiotensin II
ACE	Angiotensin - Konversionsenzym
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
AP - 1	Aktivatorprotein - 1
ABC	Avidin - Biotin - Komplex
CBF	zerebraler Blutfluss
DAB	Diamonobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i. p.	intraperitoneal
ITF	induzierbare Transkriptionsfaktoren
i.v.	intravenös
JNK	c - Jun N - terminale Kinasen
KG	Körpergewicht
MANOVA	mehrfaktorielle Varianzanalyse
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen - aktivierte Proteinkinase
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N - Methyl - D - Aspartat
PP	Polypropylen
RAS	Renin - Angiotensin - System
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SHR-SP	Spontan hypertensive - stroke prone Ratte

1. EINLEITUNG

1.1. Einführung

Der zerebrale ischämische Insult resultiert aus einer vorübergehenden oder permanenten Reduktion des zerebralen Blutflusses. Er ist in den meisten Fällen durch den Verschluss einer zerebralen Arterie verursacht, entweder durch einen Embolus oder durch lokale Thromben. Mit einer Inzidenz von 250 - 300 Neuerkrankungen auf 100 000 Einwohner stellt der zerebrale Insult die dritthäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar.

Die aus der Unterbrechung des Blutflusses resultierende Minderversorgung betrifft meist das Versorgungsgebiet einer großen zerebralen Arterie und führt im Gehirn zu vielen physiologischen, biochemischen und morphologischen Veränderungen, darunter zu einer veränderten Expression der induzierbaren Transkriptionsfaktoren (ITF) wie z. B. c - Fos und c - Jun. Diese scheinen in die pathophysiologischen Prozesse, die der zerebralen Ischämie folgen, involviert zu sein. Auch das Renin - Angiotensin - System (RAS) spielt in der zerebralen Ischämie eine bedeutende Rolle. Das Peptid Angiotensin (Ang) II ist das Effektorpeptid des RAS, welches die verschiedenen physiologischen Aktionen der kardiovaskulären und endokrinen Systeme und der peripheren und zentralen Nervensysteme beeinflusst. Die Wirkung dieses Peptids erfolgt im zentralen Nervensystem über eine Aktivierung der AT₁ - und AT₂ - Rezeptoren. Die meisten der zentralen Effekte werden durch den AT₁ - Rezeptor vermittelt, wie zum Beispiel die Trinkantwort, der Blutdruckanstieg und die Vasopressinfreisetzung. Der AT₂ - Rezeptor scheint in die Differenzierung, Entwicklung und Regeneration des zentralen Nervensystems involviert zu sein. Ein Hinweis dafür ist die starke Expression des AT₂ - Rezeptors im fetalen Gehirn (Steckelings et al. 1992).

Mehrere Befunde deuten darauf hin, dass die Angiotensin - Konversionsenzym (ACE) - Hemmstoffe und die AT₁ - Rezeptorantagonisten zahlreiche Vorgänge, welche in den Gehirngefäßen und im ischämischen Gehirngewebe ablaufen, beeinflussen können.

1.2. Der zerebrale Insult

Das Gehirngewebe hat einen vergleichsweise hohen Bedarf an Sauerstoff und Glukose und ist zur Deckung des Energiebedarfs fast ausschließlich auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen. Fokale Beeinträchtigungen der Blutzufuhr wie beim zerebralen ischämischen Insult verhindern den lebenswichtigen Zustrom von Substraten wie Sauerstoff und Glukose. Durch die Einstellung der Energieproduktion wird die Aufrechterhaltung der Ionengradienten unmöglich. Auch das Membranpotential kann nicht mehr aufrechterhalten werden, und Neurone und Glia depolarisieren. Infolgedessen werden somatodendritische sowohl als auch präsynaptische spannungsabhängige Ca²⁺ - Kanäle aktiviert und exzitatorisch wirkende

Aminosäuren wie z. B. Glutamat in den Extrazellulärraum freigegeben. Energie benötigende Prozesse, wie z. B. die präsynaptische Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren, werden eingestellt. Dies hat unter anderem eine Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt und im Extrazellulärraum zur Folge. Die Aktivierung von N - Methyl - D - Aspartat (NMDA) - Rezeptoren, welche exzitatorische Glutamatrezeptoren darstellen, führt zur Akkumulation von Na^+ - und Cl^- - Ionen in Neuronen. Wasser strömt entsprechend dem osmotischen Druckgefälle nach. Das daraus resultierende Ödem beeinträchtigt die Perfusion der die Infarktzone umgebenden Gehirngebiete. Bei starker Ödembildung kommt es über die Erhöhung des intrakraniellen Drucks zu Fernwirkungen, wie z. B. der vaskulären Kompression und der Herniation von Gehirnteilen. Die geschilderten Prozesse stellen nur einen kleinen Ausschnitt aus den möglichen pathophysiologischen Veränderungen im Verlauf eines ischämischen Insults dar. Die wichtigsten Mechanismen dieser Kaskade stellen die Exzitotoxizität, die Perinfarkt - Depolarisationen, die Entzündungsreaktion und der programmierte Zelltod dar (Dirnagl et al. 1999).

Zwischen dem irreversibel geschädigten Infarktkern und dem gesunden Gehirngewebe befindet sich die Penumbra, in welcher der Blutfluss eingeschränkt und der Energiemetabolismus teilweise erhalten ist. Die Penumbra kann sich im weiteren Verlauf infolge der Exzitotoxizität in Richtung Infarkt entwickeln.

Die Therapie des akuten ischämischen Insults verfolgt zwei Ziele: Die Auflösung des intravaskulären Thrombus durch eine thrombolytische Therapie und die Neuroprotektion, um das Gehirn vor den zellulären und metabolischen Konsequenzen der Ischämie zu schützen. Die Kaskade der durch die Ischämie induzierten Veränderungen beginnt innerhalb von Minuten, und der irreversible neuronale Schaden kann sich im Zentrum der ischämischen Zone sehr schnell manifestieren. Eine frühe Wiederherstellung einer, wenn auch marginalen, Perfusion der Penumbra erlaubt einen besseren Zustrom der zur Deckung des Energiebedarfs notwendigen Substrate Sauerstoff und Glukose, sowie neuroprotektiver Medikamente. Dadurch wird die Penumbra vor dem Reperfusionsschaden geschützt und damit gerettet (Trembly, 1995).

1.3. Das RAS und die AT_1 - und AT_2 - Rezeptoren

Das Effektorhormon des RAS ist Ang II. Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des arteriellen Blutdrucks, der Elektrolyt - und Volumenhomöostase, der Induktion von Durst, der renalen Funktion und der Hormonsekretion. Außerdem beeinflusst Ang II das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung, die Zellregeneration und kann Apoptose auslösen. Die dargestellten Wirkungen von Ang II werden über verschiedene Rezeptortypen

und Signaltransduktionssysteme vermittelt. Ang II wirkt unter anderem über Bindung an AT₁ - und AT₂ - Rezeptoren.

Der AT₁ - Rezeptor gehört zu der G - Protein - gekoppelten Rezeptorfamilie. Die Bindung von Ang II an den AT₁ - Rezeptor führt nach Interaktion mit G - Proteinen zur Aktivierung der Phospholipasen C, D und A₂, der Adenylylcyclasen und der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L - und T - Typ. Der AT₁ - Rezeptor wirkt nicht nur über die G - Protein gekoppelte Proteinkinase C - und Ca²⁺ - vermittelten Wege, sondern auch über andere intrazelluläre Signalkaskaden. Über die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine und die Aktivierung von Mitogen - aktivierter Proteinkinasen (MAPK) werden Zellwachstum und Zellproliferation initiiert. Dies spielt eine Rolle bei vaskulären und kardiovaskulären Läsionen, welche mit Endothelschäden, Atherosklerose, Hypertension und akutem Herzversagen assoziiert sind (de Gasparo et al. 2000).

Die Wirkung und die Funktion des AT₂ - Rezeptors sind noch nicht vollständig erklärt. Nur während der fetalen Entwicklung ist die Expression des AT₂ - Rezeptors in den meisten Organen stark ausgeprägt. In den meisten erwachsenen Geweben ist dieses Muster umgekehrt. Unter pathologischen Bedingungen hingegen ist die Expression des AT₂ - Rezeptors erhöht (de Gasparo et al. 2000). Diese Ergebnisse lassen auf eine Rolle des AT₂ - Rezeptors in der Zelldifferenzierung und - entwicklung schließen.

Neben dem hormonellen RAS gibt es lokale RAS in verschiedenen Organen, wie z. B. im zentralen Nervensystem, im Herz, in der Nebenniere, sowie in den Blutgefäßen. Verschiedene Studien haben ergeben, dass das zerebrale RAS unabhängig vom hormonellen RAS ist (Culman et al. 1995). Im Gehirn wurden alle Komponenten des RAS nachgewiesen. Die zerebralen AT₁ - und AT₂ - Rezeptoren, auf die Ang II als Neurotransmitter oder Neuromodulator einwirkt, vermitteln unter anderem folgende Funktionen: Blutdruckregulierung, Induktion von Durstgefühl, Natriurese, Salzappetit und vermehrte Freisetzung von Vasopressin (antidiuretisches Hormon), Oxytocin und Adrenokortikotropin. Die meisten der bisher bekannten peripheren und zentralen physiologischen Aktionen von Ang II werden über den AT₁ - Rezeptor vermittelt.

Die ACE - Hemmstoffe waren die ersten klinisch einsetzbaren Substanzen, die die Bildung des Ang II zu hemmen vermögen. Später wurden Ang AT₁ - Rezeptorantagonisten entwickelt, welche selektiv die Wirkung des Ang II über den AT₁ - Rezeptor hemmen. Im Gegensatz zu den ACE - Hemmstoffen passieren die AT₁ - Rezeptorantagonisten die Bluthirnschranke. Ein zusätzlicher günstiger Effekt der AT₁ - Rezeptorantagonisten im Vergleich zu den ACE - Hemmstoffen könnte daher in der Verfügbarkeit von Ang II am zerebralen AT₂ - Rezeptor liegen (Fournier et al. 2004). Da die AT₁ - Rezeptorantagonisten den AT₂ - Rezeptor nicht hemmen, bleiben potentiell günstige Wirkungen von Ang II auf diesen Rezeptor wie Differenzierung, antiproliferative Wirkungen und Vasodilatation

unbeeinflusst. (Unger, 1999). Die AT₁ - Rezeptorantagonisten werden gegenwärtig klinisch für die Behandlung der Hypertension eingesetzt. Ziel unserer Untersuchungen war, herauszufinden, welche Rolle der AT₂ - Rezeptor im Gehirn bei der Blockade des AT₁ - Rezeptors innehat.

1.4. Die Bedeutung von Ang II bei zerebraler Ischämie

Die günstigen Effekte der ACE - Hemmstoffe auf den neurologischen Status und die Genesung nach zerebraler Ischämie wurden schon mehrfach gezeigt: Die chronische Behandlung mit dem ACE - Hemmstoff Cilazapril verhinderte das Auftreten des zerebralen Insults bei spontan hypertensiven - stroke prone Ratten (SHR - SP) (Hajdu et al. 1991). In einer anderen Studie verringerte Cilazapril das neurologische Defizit und reduzierte das Infarkt volumen bei SHR - SP, welche einer zerebralen Ischämie ausgesetzt waren (Fuji et al. 1992). Die chronische Behandlung mit dem ACE - Hemmstoff Enalapril erhöhte die Überlebensrate und verhinderte zerebrovaskuläre Läsionen unabhängig von der Blutdrucksenkung bei mit salzhaltigem Trinkwasser behandelten SHR - SP (Stier et al. 1989). Wie bereits erwähnt, können ACE - Hemmstoffe hypertensive Patienten durch die Blutdrucksenkung vor einem Apoplex schützen. Außerdem fördern sie langfristig die Restitution nach einem ischämischen Insult durch die Normalisierung der Autoregulation des zerebralen Blutflusses (CBF) und die Verbesserung des kollateralen Blutflusses des ischämischen Gewebes. In der akuten Phase nach einem ischämischen Schlaganfall darf der Blutdruck jedoch nicht stark gesenkt werden. Die Behandlung mit ACE - Hemmstoffen verbesserte das Outcome nach zerebraler Ischämie auch bei normotensiven Ratten (Werner et al. 1991).

Eine Anzahl von Studien an Tiermodellen zeigte, dass die AT₁ - Antagonisten zerebrale Insulte verhindern können. Die chronische Behandlung von SHR - SP mit Losartan in Dosierungen, welche den Blutdruck nicht beeinflussten, reduzierte die Inzidenz des zerebralen Insults und zerebrovaskulärer Läsionen (Stier et al. 1993). Losartan verringerte die Inzidenz des zerebralen Insults und erhöhte die Überlebensrate bei mit salzhaltigem Trinkwasser behandelten Dahl - Salz - sensitiven Ratten (von Lutterotti et al. 1992). Chronische Vorbehandlung mit Candesartan bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) zeigte eine Reduktion des Schlaganfallvolumens nach fokaler zerebraler Ischämie (Ito et al. 2002, Nishimura et al. 2000). Wir wiesen nach, dass eine chronische Blockade der zerebralen AT₁ - Rezeptoren bei normotensiven Ratten den neurologischen Status nach fokaler zerebraler Ischämie signifikant verbessert (Dai et al. 1999).

Bei hypertensiven Patienten können die AT₁ - Rezeptorantagonisten den zerebralen Insult primär durch Senkung des Blutdrucks verhindern. Von beiden Angiotensinrezeptorsubtypen ist der AT₁ - Rezeptor vor allem in den zerebralen Arterien des erwachsenen Organismus

exprimiert. Ang II kann lokal gebildet werden und zusammen mit zirkulierendem Ang II zur Regulation des CBF beitragen.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass AT_1 - Rezeptorantagonisten die Folgen eines zerebralen Insults durch die Verbesserung des CBF mildern. Die chronische Vorbehandlung von SHR mit dem AT_1 - Rezeptorantagonisten Candesartan reduzierte das Infarktvolumen nach temporärer oder permanenter fokaler zerebraler Ischämie (Ito et al. 2002, Nishimura et al. 2000). Eine zweiwöchige Vorbehandlung mit Candesartan bei SHR resultierte in einer vollständigen Hemmung der AT_1 - Rezeptoren in den zerebralen Arterien und in den Gehirnarealen, welche in der zentralen Regulation des CBF sowie des sympathischen Nervensystems involviert sind. Bei SHR, welche einer vorübergehenden zerebralen Ischämie mit Reperfusion unterzogen wurden, reduzierte Candesartan auch das Infarktvolumen. Mögliche Mechanismen sind die Verschiebung der Autoregulationskurve in Richtung eines niedrigeren Blutdrucks, eine verbesserte Vasodilatation und eine verbesserte Durchblutung in den Randzonen des ischämischen Kerns (Nishimura et al. 2000). Nach chronischer AT_1 - Rezeptorblockade wurden bei SHR eine Reduktion der Mediadicke der A. cerebri media beobachtet, was zu einer erhöhten arteriellen Compliance sowie einer größeren Dilatationskapazität bei Abnahme des zerebralen Blutflusses führt. Alle diese Mechanismen tragen zu den günstigen Wirkungen der AT_1 - Rezeptorantagonisten bei zerebraler Ischämie bei (Ito et al. 2002). AT_1 - Rezeptorantagonisten könnten durch Mechanismen, welche unabhängig von der Normalisierung der zerebrovaskulären Autoregulation sind, zur Rückbildung der neurologischen Ausfälle nach einem ischämischen Schlaganfall beitragen. Wir zeigten, dass die Langzeitblockade der zerebralen AT_1 - Rezeptoren durch Irbesartan den neurologischen Status nach fokaler zerebraler Ischämie verbessert, sowie die Aktivatorprotein-1 (AP-1) - Transkriptionsfaktoren c - Fos und c - Jun im parietalen und im piriformen Kortex der ligierten Seite des Gehirns und im Hippokampus inhibiert. In diesen Experimenten wurde der AT_1 - Rezeptorantagonist vor Induktion einer zerebralen Ischämie chronisch intrazerebroventrikulär (i.c.v.) infundiert, in einer Dosierung, welche nur die zerebralen, nicht jedoch die vaskulären AT_1 - Rezeptoren effektiv hemmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AT_1 - Rezeptorantagonisten die Rückbildung der neurologischen Ausfälle durch eine Erhöhung des Blutflusses in der Penumbra und durch eine Beeinflussung verschiedener biochemischer und metabolischer Prozesse im ischämischen Gehirngewebe fördern.

1.5. Induzierbare Transkriptionsfaktoren im Gehirn

Die ITF modifizieren die Expression anderer Gene, sogenannter Zielgene. Die Expression der Zielgene verändert den Phänotyp der Zelle.

Die bisher am eingehendsten erforschten Protoonkogene sind c - fos und c - jun, welche die zellulären Homologe der Onkogene fos und jun darstellen. Sie kodieren die Proteine c - Fos und c - Jun, welche zur Familie der ITF gehören. Unter den vielen Protoonkogenen wurde den ITF - kodierenden Genen aufgrund ihrer Induzierbarkeit durch eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Stimuli die meiste Aufmerksamkeit entgegengebracht.

In - vitro Studien zeigten, dass c - Jun (wie auch c - Fos in manchen Fällen) in Zusammenhang mit neuronaler Schädigung und Apoptose steht.

Zahlreiche Untersuchungen wiesen nach, dass eine i.c.v. Behandlung von normotensiven Ratten mit Ang II eine Induktion der Expression von c - Fos und c - Jun auslöst. Beide ITF wurden im subfornikalen Organ, im medianen präoptischen Nukleus, im paraventriculären Nukleus und im supraoptischen Nukleus aufgefunden (Blume et al. 1998).

1.6. Ziel der Studie

Die ersten Studien an normotensiven und hypertensiven Ratten beschreiben günstige Effekte einer AT₁ - Rezeptorblockade nach einem ischämischen Schlaganfall. Die AT₁ - Rezeptorantagonisten überwinden die Blut-Hirn-Schranke und hemmen die AT₁ - Rezeptoren im Gehirngewebe. Dadurch bleiben die AT₁ - Rezeptor - vermittelten Effekte aus, und Ang II kann verstärkt mit dem AT₂ - Rezeptor interagieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit gingen wir der Frage nach, in wieweit die zerebralen AT₂ - Rezeptoren an den neuroprotektiven Effekten der AT₁ - Rezeptorantagonisten beteiligt sind. Die wichtige Voraussetzung für diese Untersuchungen war, eine Dosis des AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan und des AT₂ - Rezeptorantagonisten PD 123177 zu ermitteln, welche die zentralen AT₁ - bzw. AT₂ - Rezeptoren effektiv hemmt, ohne die vaskulären AT₁ - und AT₂ - Rezeptoren zu beeinflussen. Ergebnisse zahlreicher Vorversuche zeigten, dass eine fünftägige i.c.v. - Infusion der ausgewählten Dosis von Irbesartan bzw. von PD 123177 vor und während der Gehirnschämie eine effektive Blockade dieser Rezeptoren gewährleistet.

Im weiteren Vorgehen wurde untersucht, wie sich die selektive Hemmung von AT₂ - Rezeptoren auf die günstigen Effekte einer AT₁ - Rezeptorblockade bezüglich der Infarktgröße, des neurologischen Status und der Expression der ITF c - Fos und c - Jun nach fokaler zerebraler Ischämie auswirkt.

Wir konnten schon früher zeigen, dass eine i.c.v. Vorbehandlung mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan bei normotensiven Ratten den neurologischen Status nach einer fokalen zerebralen Ischämie verbessert (Dai et al. 1999). Irbesartan überwindet die Blut - Hirn - Schranke. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob eine einmalige systemische Applikation von Irbesartan ebenfalls günstige Auswirkungen auf den neurologischen Status nach einer fokalen zerebralen Ischämie hat. Irbesartan wurde deshalb

zu Beginn der Reperfusionperiode (90 min nach dem Beginn des Verschlusses der A. cerebri media) langsam intravenös (i.v.) infundiert.

Eine chronische systemische Vorbehandlung von SHR mit einem AT_1 - Rezeptorantagonisten vor einer fokalen Gehirnschämie reduzierte das Infarktvolumen. Die SHR zeigen aufgrund ihrer Hypertonie eine Hypertrophie der Gefäße, die zur Gefäßrigidität führt und die Anpassungsmöglichkeiten auf verschiedene Perfusionsdrücke verringert. Eine mehrtägige Vorbehandlung mit dem AT_1 - Rezeptorantagonisten verminderte den Mediadurchmesser der zerebralen Arterien, führte zur verbesserten Compliance der Gefäße und folglich zur Steigerung der Perfusion in der marginalen Zone des ischämischen Kerns. Bei normotensiven Ratten sind die Gefäßwände nicht pathologisch verändert und ein ausreichender zerebraler Blutfluss kann daher besser aufrechterhalten werden. Im dritten Teil dieser Studie wurde untersucht, ob eine mehrtägige systemische Vorbehandlung mit Irbesartan auch bei normotensiven Ratten den Gehirnschaden nach einem ischämischen Schlaganfall begrenzen kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere und ihre Haltung

Das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig- Holstein genehmigte die Versuche an Ratten in den Schreiben vom 01. Juni 1999, Az. X 252-72241.121-22 (37-4/99) und vom 06. April 2000, Az. X 252-72241.121-22 (22-2/00).

Alle Experimente wurden an männlichen Wistar - Ratten, welche von der Firma Charles River (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden, durchgeführt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Futterpellets: Altromin® Standarddiät für Ratten und Mäuse). Die Raumtemperatur betrug $24^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $60\% \pm 3\%$. Der Tierstall war von 6 - 18 Uhr beleuchtet. Die Versuchstiere wurden etwa zwei Wochen vor Versuchsbeginn bezogen und hatten ein Körpergewicht von 220 - 240 g.

Alle Versuche fanden jeweils in den Morgenstunden statt.

2.2. Verwendete Pharmaka und Chemikalien

2.2.1. Narkotika

Chloralhydrat:

4 g Chloralhydrat wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, die intraperitoneal (i.p.) injizierte Dosis betrug 400 mg/kg/Körpergewicht (KG).

2.2.2. I.v. applizierte Pharmaka und Substanzen

Angiotensin II:

Ang II für i.v. Injektionen wurde in physiologischer Kochsalzlösung 25 ng Ang II / 100 μl gelöst und als Bolus mit einer Dosis von 25 ng/kg/KG i.v. injiziert.

Irbesartan:

Irbesartan wurde als Lösung in einer Dosierung von 30 mg/kg/KG als langsame i.v. Infusion verabreicht. 30 mg Irbesartan wurden in 1 ml sterilem NaCl gelöst und mit 5 M NaOH auf einen pH - Wert zwischen 7,5 und 7,8 titriert.

Vehikel:

Physiologische Kochsalzlösung (pH - Wert 7,5 - 7,8, titriert mit NaOH).

2.2.3. I.c.v. applizierte Pharmaka und Substanzen

Irbesartan:

Irbesartan wurde in sterilem 0,9% NaCl gelöst und mit 5 M NaOH auf einen pH - Wert zwischen 7,5 und 7,8 titriert. Die Konzentration der fertigen Lösung war 4 nmol/ul.

PD123177:

PD123177 (Park - Davis, U.S.A.) wurde als 5% des endgültigen Volumens in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und das gleiche Volumen 0,9% ige Kochsalzlösung hinzugegeben. Nach kurzer Behandlung im Ultraschallbad wurde mit 0,9% iger Kochsalzlösung bis zum Erreichen des endgültigen Volumens aufgefüllt. Die Konzentration der fertigen Lösung betrug 2 nmol/µl.

Vehikel:

Physiologische Kochsalzlösung (0,9%) wurde in einem Verhältnis von 9:1 mit DMSO gemischt.

Angiotensin II:

Ang II für i.c.v. Injektionen wurde in physiologischer Kochsalzlösung (100 µg Ang II / ml) gelöst und als Bolus mit einer Dosis von 20 ng injiziert.

2.2.4. Andere Substanzen

PBS (10×), pH 7,4:

80 g NaCl, 11,5 g Na₂HPO₄ H₂O, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, dann wurde der pH - Wert und mit 5 M NaOH auf einen pH - Wert von 7,4 titriert und destilliertes Wasser bis zu einem Volumen von 1000 ml zugegeben.

PB (10×), pH 7,4:

11,5 g Na₂HPO₄H₂O, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH - Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,4 titriert. Das Volumen wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 ml ergänzt.

PBST:

1 ml Triton®X-100 wurde zu 499 ml PBS (1×, pH 7,4) hinzugegeben.

4% ige Paraformaldehydlösung:

40 g Paraformaldehyd wurden bei 60° C in 900 ml PB (1×, pH 7,4) gelöst, dann wurde das Volumen auf 1000 ml ergänzt.

30% ige Saccharose- Lösung:

150 g Saccharose wurden in 300 ml PBS (1×, pH 7,4) gelöst, dann wurde das Volumen mit destillierten Wasser auf 500 ml ergänzt.

Die anti - c - Jun (Ab-5, cat no. PC06) und anti - c - Fos (Ab-5, cat no. PC38) Kaninchen - Antisera wurden von Oncogene (Cambridge, MA, U.S.A.) erworben. Der Vectastain Avidin - Biotin-Komplex (ABC) Kit wurde von Biologo (Kiel, Deutschland) bezogen.

2.3. Chirurgische Methoden

2.3.1. Implantation osmotischer Minipumpen und von i.c.v. - Kanülen

Implantation der osmotischen Minipumpen:

Osmotische Pumpen (ALZET[®], Modell 2002, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) können Substanzen kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/h in das gewünschte Gewebegebiet abgeben. Über einen Katheter (PP-60, Polypropylenschlauch, neoLab Laborbedarf - Vertriebs GmbH, Deutschland) wurden die Substanzen in das Ventrikelsystem des Gehirns infundiert. Die osmotischen Pumpen bestehen jeweils aus einem Reservoir mit einem Flussmoderator, der über einen Polypropylenkatheter (PP-60) mit einer rechtwinklig gebogenen Metallkanüle (21 gauge) verbunden ist. Vor der Implantation werden die osmotischen Pumpen mit den genannten Medikamenten gefüllt und 24 h bei 37° C in einer sterilen 0,9% igen NaCl - Lösung vorinkubiert. Das chirurgische Verfahren zur Implantation der osmotischen Pumpen wurde wie folgt durchgeführt: Zur Narkose wurde Chloralhydrat i.p. in einer Dosierung von 400 mg/kg/KG verwendet. Nach Eintritt der Narkose wurde die Kopfhaut rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde am Rücken zwischen den Schulterblättern eine subkutane Tasche präpariert. Danach wurde der Kopf des Tieres in ein stereotaktisches Gerät (Firma Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA), mit Hilfe von zwei Ohrenstiften und einer Lochplatte zum Einhaken der oberen Schneidezähne eingespannt. Mit einer scharfen Skalpellklinge wurde die Kopfhaut des Tieres durch einen sagittalen Schnitt von 2 cm Länge bis auf das Periost durchtrennt. Der Schnitt wurde mit einem Wattestäbchen stumpf nach lateral erweitert, so dass die Kreuzungsstelle der Sutura coronalis und der Sutura lambdoidea mit der Sutura sagittalis, das sogenannte Bregma und das Lambda, dargestellt wurden. Vom Bregma (Kreuzungsstelle der Sutura coronalis mit der Sutura sagittalis) aus erfolgte dann die Einstellung der Koordinaten:

→ 1,3 mm links der Sagittalnaht und

→ 0,6 mm posterior des Bregmas

Diese Stelle wurde mit einer feinen Kanüle nur oberflächlich angebohrt. Mit einem 0,8 mm starken Handbohrer wurde dann an dieser Stelle bis auf die Dura aufgebohrt und mit einem zweiten Bohrer von 1,2 mm Stärke das Bohrloch erweitert. Mit einer feinen abgeknickten

Kanüle erfolgte dann vorsichtig das Durchstechen der Dura mater. Zwei weitere Löcher wurden dorsal beidseits der Sagittalnaht in die äußere Kompakta gebohrt, um hier die Messingschrauben zur späteren Fixation der i.c.v. - Kanüle mit Zement einzubringen. Die osmotische Pumpe wurde in der subkutanen Tasche platziert. Im Anschluss erfolgten die Einstellung der Kanüle mit dem stereotaktischen Gerät über dem ersten Bohrloch und das Versenken der Kanüle um 5 mm, so dass sie bis in den linken Seitenventrikel reichte. Daraufhin wurde die Präparation mit Zahnzement (autopolymerisierender Kunststoff) fixiert. Nach Abkühlen des Kunststoffs wurde der Führungsdraht aus der Verweilkanüle entfernt, die Wunde zugenäht und das Tier aus dem Gerät genommen.

Implantation der i.c.v. - Kanüle:

Die i.c.v. - Kanüle besteht aus einem Polypropylenkatheter, welcher eine mit Hilfe eines Führungsdrahts und durch Erhitzen hergestellte wulstartige Auftreibung aufweist, welche an der einen Seite auf 5 mm gekürzt wurde.

Bei der Implantation der i.c.v. - Verweilkanüle wurde bis zur Aufbohrung der Dura wie bei der Implantation der osmotischen Minipumpen vorgegangen. Mit einer feinen abgeknickten Kanüle erfolgte dann vorsichtig das Durchstechen der Dura mater. Zwei weitere Löcher wurden dorsal beidseits der Sagittalnaht in die äußere Kompakta gebohrt, um hier die Messingschrauben zur späteren Fixation der i.c.v. - Kanüle mit Zement einzubringen. Im Anschluss erfolgten die Einstellung der Kanüle mit dem stereotaktischen Gerät über dem ersten Bohrloch und das Versenken der Kanüle um 5 mm, so dass sie bis in den linken Seitenventrikel reichte. Daraufhin wurde die Präparation mit Zahnzement fixiert. Ein weiterer Wundverschluss war nicht notwendig. Nachdem der Kunststoff erkaltet war, wurde der Führungsdraht aus der Verweilkanüle entfernt und das Tier aus dem Gerät genommen.

2.3.2. Implantation arterieller und venöser Katheter

Die Katheter wurden in die V. femoralis für die i.v. Applikation von Irbesartan, Vehikel und Ang II, sowie in die A. femoralis für die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz gelegt.

Die Narkose wurde mit Chloralhydrat (400 mg/kg/KG i.p.) durchgeführt. Anschließend wurden die Leisten rasiert und durch manuelle Palpation wurde die A. femoralis lokalisiert. Durch einen Schnitt parallel zur Inguinalfalte wurde die Haut eröffnet. Das subkutane Fettgewebe und die Faszien wurden stumpf zur Seite präpariert. Danach wurde das Gefäß - Nervenbündel, bestehend aus Arteria, Vena und Nervus femoralis, freigelegt. Nach der Trennung der Gefäße aus dem Bündel wurden die einzelnen Strukturen fixiert und für die Implantation eröffnet. Die dazu verwendeten Katheter bestanden aus Polypropylenschläuchen. Der venöse Katheter mit einem Durchmesser von 0,58 mm (PP-50)

wurde nach Einführung in das Gefäß 3 cm nach proximal in die V. femoralis inferior vorgeschoben. Der arterielle Katheter bestand aus zwei Katheteranteilen unterschiedlicher Durchmesser. Der im Gefäß platzierte Anteil des Katheters hatte einen inneren Durchmesser von 0,28 mm (PP-10). Er wurde mit einem dickeren Polypropylenschlauch (PP-50), der an die Messeinheit angeschlossen wurde, durch Schweißen verbunden. Der arterielle Katheter wurde ebenfalls 3 cm weit nach proximal in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Beide Katheter wurden subkutan über den Rücken zum Nacken der Ratte geführt und über einen kleinen Hautschnitt nach außen geleitet. Nach Verschluss der offenen Schlauchenden wurden die Katheter durch Vernähung mit der Haut, für die Ratte unerreichbar, im Nacken fixiert. Alle Katheter wurden vor dem Verschluss mit Heparin (25 IE Heparin / ml Liquemin[®], Hoffmann - La Roche AG, Grenzach - Whylen, Deutschland) gespült, um einem koagulativen Verschluss vorzubeugen.

2.3.2. Modell der fokalen Gehirnschämie mit Reperfusion

In dieser Studie wurde die Methode der "Unilateralen intraluminalen Okklusion der A cerebri media mit Reperfusion" bei Ratten (Koizumi et al.1986) angewandt. Hierbei wird einseitig ein Monofilament bis in die Arteria cerebri media vorgeschoben. Die Reperfusionsphase wird durch das Zurückziehen des Katheters eingeleitet. Im Folgenden die detaillierte Beschreibung der Methode, welche wir in unseren Versuchsreihen immer rechtsseitig anwendeten:

1) Herstellung des okkludierenden Katheters:

Die Spitze des Fadens (4/0, 1,5 Metrik, Monofilament, Ethilon[®], Ethicon GmbH & Co. KG, Deutschland) wurde mit Silikon (Provil[®], Bayer AG, Deutschland) beschichtet, um den Durchmesser an den distalen 5 mm auf etwa 0,25 mm zu vergrößern. Vor Beginn der Operation ließ man die Silikonbeschichtung mehrere Tage trocknen.

2) Anästhesie und Operation:

Die Ratte wurde mit einer i.p. Injektion von 4% Chloralhydrat (400 mg/kg/KG) narkotisiert. Am Hals wurde ein medianer Längsschnitt gesetzt. Unter dem Mikroskop wurden nach Durchtrennung der Gewebsschichten die Gefäße der rechten Seite des Halses freigelegt. Nach Darstellung der rechten A. carotis communis wurde die rechte A. carotis externa isoliert und ligiert. Die rechte A. carotis interna wurde bis zu dem Karotiskanal dargestellt und die A. pterygopalatina ligiert. Vor Einführung des okkludierenden Katheters wurde die rechte A. carotis communis mit einer 4/0 Naht ligiert und einige mm oberhalb der Ligatur mit einem kleinen Längsschnitt eröffnet. Nun wurde der Katheter vorsichtig durch die A. carotis communis bis in die A. carotis interna vorgeschoben bis ein Widerstand spürbar war (etwa 17 mm von der Karotisbifurkation aus). Der Faden wurde durch eine feste Ligatur an der A. carotis communis fixiert und 90 min nach Verschluss der Arterie vorsichtig entfernt. Die

Okklusion der Arterie wurde mittels eines Doppler - Laser - Verfahrens zur Blutflussmessung kontrolliert. Während der Operation wurde die rektale Temperatur überwacht und mit Hilfe einer Heizdecke zwischen 37° C und 37,5° C gehalten.

2.4. Allgemeine Methoden

2.4.1. Intraarterielle Blutdruckmessung

Die Registrierung der hämodynamischen Daten und deren Auswertung wurde mit Hilfe eines Computers und der zu diesem Zweck entwickelten Software durchgeführt. Das System bestand aus einem elektromechanischen Druckaufnehmer (DTX/Plus, Spectramed Inc., Oxnard, Kalifornien, U.S.A.) verbunden mit einem Druckcomputer (Gould Inc., Valley View, Ohio, U.S.A.) und Schreiber (Gould Series 2400 Polygraph, Gould Inc.). Die Herzfrequenz und der systolische Blutdruck wurden als Analogsignale vom Druckcomputer dargestellt. Diese Geräte wurden durch ein Computersystem ergänzt, das mittels eines Analog - Digitalwandlers die digitale Speicherung und Verarbeitung der erhobenen Messdaten ermöglichte. Dieses System bietet außer einer hohen Genauigkeit bei der Aufnahme auch zahlreiche Möglichkeiten bei der Auswertung der Messdaten, z. B. die Bestimmung der Fläche unter der Kurve.

Vor dem Anschluss der Versuchstiere an das Messgerät musste dieses mit Hilfe eines Quecksilbermanometers in einem Bereich von 0-200 mmHg geeicht und die Herzfrequenz auf Null eingestellt werden. Der arterielle Katheter wurde über einen mit NaCl - Heparinlösung gefüllten Verbindungsschlauch (40 cm, PP-40) an den Druckaufnehmer angeschlossen. Das Experiment begann, sobald sich das Tier beruhigt und sich die beiden Messparameter auf annähernd konstante Werte eingependelt hatten.

In ausgewählten Versuchen wurden der MAP und die Herzfrequenz über die gesamte Versuchsdauer aufgezeichnet.

2.4.2 Bestimmung der aufgenommenen Trinkmenge

Die von den Tieren aufgenommene Trinkmenge wurde mit Hilfe von Trinkgefäßen bestimmt. Diese bestanden aus einem kleinen Metallbecher, der an einem Haken am Käfigrand befestigt wurde. Die Trinkgefäße wurden kurz vor Beginn der Versuche mit Leitungswasser gefüllt und deren Gewicht bestimmt. Die Trinkgefäße wurden kurz nach der i.c.v. - Injektion von Ang II zu den Tieren in die Käfige gehängt und dort für 20 min belassen. Danach wurden die Gefäße erneut gewogen und die Differenz zum Ausgangswert in ml bestimmt.

2.4.3 Quantifizierung des neurologischen Defizits

Die neurologische Untersuchung wurde einmal täglich einen Tag vor bis sieben Tage nach der Durchführung der fokalen Ischämie durchgeführt. Die Untersuchung wurde durch einen

neutralen Beobachter vorgenommen, der kein Wissen über die jeweilige medikamentöse Behandlung der zu untersuchenden Ratte besaß. Insgesamt wurden zwei verschiedene Untersuchungssysteme verwendet, um die Schwere der neurologischen Ausfälle einteilen zu können: Bei den ersten Versuchsreihen wurde die Methode von Bederson et al. (1986) angewendet. Bei den letzten Versuchsreihen wurde aus Interesse an einer detaillierteren Untersuchung die Methode von Garcia et al. (1995) angewendet.

2.4.4 Evaluierung des neurologischen Defizits nach Bederson et al. (1986)

Eine Gradeinteilung von 0 bis 3 wurde angewandt, um die Effekte der rechtsseitigen zerebralen Okklusion zu beurteilen. Die Tests wurden nacheinander durchgeführt. Die zu untersuchende Ratte wurde 50 cm über dem Tisch am Schwanz in die Höhe gehalten, um die Flexion der Vordergliedmaße zu beurteilen. Ratten mit einem konsistenten rechtsseitigen zerebralen Infarkt beugten die linke Vordergliedmaße (kontralaterale Extremität in Bezug auf die Hemisphäre des Infarktes). Ratten mit jedwedem Grad der Flexion der linken Vordergliedmaße und keiner anderen Pathologie wurden Grad 1 zugeteilt.

Weiter wurde die Ratte auf ein großes, weiches, mit Plastik beschichtetes Papier gesetzt, das mit den Krallen fest ergriffen werden konnte. Während die Ratte am Schwanz festgehalten wurde, wurde von lateral unterhalb der Schulter leichter Druck ausgeübt, bis die Vordergliedmaßen dem Druck nachgaben und mehrere cm auf die Seite rutschten. Gesunde oder kaum beeinträchtigte Ratten resistierten gegen den Druck, rutschten aber gleichmäßig in beide Richtungen. Ratten, welche eine Flexion der linken Vordergliedmaße und eine verminderte Resistenz auf lateralen Druck in Richtung der paretischen linken Seite aber keine weitere Pathologie aufwiesen, wurden Grad 2 zugeteilt.

Nun wurde die Ratte auf den Boden gesetzt um den Bewegungsablauf zu beobachten. Ratten, welche sich zusätzlich zur Flexion der linken Vordergliedmasse und verminderten Resistenz auf seitlichen Druck beständig in Richtung der paretischen linken Seite im Kreis liefen, wurden Grad 3 zugeteilt.

Tabelle 1. Evaluierung des neurologischen Defizits nach Bederson et al. (1986). Der ischämische Schlaganfall wurde rechts durchgeführt.

Normal	Grad 0: kein beobachtbares Defizit
Mäßig	Grad 1: Flexion der linken oberen Extremität
Schwer	Grad 2: verminderte Resistenz auf seitlichen Stoß in Richtung der linken Seite sowie Flexion der linken oberen Extremität Grad 3: Verhalten wie bei Grad 2 und Laufen im Kreis in Richtung der paretischen linken Seite

2.4.5 Evaluierung des neurologischen Defizits nach Garcia et al. (1995)

Die Gesamtpunktzahl zur Beurteilung der Effekte der rechtsseitigen zerebralen Okklusion entsteht durch Addition der Punkte, welche das betreffende Tier in den sechs Tests erhalten hat. Die niedrigste zu erreichende Gesamtpunktzahl, die schwerste neurologische Beeinträchtigung, ist 3 Punkte. Die höchste zu erreichende Gesamtpunktzahl, der Normalzustand, beträgt 18 Punkte.

1) Spontane Aktivität

Das Tier wird in seinem Käfig, nach Abnahme des Deckels, 5 min lang beobachtet. Die Aktivität der Ratte wird nach der Fähigkeit, alle vier Wände des Käfigs zu erreichen, beurteilt. Folgende Punkteeinteilung wurde vorgenommen: 3 Punkte, wenn sich die Ratte umherbewegt, die Umgebung untersucht, und mindestens drei Wände des Käfigs erreicht; 2 Punkte, wenn sich die leicht betroffene Ratte im Käfig bewegt, aber nicht alle Käfigseiten erreicht, auch wenn sie eventuell wenigstens einen oberen Rand des Käfigs erreichen könnte; 1 Punkt, wenn es sich um eine schwer betroffene Ratte handelt, die sich kaum bewegt; 0 Punkte, wenn die Ratte sich überhaupt nicht bewegt.

2) Symmetrie in den Bewegungen aller vier Gliedmaßen

Zur Untersuchung der Bewegungssymmetrie der Gliedmaßen wird die Ratte an ihrem Schwanz in die Luft gehoben. Die Einteilung sah folgendermaßen aus: 3 Punkte, wenn alle vier Gliedmaßen gleichmäßig ausgestreckt werden; 2 Punkte, wenn die Gliedmaßen der kontralateralen linken Seite weniger oder langsamer als die rechtsseitigen Gliedmaßen bewegt werden; 1 Punkt, wenn die Gliedmaßen der linken Seite sich minimal bewegen; 0 Punkte, wenn sich die linke Vorderpfote überhaupt nicht bewegt.

3) Ausstrecken der Vorderpfoten

Die Ratte wird an einer Kante des Tisches positioniert, an ihrem Schwanz hochgehoben und beobachtet, wie sie auf ihren Vorderpfoten gehen kann. Es wird auf die Symmetrie beim Ausstrecken der Vorderpfoten beim Erreichen der Tischkante geachtet. Folgende Abstufungen wurden unterschieden: 3 Punkte, wenn beide Vorderpfoten ausgestreckt werden und der Gang symmetrisch ist; 2 Punkte, wenn die linke Vorderpfote im Vergleich zur rechten weniger ausgestreckt wird und ein ungleiches Gangbild vorliegt; 1 Punkt, wenn die linke Vorderpfote sich minimal bewegt; 0 Punkte, wenn die linke Vorderpfote sich überhaupt nicht bewegt.

4) Klettern

Die Ratte wird an einem schräg positionierten Käfiggitter platziert. Normalerweise benutzt sie alle vier Gliedmaßen, um das Gitter hochzuklettern. Wenn man versucht die Ratte an ihrem Schwanz von dem Gitter wegzuziehen, lässt sich die Kraft des Tieres einstufen. Folgende Punkteinteilung wurde vorgenommen: 3 Punkte, wenn die Ratte ohne Schwierigkeiten die Drahtwand hoch klettert und sich fest an diese anklammert; 2 Punkte, wenn die linke Seite beim Klettern weniger häufig und weniger stark eingesetzt wird; 1 Punkt, wenn die Ratte nicht klettern kann oder sich in kreisenden Bewegungen fortbewegt, anstatt zu klettern.

5) Propriozeption des Körpers

Die Ratte wird mit einem stumpfen Stöckchen auf beiden Seiten des Körpers berührt und ihre Reaktion auf diesen Stimulus beobachtet. Den verschiedenen Graden wurden Punkte zugeordnet: 3 Punkte, wenn die Ratte auf den Stimulus beidseits gleich mit einer Kopfbewegung reagiert; 2 Punkte, wenn die Ratte links nur sehr langsam auf den Stimulus reagiert; 1 Punkt, wenn die Ratte nicht auf den Stimulus an der linken Seite reagiert.

6) Reaktion auf Berührung der Schnurrhaare

Mit einem stumpfen Stöckchen werden von der Rückseite des Tieres her (um Kontakt mit dem visuellen Gesichtsfeld zu vermeiden) die Schnurrhaare auf der jeweiligen Seite berührt. Folgende Punkteinteilung wurde vorgenommen: 3 Punkte, wenn die Ratte beidseitig gleich mit einer Kopfbewegung auf den Reiz reagiert; 2 Punkte, wenn die Ratte auf der linken Körperseite verlangsamt auf den Stimulus reagiert; 1 Punkt, wenn die Ratte nicht auf den Stimulus an der linken Seite reagiert.

Tab. 2: Neurologische Gradeinteilung nach Garcia et al. 1995. Der ischämische Schlaganfall wurde rechts durchgeführt.

Test	Score			
	0	1	2	3
Spontane Aktivität (im Käfig, 5 min)	Keine Bewegung	Bewegt sich kaum	Bewegt sich, aber erreicht weniger als 3 Käfigwände	Bewegt sich, und erreicht mindestens 3 Käfigwände
Symmetrie der Bewegungen (4 Gliedmaßen)	Linke Seite: keine Bewegung	Linke Seite: schwache Bewegung	Linke Seite: langsame Bewegung	Beide Seiten: symmetrische Bewegung
Symmetrie der Vordergliedmaßen (Ausstrecken während Haltens am Schwanz)	Linke Seite: keine Bewegung, kein Ausstrecken	Linke Seite: leichtes Ausstrecken	Linke Seite: bewegt sich, wird aber weniger weit als die rechte Seite ausgestreckt	Symmetrisches Ausstrecken beider Extremitäten
Hochklettern einer Wand eines Käfiggitters	entfällt	Versagt zu klettern	Die linke Seite ist schwächer als die rechte	Normales Klettern
Reaktion auf Berührung an beiden Seiten des Rumpfes	entfällt	Keine Reaktion der linken Seite	Schwache Reaktion der linken Seite	Symmetrische Reaktion beider Seiten
Reaktion auf Berührung der Schnurrhaare	entfällt	Keine Reaktion der linken Seite	Schwache Reaktion der linken Seite	Symmetrische Reaktion beider Seiten

2.4.6. Bearbeitung der Gehirne

Nach der neurologischen Evaluierung wurden die Ratten in tiefer Chloralhydratnarkose mit 4% igem Paraformaldehyd (in Phosphat - Puffer) intrakardial perfundiert. Anschließend wurden die Gehirne 24 h in der gleichen 4% igen Paraformaldehydlösung fixiert und für weitere 72 h in 30% iger Phosphat - gepufferten Saccharoselösung entwässert. Die tiefgefrorenen Gehirne wurden im Kryostat in 50 µm dicke koronare Scheiben geschnitten. Diese wurden immunzytochemisch gefärbt, und die Immunreaktivität wurde mittels der ABC

Methode sichtbar gemacht. Der hierzu verwendete Vectastain ABC Kit wurde von Biologo, Kiel, Deutschland, bezogen.

Immunzytochemische Färbung von c - Fos und c - Jun Proteinen:

Die Gehirnschnitte wurden zuerst 48 h, bei 4° C in verdünnten Antikörperlösungen inkubiert (anti - c - Fos: 1:20 000; anti - c - Jun: 1:1000) und danach 2 x 15 min mit PBST (PBS, 0,2% Triton®X-100 enthaltend) gewaschen. Dann wurden die Gehirnschnitte mit Vectastain® verdünntem, biotiniertem Antikörper (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.) bei 37° C, 45 min lang inkubiert und anschließend 2 x 15 min mit PBST gespült. Die Gehirnschnitte wurden mit Vectastain® ABC Reagens (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.) bei 37° C, 45 min lang inkubiert und daraufhin jeweils während 10 min mit PBST und PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte in Diaminobenzidin (DAB, 0,7 mg/ml) und Wasserstoffperoxyd (H₂O₂, 2,0 mg/ml) entwickelt (DAB Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma, U.S.A.). Wenn die Farbentwicklung optimal war (braunes Signal), wurde die Farbreaktion durch Inkubation der Zellen in destilliertem Wasser gestoppt.

Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass die Immunospezifität der Antikörper gegen von c - Fos und c - Jun sehr hoch ist.

2.4.7 Messung des Infarkt Volumens

Die frontalen Schnitte der 14 Gehirnareale wurden mit Kresylviolett gefärbt und das Infarktvolumen wurde durch Multiplizieren der Summe der Infarktfläche mit der Distanz zwischen den Schnitten ermittelt (Leica Qwin Image Analysis System). Die Volumina der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären wurden gemessen und die Differenz zwischen beiden Werten ergab das Ödemvolumen. Unter Zuhilfenahme der Formel nach Swanson ließ sich der Prozentsatz des vom Infarkt betroffenen Areals angeben (Swanson et al. 1990).

2.4.8 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse der Messreihen wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung des MAP erfolgte über eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (MANOVA), gefolgt von einem post - hoc Bonferroni Test. Der Effekt einer chronischen Vorbehandlung der Ratten mit Irbesartan, PD 123177 oder Vehikel auf den CBF, den neurologischen Status, die Infarktgröße und die Expression der Transkriptionsfaktoren erfolgte über eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Die paarweisen Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen erfolgten über einen post - hoc Bonferroni Test. Der neurologische Status nach der einmaligen Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode wurde mittels des Student - t - Tests auf die Signifikanz überprüft.

Die Auswirkungen der chronischen Vorbehandlung mit Irbesartan und Vehikel auf den neurologischen Status wurden mittels der MANOVA statistisch ausgewertet, gefolgt von einem post - hoc Bonferroni Test.

Die Trinkantwort bei chronischer Vorbehandlung mit Irbesartan und Vehikel auf i.c.v. verabreichtes Ang II wurde mittels der ANOVA untersucht. Die paarweisen Vergleiche erfolgten über einen post - hoc Bonferroni Test.

Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant akzeptiert.

2.4.9. Protokolle der Experimente

Protokoll 1.1

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan oder PD123177 auf den mittleren arteriellen Blutdruck

Die erste Reihe der Experimente wurde ausgeführt, um herauszufinden, ob die i.c.v. Vorbehandlung mit den AT₁ - und AT₂ - Rezeptorantagonisten Irbesartan und PD123177, über einen Zeitraum von fünf Tagen kardiovaskuläre Wirkungen auslöst.

Die Ratten wurden über osmotische Minipumpen kontinuierlich über fünf Tage hinweg i.c.v. mit Vehikel (Kontrollen, n = 7), Irbesartan (2 nmol/h, n = 7) und PD123177 (1 nmol/h, n = 9) behandelt. Die Dosis wurde so gewählt, dass selektiv und effizient die entsprechenden Rezeptoren im Gehirn gehemmt wurden (Höhle et al. 1995). Drei Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpen wurden die femoralen Katheter (arteriell und venös) gelegt. Am sechsten Tag wurde den Tieren Ang II (25 ng/kg/KG) intravenös injiziert und die Auswirkung auf den MAP aufgezeichnet.

Protokoll 1.2

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan und PD123177 oder deren Kombination auf den neurologischen Status und das Infarktvolumen nach zerebraler Ischämie

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Ratten über osmotische Minipumpen i.c.v. mit Irbesartan (2 nmol/h, n = 17) oder PD 123177 (1 nmol/h, n = 17) oder Irbesartan mit PD123177 (n = 16) oder Vehikel (n = 17) über einen Zeitraum von fünf Tagen behandelt. Am sechsten Tag wurde die A. cerebri media bei allen Ratten für die Dauer von 90 min verschlossen. 24 h nach Beginn der Reperfusion wurde die neurologische Untersuchung vorgenommen. Danach wurden die Ratten in tiefer Chloralhydratnarkose intrakardial perfundiert, die Gehirne isoliert, fixiert und im Kryostat geschnitten. Die Bestimmung des Infarktvolumens und des Ödemvolumens erfolgte wie beschrieben.

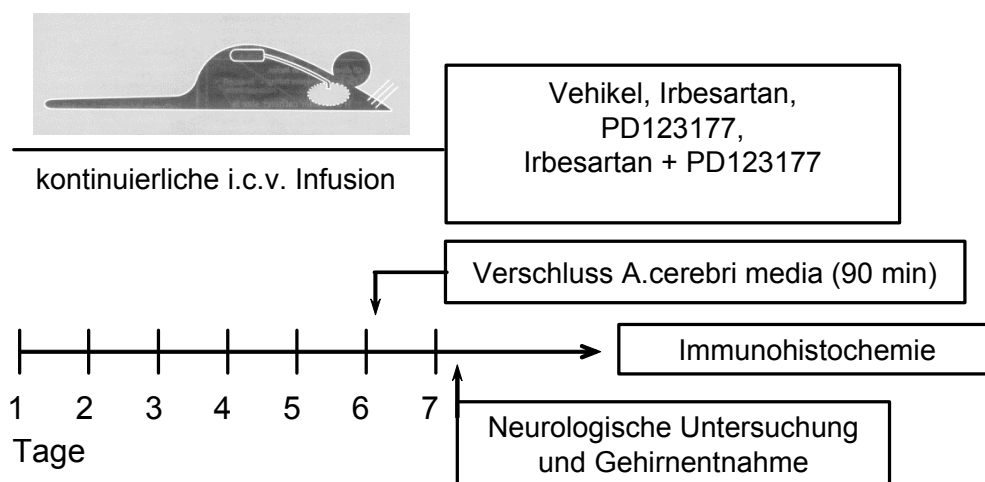


Abb. 1: Schematische Darstellung der Protokolle 1.2 und 1.3 (Fünftägige i.c.v. Vorbehandlung mit Vehikel, Irbesartan und deren Kombination. Am sechsten Tag Durchführung der fokalen Ischämie, am siebten Tag neurologische Untersuchung und Entnahme der Gehirne für die Durchführung der Immunhistochemie).

Protokoll 1.3

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan und PD123177 oder deren Kombination auf die c - Fos - und c - Jun - Expression im frontoparietalen Kortex nach zerebraler Ischämie

Die Gehirnschnitte aus dem Gebiet des Bregmas ($\pm 1,3$ mm) wurden auch zur Untersuchung der Expression von AP - 1 - Transkriptionsfaktoren verwendet.

Protokoll 2

Auswirkung der i.v. Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode auf den neurologischen Status

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob sich eine systemische Behandlung mit AT_1 - Rezeptorantagonisten nach dem ischämischen Insult günstig auf den neurologischen Status auswirkt.

Zwei Tage vor der zerebralen Ischämie wurde ein femoraler venöser Katheter implantiert. Dann wurde eine fokale zerebrale Ischämie induziert, anschließend wurde Irbesartan langsam i.v. (30 mg/kg/KG, n = 11) zu Beginn der Reperusionsperiode verabreicht, i.e. 90 min nach Beginn der zerebralen Ischämie. Die Ratten der Kontrollgruppe wurden mit Vehikel (n = 10) behandelt. Dieser Zeitpunkt stellt den frühestmöglichen Beginn der Therapie eines Patienten mit zerebralem Insult dar. Die neurologische Evaluierung wurde 24 h nach der Behandlung vorgenommen.

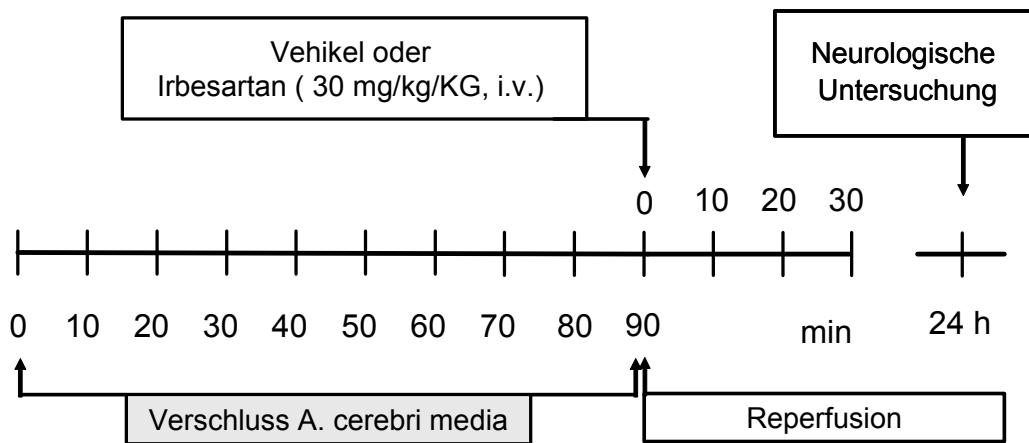


Abb. 2: Darstellung der einmaligen i.v. Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode der fokalen Ischämie auf den neurologischen Status .

Eine i.v. Infusion mit Irbesartan kann zu einem starken Blutdruckabfall führen. Deshalb wurde der MAP mittels eines Katheters gemessen. Beim zweiten Experiment wurde zwei Tage vor der zerebralen Ischämie zusätzlich zu dem venösen, ein arterieller Katheter implantiert. Der MAP wurde vor, während und bis 75 min nach der zerebralen Ischämie registriert. Am Ende der Ischämieperiode wurde Irbesartan (30 mg/kg/KG) oder Vehikel i.v. verabreicht.

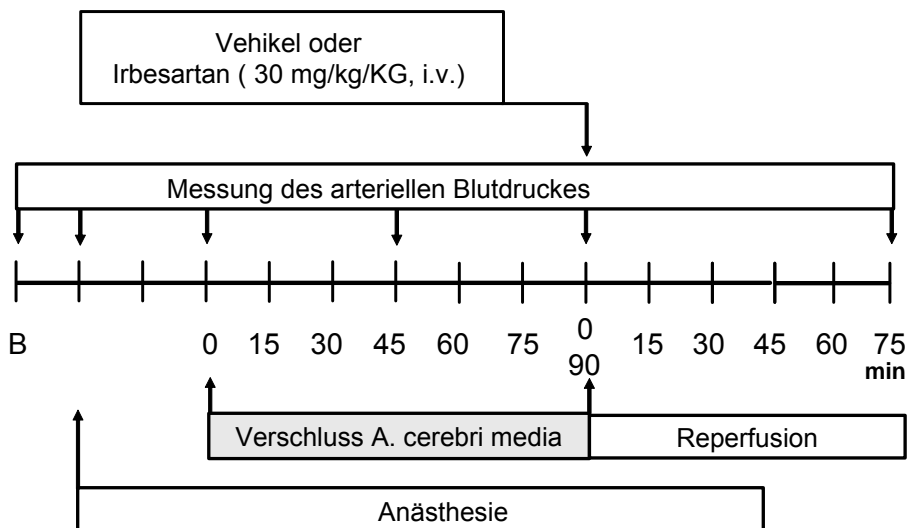


Abbildung 3: Darstellung der Messung des arteriellen Blutdruckes vor, während und nach der Durchführung der fokalen zerebralen Ischämie, hier anhand des Beispiels des später beschriebenen Protokolls 3.

Protokoll 3.1**Auswirkung der chronischen i.v. Vorbehandlung mit Irbesartan auf den neurologischen Status nach zerebraler Ischämie**

Unsere früheren Ergebnisse zeigten, dass eine chronische zerebrale Vorbehandlung mit Irbesartan den neurologischen Status nach fokaler zerebraler Ischämie verbessert. In dieser Versuchsreihe wollten wir der Frage nachgehen, ob eine systemische Vorbehandlung mit Irbesartan sich ebenfalls günstig auf den neurologischen Status auswirkt.

Den Tieren wurde ein femoraler venöser Katheter implantiert. Die Tiere wurden mit Irbesartan (30 mg/kg/KG, n = 11) i.v. über fünf Tage hinweg vorbehandelt, die Ratten der Kontrollgruppe wurden mit Vehikel (n = 10) vorbehandelt. Am sechsten Tag wurde eine zerebrale Ischämie zu dem Zeitpunkt, an dem an den vorherigen Tagen die Behandlung stattfand, herbeigeführt. An den folgenden sieben Tagen wurde jeweils zu diesem Zeitpunkt eine neurologische Evaluierung vorgenommen.

Protokoll 3.2**Untersuchung des Ausmaßes der zerebralen AT₁ - Rezeptorblockade nach i.v. Behandlung mit Irbesartan**

Zu den günstigen Auswirkungen der AT₁ - Rezeptorantagonisten nach Schlaganfall tragen die zentralen und die peripheren Effekte bei. Dabei ist die langandauernde Blockade der AT₁ - Rezeptoren im Gehirn entscheidend. In der letzten Versuchsreihe wurde überprüft, ob eine während fünf Tagen einmal täglich durchgeführte Behandlung eine effektive Hemmung der AT₁ - Rezeptoren bewirkt. Die Effizienz der AT₁ - Rezeptorblockade im Gehirn wurde über die Beeinflussung der durch i.c.v. injiziertes Ang II ausgelösten Trinkantwort getestet.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurde den Tieren ein femoraler venöser und ein i.c.v. Katheter gelegt. Am Tag vor Beginn der i.v. Behandlung wurden den mit Vehikel behandelten Tieren über den i.c.v. Katheter Ang II (20 ng) verabreicht. Anschließend wurde den Tieren über einen Zeitraum von 20 min Wasser angeboten und die Menge des getrunkenen Wassers notiert. An den folgenden fünf Tagen wurden die Tiere einmal täglich i.v. mit Irbesartan (30 mg/kg/KG) behandelt. Den Kontrolltieren wurde Vehikel verabreicht. Am sechsten Tag wurde zum Zeitpunkt der Behandlung nicht Irbesartan i.v., sondern Ang II (20 ng) i.c.v. verabreicht und die aufgenommene Trinkmenge gemessen. Anschließend wurden die Ratten noch einmal i.v mit Irbesartan behandelt. Sechs h nach der i.v. Infusion des AT₁ - Rezeptorantagonisten wurde erneut Ang II (20 ng) i.c.v. verabreicht und die Trinkantwort gemessen.

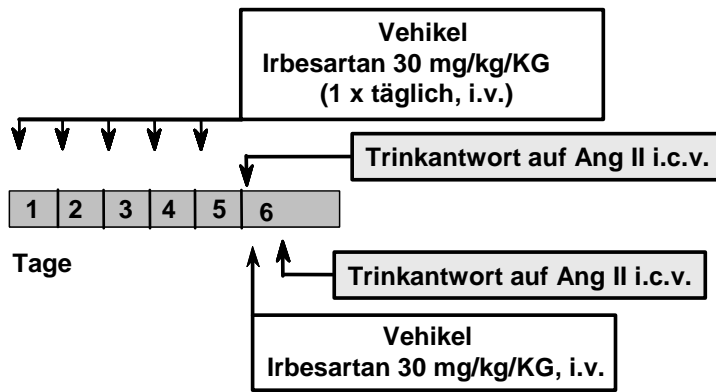


Abb. 4: Darstellung des Trinktests: I.c.v Verabreichung von Ang II, anschliessende Messung der Trinkantwort (nicht dargestellt); chronische einmal täglich durchgeführte i.v. Behandlung mit Irbesartan oder Vehikel; am sechsten Tag i.c.v. Verabreichung von Ang II vor dem Zeitpunkt der i.v. Behandlung, anschließende Messung der Trinkantwort; Durchführung der sechsten i.v. Behandlung mit den jeweiligen Medikamenten und nach sechs Stunden erneute Verabreichung von Ang II mit folgender Messung der Trinkantwort.

3. ERGEBNISSE

Protokoll 1.1

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan oder PD123177 auf den mittleren arteriellen Blutdruck

Die i.c.v. Infusion von Irbesartan oder PD 123177 über einen Zeitraum von fünf Tagen hatte keinen Einfluss auf den basalen MAP. Auch die Blutdruckantwort auf i.v. verabreichtes Ang II (25 ng/kg/KG) wurde durch die Behandlung nicht verändert: Die i.v. Injektion von Ang II löste bei allen drei Gruppen denselben Anstieg des MAPs aus. Dies zeigt, dass bei der gewählten Dosis des Angiotensinrezeptorantagonisten keine Beeinflussung der peripheren Ang II - Rezeptoren stattfindet.

Tab. 3: Effekte einer i.c.v. Vorbehandlung mit Vehikel, Irbesartan und PD123177 über fünf Tage auf den MAP und die kardiovaskuläre Antwort auf i.v. verabreichtes Ang II.

Infusion (i.c.v.)	n	basaler MAP (mmHg)	Ang II (25 mg/kg/KG, i.v.) Δ MAP (mmHg)
Vehikel	7	99 ± 1,9	34 ± 2,2
Irbesartan	7	101,8 ± 2,3	38,7 ± 3,7
PD 123177	9	100 ± 2,6	38 ± 2,9

Die Werte sind als Durchschnitt ± SEM angegeben. Durch n wird die Anzahl der Versuchstiere dargestellt. Der Anstieg des arteriellen Mitteldruckes (Δ MAP) stellt die maximal erreichten Werte (in mmHg) dar, die nach der i.v. Ang II - Infusion erreicht wurden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen gefunden (ANOVA).

Protokoll 1.2

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan und PD123177 oder deren Kombination auf den neurologischen Status und das Infarktvolumen nach zerebraler Ischämie

Die neurologische Untersuchung wurde nach der Methode von Bederson et al. (1986) vorgenommen. 24 h nach der zerebralen Ischämie wiesen die meisten der mit Vehikel, PD 123177 oder mit Irbesartan und PD123177 vorbehandelten Tiere, schwere neurologische Defizite auf (Abb. 5). Die mit Irbesartan vorbehandelten Tiere zeigten deutlich weniger neurologische Defizite als die anderen Gruppen.

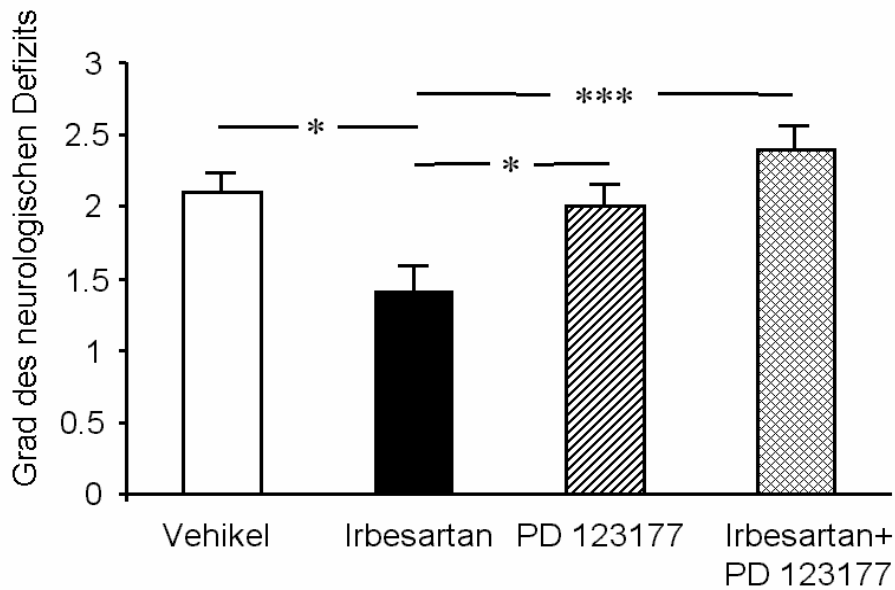


Abb. 5: Effekte einer fünftägigen i.c.v. - Infusion mit Irbesartan, PD123177, deren Kombination und Vehikel auf den Schweregrad der neurologischen Defizite nach fokaler, zerebraler Ischämie. Der neurologische Status wurde nach der Methode von Bederson et al (1986) ermittelt. Daraus ergaben sich folgende Werte: Vehikel ($2,1 \pm 0,14$), Irbesartan ($1,4 \pm 0,18$), PD123177 ($2,0 \pm 0,15$) und die Kombination von PD123177 und Irbesartan ($2,4 \pm 0,15$). Die mit Irbesartan behandelte Gruppe wies deutlich geringere neurologische Defizite als die anderen Versuchsgruppen auf. $p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$ berechnet mit ANOVA, gefolgt vom post - hoc Bonferroni Test.

Das Infarktvolume war bei den mit Irbesartan behandelten Ratten deutlich kleiner als bei den anderen Gruppen. Das Infarktvolume der mit der Kombination aus Irbesartan und PD123177 behandelten Gruppe unterschied sich nicht von der mit Vehikel oder PD123177 behandelten Gruppe.

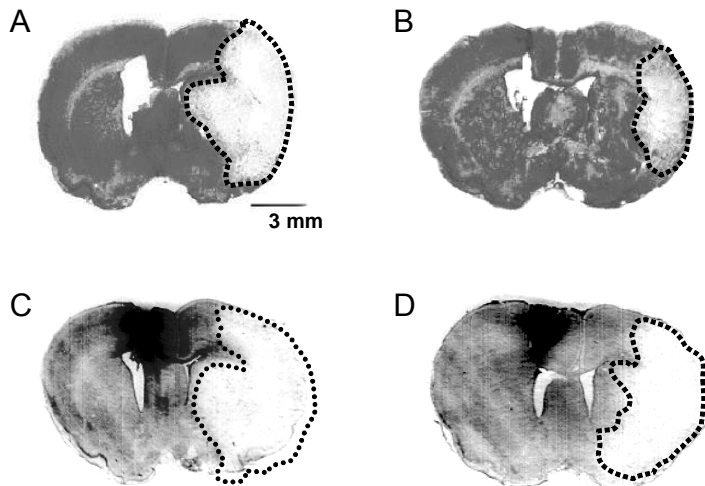


Abb. 6: Darstellung des Infarkt volumens nach fünftägiger Vorbehandlung mit Vehikel, Irbesartan, PD123177 und deren Kombination, mit folgender fokaler zerebraler Ischämie. Die Gehirne wurden nach der neurologischen Gradeinteilung entnommen und untersucht. A: Vehikel, B: Irbesartan, C: PD123177, D: PD123177 und Irbesartan. Das Infarkt areal wird jeweils durch eine gepunktete Linie abgegrenzt.

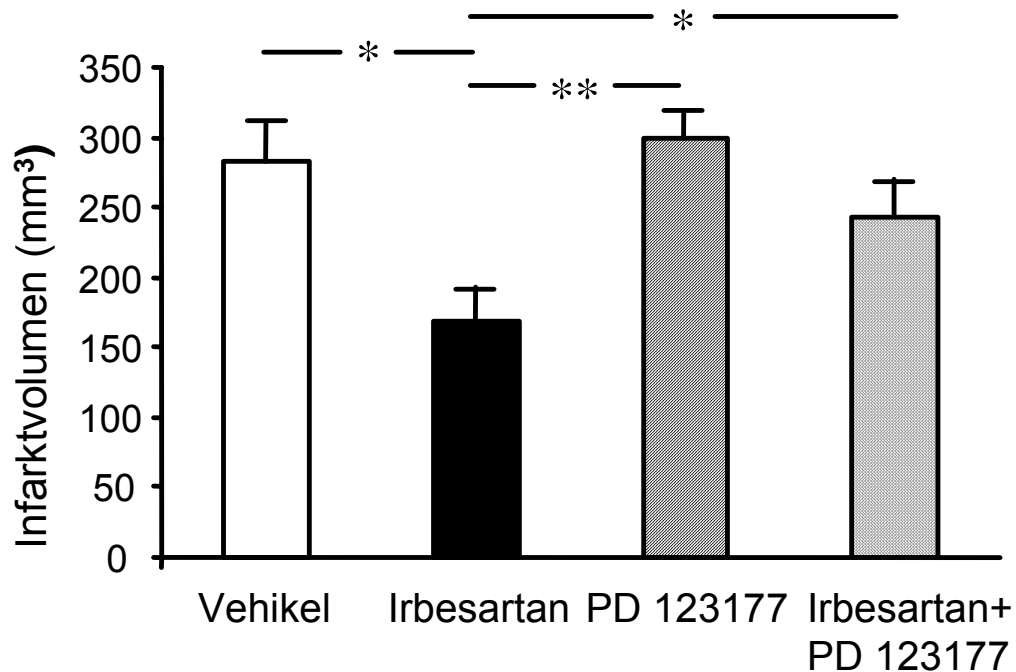


Abb. 7: Effekte einer fünftägigen i.c.v. Infusion mit Vehikel, Irbesartan, PD123177 und deren Kombination auf das Infarkt volumen nach einer fokalen zerebralen Ischämie (Okklusion der A. cerebri media während 90 min). Die Werte stellen den Durchschnitt \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, berechnet mit der ANOVA, gefolgt vom Bonferroni Test.

Protokoll 1.3

Auswirkung der i.c.v. Vorbehandlung mit Irbesartan und PD123177 oder deren Kombination auf die c - Fos - und c - Jun - Expression im frontoparietalen Kortex nach zerebraler Ischämie

Die Unterschiede der c - Fos - und c - Jun - Expression unter den einzelnen experimentellen Gruppen sind hoch signifikant (c - Fos: $F_{3,17} = 23,973$, $P < 0,001$; c - Jun: $F_{3,14} = 23,425$, $P < 0,0001$). Die Mehrheit der mit Vehikel behandelten Tiere zeigten nach der zerebralen Ischämie schwere neurologische Defizite (Punktzahl 2 und 3, Methode nach Bedersen, 1986). Diese Ratten wiesen eine hohe Anzahl an c - Fos und c - Jun immunpositiven Neuronen im frontoparietalen Kortex am Rand des Infarktes auf. Die Expression von c - Jun war höher als die von c - Fos. Die Ratten, die mit Irbesartan behandelt wurden, zeigten einen geringeren Anstieg der c - Fos - und c - Jun - Expression im frontoparietalen Kortex im Vergleich zu den Ratten der anderen Versuchsgruppen.

Tab. 4: Auswirkung einer i.c.v. Vorbehandlung mit Vehikel, Irbesartan und PD123177 sowie deren Kombination auf die Anzahl der c - Fos und c - Jun positiven Zellen im frontoparietalen Kortex am Rande des Ischämiegebietes.

	Vehikel	Irbesartan	PD123177	Irbesartan+PD123177
c - Fos	36 ± 1,8 n = 6	19 ± 1,2*** n = 5	33 ± 1,0 n = 5	37 ± 2,3 n = 5
c - Jun	42 ± 1,1 n = 5	26 ± 1,5*** n = 4	44 ± 2,3 n = 4	42 ± 1,9 n = 5

Die Werte sind als Durchschnitt ± SEM ausgedrückt. Die Daten repräsentieren die Anzahl der gefärbten Neurone pro Areal (375 x 500 µm). Die Ratten, die mit Irbesartan behandelt wurden, zeigten einen geringeren Anstieg der c - Fos - und c - Jun - Expression als die der anderen experimentellen Gruppen. *** $P < 0,001$ im Vergleich zu allen Gruppen, berechnet nach der ANOVA, gefolgt vom Bonferroni Test.

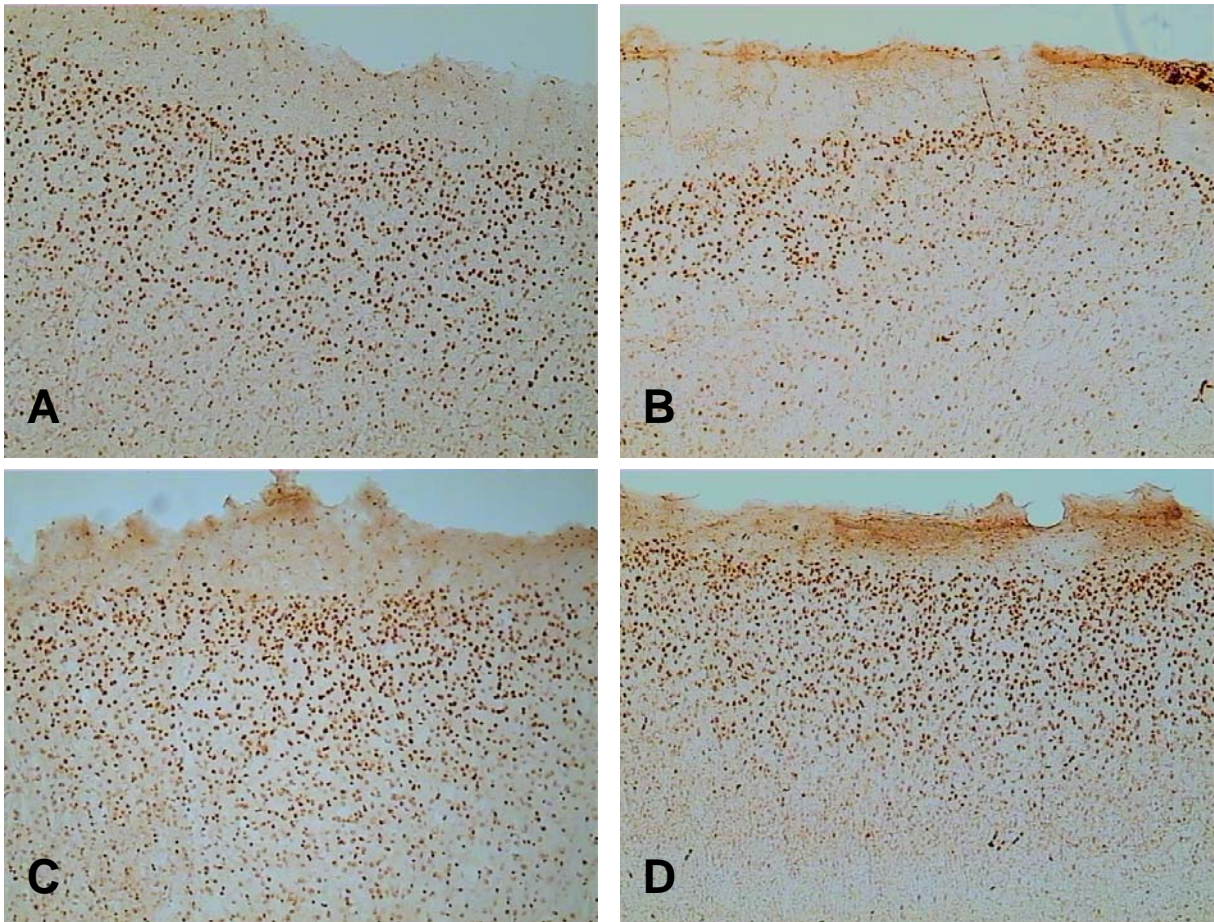


Abb. 8: c - Jun Expression im frontoparietalen Kortex der Ratte nach einer fokalen zerebralen Ischämie. Die Tiere wurden mittels osmotischer Minipumpen über einen Zeitraum von sieben Tagen behandelt mit: Vehikel (A), selektivem AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan (B), selektivem AT₂ - Rezeptorantagonisten PD 123177 (C) oder der Kombination beider Antagonisten (D). Der Schlaganfall wurde am Tag sechs gesetzt (Verschluss der A. cerebri media während 90 min). Irbesartan reduzierte deutlich die Zahl der c - Jun positiven Zellen im frontoparietalen Kortex 24 h nach der fokalen Ischämie.

Protokoll 2

Auswirkung der i.v. Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode auf den neurologischen Status

Irbesartan oder Vehikel wurden jeweils zu Beginn der Reperfusionperiode langsam i.v. injiziert. Die neurologische Untersuchung (Bederson et al.1986) wurde 24 h nach dem ischämischen Insult durchgeführt. Beide Gruppen der Ratten wiesen das gleiche neurologische Defizit auf: Vehikel ($2,6 \pm 0,22$); Irbesartan ($2,45 \pm 0,24$). Siehe Abb. 9.

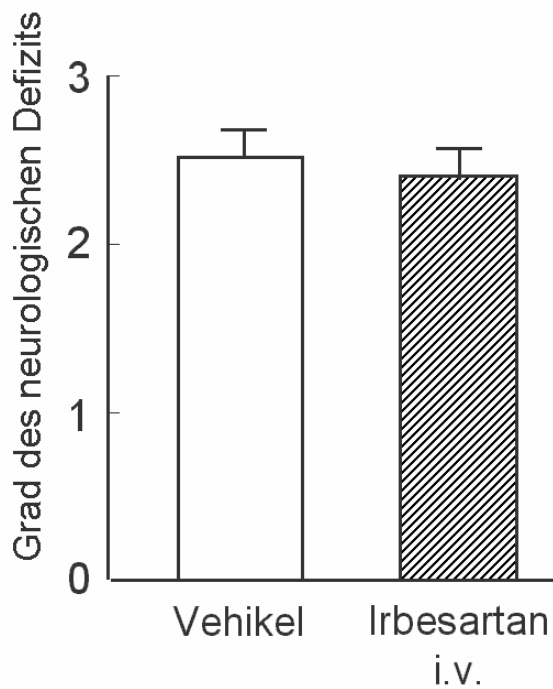


Abb. 9: Auswirkung der i.v. Behandlung mit Irbesartan und Vehikel am Ende der Ischämieperiode auf den neurologischen Status. Der neurologische Status wurde 24 h nach der Okklusion der A. cerebri media ermittelt (Bederson et al. 1986). Die Daten sind als Durchschnitt \pm SEM dargestellt. Die i.v. Behandlung mit Irbesartan oder Vehikel am Ende der Ischämieperiode ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Student - t - Test).

Die i.v. Infusion von Irbesartan verbesserte den neurologischen Status nicht. Eine starke Blutdrucksenkung könnte die Ursache sein. Deshalb wurde der MAP vor, während und nach der zerebralen Ischämie kontinuierlich registriert. Während der Infusion von Irbesartan sank der MAP sehr stark und blieb für mindestens 75 min erniedrigt, obwohl alle Ratten das Bewusstsein wiedererlangt hatten (Abb. 10).

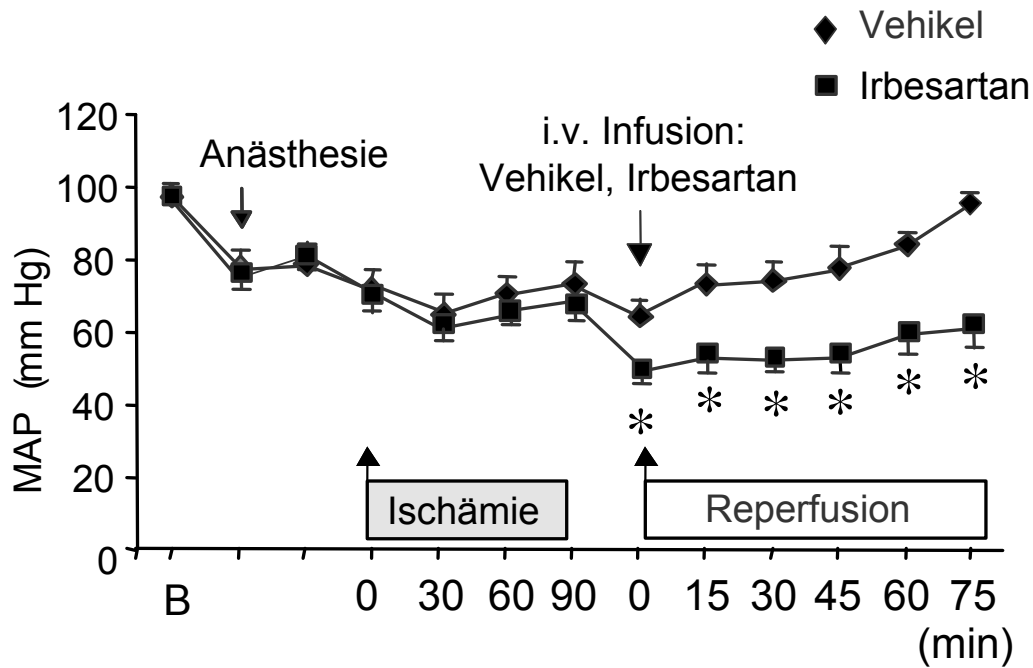


Abb. 10: MAP vor, während und nach Verschluss der Arteria cerebri media mit nachfolgender Reperfusion. B: Basal, MAP vor Einleitung der Anästhesie. Die Ratten wurden am Ende der Ischämieperiode i.v. mit Irbesartan (30 mg/kg/KG) oder Vehikel behandelt. Die mit Irbesartan behandelten Tiere zeigten eine starke Senkung des MAP. Die Ergebnisse sind als Durchschnitt \pm SEM ausgedrückt. Statistischer Vergleich zur Vehikelgruppe: *P < 0,05, berechnet mittels multifaktorieller Varianzanalyse. Paarweise Vergleiche wurden durch den post - hoc Bonferroni Test ermittelt.

Protokoll 3.1

Auswirkung der chronischen i.v. Vorbehandlung mit Irbesartan auf den neurologischen Status nach zerebraler Ischämie

In vorherigen Versuchen zeigten wir, dass die zentrale Behandlung mit Irbesartan günstige Effekte nach Schlaganfall aufweist. In dieser Versuchsreihe wurden Ratten systemisch mit Irbesartan vorbehandelt. Die neurologische Untersuchung wurde in dieser Versuchsanordnung nach der Methode von Garcia et al. (1995) durchgeführt. Der neurologische Status bei den mit Irbesartan vorbehandelten Tieren unterschied sich nicht von dem der mit Vehikel behandelten Tiere (Abb. 11).

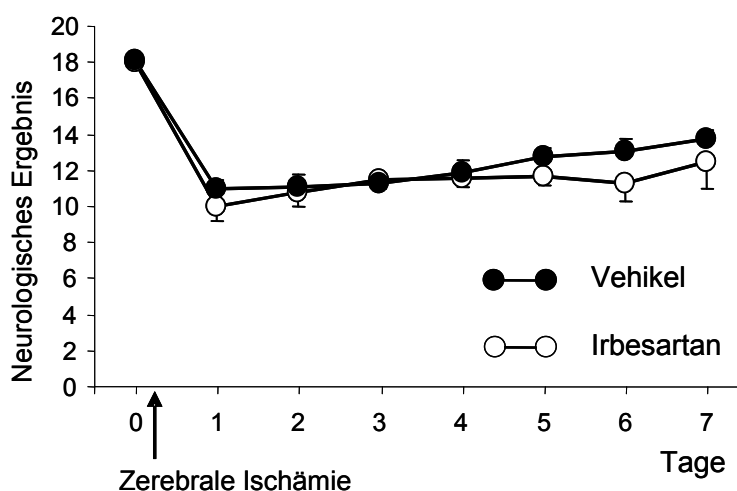


Abb. 11: Auswirkung der fünftägigen systemischen Vorbehandlung mit Irbesartan auf den neurologischen Status (Methode von Garcia et al., 1995). Es lässt sich im Vergleich zur Vehikelgruppe kein signifikanter Unterschied erkennen. Die Werte sind als Durchschnitt \pm SEM ausgedrückt.

Protokoll 3.2

Untersuchung des Ausmaßes der zerebralen AT₁ - Rezeptorblockade nach i.v. Behandlung mit Irbesartan

Im Gegenteil zur chronischen i.c.v. Vorbehandlung hat eine systemische Vorbehandlung mit Irbesartan keinen Einfluss auf den neurologischen Status. Irbesartan penetriert die Bluthirnschranke und eine effiziente Blockade der zerebralen AT₁ - Rezeptoren für mindestens drei h bei einer einmaligen i.v. Kurzinfusion mit Irbesartan wurde von Culman et al. (1999) beschrieben. Die Vermutung lag nahe, dass die Blockade durch die einmalige tägliche Behandlung mit Irbesartan nicht über den ganzen Zeitraum von 24 h aufrecht erhalten wurde. Ziel dieser Versuchsreihe war, zu klären, wie effektiv die zentralen AT₁ - Rezeptoren bei dem ausgewählten Therapieschema gehemmt sind. Die Ratten wurden über sechs Tage mit Irbesartan sowie mit Vehikel einmal täglich systemisch behandelt. Die Trinkantwort auf i.c.v. verabreichtes Ang II wurde 1), vor Beginn der medikamentösen Behandlung; 2), am sechsten Tag, 24 h nach der letzten Behandlung (d.h. vor der sechsten Behandlung mit Irbesartan; sowie 3), vier h nach der sechsten Behandlung mit Irbesartan gemessen. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der mit Irbesartan behandelten und der mit Vehikel behandelten Gruppe festgestellt werden. Dies bedeutet, dass durch einmal täglich systemisch verabreichtes Irbesartan (30 mg/kg/KG) keine vollständige und lang dauernde Blockade der zentralen AT₁ - Rezeptoren erzielt werden kann.

Tab. 5: Die Trinkantwort auf i.c.v. Ang II nach chronischer systemischer Behandlung mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan (30 mg/kg/KG i.v.)

	Tag 0	Tag 6 (24 h nach 5. Behandlung)	Tag 6 (4 h nach 6. Behandlung)
Gruppe			
Vehikel	5,9 ± 0,6	4,21 ± 0,5	5,76 ± 0,9
Irbesartan	6,03 ± 0,41	4,38 ± 0,51	4,37 ± 0,61

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Irbesartan behandelten Gruppe und der mit Vehikel behandelten Gruppe (die statistischen Vergleiche wurden mittels der ANOVA durchgeführt, die paarweisen Vergleiche wurden mittel eines post - hoc Bonferroni Tests durchgeführt).

4. DISKUSSION

Über die Mechanismen der neuronalen Schädigung bei der zerebralen Ischämie des Menschen gibt es zahlreiche Untersuchungen. Die meisten Patienten, die eine zerebrale Ischämie erleiden, sterben entweder schnell oder überleben über einen relativ langen Zeitraum hinweg, der von Monaten bis hin zu Jahren reichen kann. Guglielmo et al. (1998) zeigten, dass die an Tier - und Zellkulturmodellen erforschten Mechanismen, die zum neuronalen Tod führen, denen des Menschen weitgehend ähnlich sind. Zwei weitverbreitete Modelle der zerebralen Ischämie am Tier stellen das Modell der transienten globalen Hirnischämie und das der fokalen zerebralen Ischämie dar. Bei dem erstgenannten Modell wird die ganze Blutversorgung des Gehirns zeitweise unterbrochen, bei dem zweitgenannten wird die Arteria cerebri media einseitig verschlossen, wodurch ein ischämischer Schaden des zerebralen Kortex und des Striatum derselben Hemisphäre induziert wird (Mc Auley, 1995).

Die Wahl der A. cerebri media basiert auf der Tatsache, dass diese Arterie im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls beim Menschen die am häufigsten betroffene Arterie ist. Das fokale Modell der zerebralen Ischämie beinhaltet entweder eine permanente oder eine vorübergehende Okklusion der A. cerebri media. Die vorübergehende Okklusion der A. cerebri media wird jedoch allgemein als das Modell, welches dem ischämischen Schlaganfall des Menschen am ähnlichsten ist, akzeptiert. Dieses Modell weist eine hohe klinische Relevanz auf, da bei Patienten mit zerebraler Ischämie die Reperfusion spontan durch Auflösung des verschließenden Embolus oder durch eine klinische Intervention erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil der fokalen Ischämie gegenüber der globalen Ischämie ist, dass die andere Gehirnhälfte zur Kontrolle des Infarktes herangezogen werden kann.

In dieser Arbeit wurde, aufgrund der genannten Vorteile, das Modell der vorübergehenden Okklusion der A. cerebri media angewandt, die Versuche wurden an Ratten durchgeführt. Hier wurde von der weitgehenden Übereinstimmung der zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie mit höheren Spezies profitiert.

Protokoll 1

Unsere Gruppe konnte in früheren Versuchen bereits eine durch eine i.c.v. AT₁ - Rezeptorblockade hervorgerufene Verbesserung des neurologischen Status und eine Reduktion der c - Fos und c - Jun Induktion nach zerebraler Ischämie nachweisen (Dai et al. 1999). Ischämische Verletzungen regulieren die Anzahl der AT₁ - Rezeptoren im ventralen Kortex der ipsilateralen Seite des Infarkts herunter und verstärken die Expression des AT₂ -

Rezeptors auf der ipsilateralen sowie der kontralateralen Seite des Infarkts (Makino et al. 1996; Kagiya et al. 2003). Um die Bedeutung des zerebralen AT_2 - Rezeptors bei der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie zu untersuchen, führten wir folgende Versuche durch: Die AT_1 - und AT_2 - Rezeptorantagonisten Irbesartan und PD 123177 wurden getrennt oder in Kombination i.c.v. über einen fünftägigen Zeitraum vor der Durchführung einer zerebralen Ischämie verabreicht.

Wir orientierten uns bei der Dosierung der Antagonisten an den Daten von Höhle et al. (1995), welche zeigen, dass Irbesartan und PD123177 in der Dosierung von 2 nmol/h (Irbesartan) und 1 nmol/h (PD123177) eine selektive und vollständige Blockade des jeweiligen zerebralen AT_1 - und AT_2 - Rezeptors gewährleisten. Um die Bedeutung der zentralen AT_2 - Rezeptoren zu untersuchen, erfolgte die Verabreichung der Medikamente i.c.v.. Um eine effiziente Blockade der Subtypen von Ang II - Rezeptoren zu erreichen, erfolgte die i.c.v. Verabreichung über osmotische Pumpen, welche fünf Tage vor Durchführung der zerebralen Ischämie implantiert wurden.

In unseren Untersuchungen hatte die i.c.v. Langzeitinfusion der Antagonisten weder Einfluss auf den basalen MAP, noch verringerte sich bei der i.v. Injektion von Ang II die Reaktion des Blutdrucks, wodurch eine Beeinflussung der vaskulären Ang II - Rezeptoren weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Der zerebrale ipsilaterale Blutfluss wurde durch Irbesartan bei behandelten und bei unbehandelten Ratten während der zerebralen Ischämie in gleichem Ausmaß reduziert.

In Übereinstimmung mit den früheren Versuchen unserer Gruppe (Dai et al. 1999) wiesen wir in dieser Studie bei den i.c.v. mit Irbesartan vorbehandelten Tieren eine signifikante Verminderung der neurologischen Ausfälle gegenüber der mit Vehikel behandelten Gruppe nach. Es zeigte sich aber, dass eine Stimulation des AT_2 - Rezeptors oder beider AT - Rezeptoren keine günstigen Effekte aufweist.

Daraus folgt, dass zwei mögliche Mechanismen den günstigen Effekten der i.c.v. Behandlung mit Irbesartan zugrunde liegen könnten: Die Hemmung des AT_1 - Rezeptors, die indirekte Stimulation des AT_2 - Rezeptors oder die Kombination beider Mechanismen. Wir nehmen an, dass die indirekte Stimulation des AT_2 - Rezeptors wichtiger ist als die direkte Hemmung des AT_1 - Rezeptors, da bei der Hemmung des zerebralen AT_2 - Rezeptors in Kombination mit einer selektiven AT_1 - Blockade die Hemmung des AT_2 - Rezeptors die günstigen Effekte der AT_1 - Rezeptorblockade aufhebt.

Bei peripherer AT_1 - Rezeptorblockade durch Candesartan wurde bei SHR eine Reduktion der Infarktgröße nachgewiesen (Ito et al. 2002; Nishimura et al. 2000). Als ursächlicher Mechanismus wurde eine Reduktion des Mediadurchmessers der A. cerebri media postuliert,

die aus einer konsekutiv erhöhten Perfusion, auch in der so wichtigen marginalen Zone des ischämischen Hirnareals, resultiert.

Bei SHR zeigen die zerebralen Gefäße aufgrund ihrer Hypertonie eine Anpassungshypertrophie, welche wiederum zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und folglich zu einer Verminderung des Blutflusses und der kollateralen Reserve führt. Es wurde nachgewiesen, dass Ang II über den AT₁ - Rezeptor zu einer Hypertrophie glatter Muskelzellen in Gefäßwänden beiträgt und so mit wachsender Gefäßrigidität zu einem unangemessenen Adaptionsverhalten auf verschiedene Perfusionsdrücke führt (Ito et al., 2002).

Trotz der gestörten Autoregulation des Blutflusses in den zerebralen Gefäßen während eines Schlaganfalls kann ein ausreichender CBF bei normotensiven Ratten besser aufrechterhalten werden als bei SHR. Dies liegt an den nicht pathologisch veränderten Gefäßwänden und einer daraus resultierenden besseren Hirnperfusion. Da die zerebralen Gefäße bei normotensiven Ratten nicht verändert sind, müssen andere Mechanismen als eine verbesserte Perfusion für die günstige Wirkung der AT₁ - Rezeptorblockade ausschlaggebend sein. Darüber hinaus schließt die i.c.v. Behandlung mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten dessen Interaktion mit den AT₁ - Rezeptoren der Gefäße aus.

Ein Mechanismus, über den die günstige Wirkung der AT₁ - Rezeptorblockade während des ischämischen Schlaganfalls vermittelt werden könnte, stellt die Beeinflussung der postischämischen Entzündung dar. Aktivierte Mikroglia und Makrophagen stellen die Hauptfaktoren dar, welche für den neuronalen Tod nach Verletzung verantwortlich sind (Mabuchi et al. 2000). Lou et al. (2004) zeigten, dass die chronische i.c.v. Verabreichung von Irbesartan die Akkumulation aktivierter Mikroglia und Makrophagen in der Penumbra hemmt. AT₁ - Rezeptoren werden im erwachsenen Gehirn vor allem auf Astrozyten exprimiert. Es ist bekannt, dass der Metabolismus der Astrozyten und der der Neurone eng zusammenhängen, da die Astrozyten an der Regulierung der extrazellulären Ionen- und Neurotransmitterspiegel, sowie der Reparatur der extrazellulären Matrix teilnehmen. Daher könnten die verminderte Sekretion neurotropher Faktoren und die astrozytäre Apoptose bei der Pathogenese vieler akuter und chronischer neurodegenerativer Krankheiten, sowie der zerebralen Ischämie, eine Rolle spielen (Takuma et al. 2004). Die Expression der AT₁ - Rezeptoren, welche sich auf Astrozyten, aber auch auf Neuronen befinden, bleibt nach zerebraler Ischämie unbeeinflusst. Es wurde gezeigt, dass der AT₁ - Rezeptor, bei Endothelzellen in vitro (Li et al. 1999) und in Blutgefäßen von Ratten in vivo die Apoptose vermittelt (Diep et al. 1999).

Einen weiteren Mechanismus, der zur günstigen Wirkung der AT₁ - Rezeptorblockade während des ischämischen Schlaganfalls beitragen könnte, stellt die Blockade der Ca²⁺ - Aufnahme in die Neurone dar. Es ist bekannt, dass der exzessive, durch den

Glutamatrezeptor vermittelte Ca^{2+} - Einstrom den ischämischen Zelltod fördert. Auch die Stimulierung des AT_1 - Rezeptors vermittelt unter anderem durch die Stimulierung der Proteinkinase C eine Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{2+} . Eine Blockade des AT_1 - Rezeptors kann die Infarktgröße durch Absenken des intrazellulären Calciumspiegels vermindern (Choi, 1996). Im Einklang mit dieser Untersuchung konnten Walther et al. (2002) bei AT_1 - Rezeptor - knock-out - Mäusen eine geringere Infarktgröße und eine größere Penumbra nachweisen.

Auch Mattson et al. wiesen nach (2000), dass die Initiierung der Apoptose in neuronalen Zellen ursächlich in Zusammenhang mit der AT_1 - Rezeptor - vermittelten Aktivierung der Proteinkinase C und einer damit verbundenen Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{2+} steht und dadurch den ischämischen Hirnschaden vorantreibt.

Eine Anzahl von Studien postuliert eine Rolle des AT_2 - Rezeptors in neuronalen Geweben bei der Proliferation, Differenzierung und Regeneration (Unger et al. 1999). Die Rolle der neuronalen Plastizität und Differenzierung wurde dem AT_2 - Rezeptor nicht zuletzt aufgrund seiner hauptsächlichen Expression im fetalen Gehirn zugesprochen. Über die genauen Mechanismen der AT_2 - Rezeptor - vermittelten Neuroprotektion ist allerdings wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass die Stimulierung des AT_2 - Rezeptors durch Ang II in Zellkulturen neuronalen Ursprungs wie Hybridzellen NG108-15 und PC-12W-Phäochromozytomzellen Neuritenwachstum bewirkt (Laflamme et al. 1996; Meffert et al 1996; Stroth et al 1998). Bei diesen Wirkungen kann ein NO - vermittelter Signalweg eine Rolle spielen (Zhao et al. 2003). Es wurde nachgewiesen, dass der AT_2 - Rezeptor zur Myelinisierung und zu neuroregenerativen Prozessen der Hinterwurzelganglien nach Durchtrennung des Nervus ischiadicus beiträgt (Gallinat et al. 1998). Weiterhin begünstigt eine Stimulation des AT_2 - Rezeptors die neuronale Regeneration der Hinterwurzelganglien in vitro und die axonale Regeneration der retinalen Ganglienzellen nach Verletzung des Nervus opticus in vivo (Lucius et al 1998).

Iwai et al. (2004) berichteten, dass die Wirkung des AT_1 - Rezeptorantagonisten Valsartan nach zerebraler Ischämie bei AT_2 - Rezeptor - knock-out - Mäusen auf die Infarktgröße und den neurologischen Status im Vergleich zu Wildtypmäusen weitaus geringer war.

Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Stimulation des AT_2 - Rezeptors neuroprotektiv wirkt und eine Neuroregeneration auslöst. Umso überraschender war unser Ergebnis, dass die Langzeitvorbehandlung mit einem AT_2 - Rezeptorantagonisten bei Ratten keinen Einfluss auf den neurologischen Status nach fokaler zerebraler Ischämie hat, obwohl eine deutlich erhöhte Expression dieses Rezeptors im ischämischen Gehirngewebe nachgewiesen wurde (Li et al. 2005). Es ist zu erwarten, dass Ang II bei einer Blockade der AT_1 - Rezeptoren zunehmend mit den AT_2 - Rezeptoren interagieren kann, da die AT_1 - Rezeptorantagonisten den AT_2 - Rezeptor unbesetzt lassen und ihn somit den erhöhten Ang II Spiegel n eher

exponieren. Indirekt kann daraus geschlossen werden, dass in den neuronalen Zellen zahlreiche identische molekulare Ereignisse ausgelöst werden, welche einerseits die neuronale Regeneration ermöglichen und andererseits Apoptose auslösen können (Unger, 1999). Auf diese Weise könnte die Aktivierung des AT₂ - Rezeptors in Neuronen, welche eine ischämische Verletzung erlitten haben, einerseits neuroregenerative Ereignisse und Reparaturen fördern und andererseits bei schwerer Schädigung der Neuronen Apoptose induzieren. Beide dieser durch den AT₂ - Rezeptoren vermittelten Auswirkungen sind für die Besserung nach einem zerebralen Insult fundamental (Choi, 1996).

Eine andere Erklärung für die gleiche Auswirkung von PD 123177 und Vehikel auf den neurologischen Status könnte die Tatsache sein, dass ein noch größerer Infarkt und ein schlechterer neurologischer Status, was bei den mit PD 123177 behandelten Tieren zu erwarten wäre, die Sterblichkeit der Tiere während und nach dem Schlaganfall erhöhen würde. Diese Tiere können dann nicht im Protokoll erscheinen. Tatsächlich war die Sterblichkeitsrate während und bis 24 h nach der Ischämie in der mit PD 123177 behandelten Gruppe am höchsten (33%), gefolgt von der mit Vehikel behandelten (28%) und der mit Irbesartan behandelten Gruppe (18%).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir auch die Wirkungen der AT₁ - und AT₂ - Rezeptorblockaden durch Irbesartan und PD123177 auf die Expression der Transkriptionsfaktoren c - Fos und c - Jun.

In Übereinstimmung mit vorherigen Experimenten (Dai et al. 1999) reduzierte die Behandlung mit Irbesartan signifikant die c - Jun - und c - Fos - Expression. Bei den anderen Gruppen zeigte sich eine ähnlich starke Expression der Transkriptionsfaktoren.

Die Aktivierung der c - Jun – und der c - Fos - Expression scheint ein Teil des genetischen Programms zu sein, welches Apoptose vermittelt. Besonders die Überexpression von c - Jun und seine Aktivierung durch c - Jun N - terminale Kinasen (JNK), einer Untergruppe der MAP - Kinasen, welche als Reaktion auf diverse extrazelluläre Stimuli wie proinflammatorische Zytokine, Ischämie oder transiente Ischämie aktiviert werden, sind oft mit Apoptose und neuronalem Tod assoziiert (Chihab et al. 1998). Die Unterdrückung oder Antagonisierung von c - Jun verhindert den neuronalen Tod in Neuronen, denen der Nervenwachstumsfaktor (NGF) entzogen wurde. Während c - Jun in allen Neuronen, welchen der NGF entzogen wurde, induziert wurde, war die c - Fos - Induktion auf Neurone beschränkt, die apoptotische Prozesse durchliefen (Estus et al. 1994). Eine zeitabhängige c - Fos - Induktion wurde nach unilateraler Ligatur der A. carotis in Neuronen erwachsener Ratten beobachtet, aber nicht in glialen oder ependymalen Zellen. Die c - Jun - und c - Fos - Expression war bei Ratten im Hippokampus und in spezifischen Schichten des Kortex nach transientser Vorderhirnischämie erhöht (Neumann - Haefelin et al. 1994). Alle diese Befunde

belegen, dass die Aktivierung von c - Fos und c - Jun einen Teil der biochemischen Antworten der Neuronen auf Ischämie darstellen, welche eventuell zum neuronalen Tod führen. Ang II verstärkt über den AT₁ - Rezeptor die Expression von c - Fos und c - Jun in neuronalen Zellen und aktiviert Fos - regulierende Kinasen und c - Jun - N - terminale Kinasen, welche die transkriptionelle Aktivität von c - Fos und c - Jun erhöhen (Blume et al. 1999).

Diesen Untersuchungen zufolge sind die von uns erzielten Ergebnisse gut erklärbar. Auch das Ergebnis der mit PD123177 vorbehandelten Gruppe war voraussehbar, da die Stimulierung des AT₂ - Rezeptors weder eine c - Fos - Expression in Zellen neuronalen Ursprungs induziert, noch die durch den Wachstumsfaktor induzierte c - Fos - und c - Jun - Expression in PC12W - Zellen hemmt (Steckelings et al. 1998). Eine Aktivierung des zerebralen AT₂ - Rezeptors stimuliert auch nicht die AP-1 - Transkriptionsfaktoren in vivo (Blume et al. 1998).

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zentralen AT₂ - Rezeptoren zu den beobachteten positiven Auswirkungen der AT₁ - Rezeptorblockade auf das neurologische Ergebnis und die Expression der AP-1 - Transkriptionsfaktoren nach fokaler zerebraler Ischämie wesentlich beitragen.

Protokoll 2 und 3

Frühere Versuche unserer Gruppe zeigten, dass eine i.c.v. AT₁ - Rezeptorblockade eine Verbesserung des neurologischen Status und eine Reduktion der c - Fos - und c - Jun - Induktion nach zerebraler Ischämie bewirkt (Dai et al. 1999). Ziel dieser Untersuchungen war, herauszufinden, ob die günstige Wirkung der zerebralen AT₁ - Rezeptorblockade bei i.c.v. Infusion des bluthirnschrankengängigen Medikaments auch bei systemischer Verabreichung zu erreichen ist.

Irbesartan wurde in der Dosierung von 30 mg/kg/KG verwendet. Diese Dosis zeigte eine selektive und effektive Inhibierung der zerebralen AT₁ - Rezeptoren (Culman et al. 1999).

In dieser Studie wurden normotensive Ratten einmalig systemisch mit dem Ang II - Antagonisten Irbesartan zu Beginn der Reperfusionphase behandelt.

Es stellte sich heraus, dass der arterielle Mitteldruck nach der Behandlung mit Irbesartan beträchtlich sank und über einen Zeitraum von mindestens 75 min deutlich erniedrigt blieb, auch wenn alle Ratten schon wieder wach waren.

Die mit Irbesartan behandelte Gruppe wies das gleiche neurologische Defizit wie die mit Vehikel behandelte Gruppe auf. Dies war ein interessantes Ergebnis, da vorausgehende Experimente folgendes belegten: Dass erstens die Blockade der AT₁ - Rezeptoren im Gehirn eine günstige Wirkung zeigte und dass zweitens Irbesartan bei i.v. Behandlung mit einer Dosis von 30 mg/kg effektiv die zerebralen AT₁ - Rezeptoren hemmte (Culman et al. 1999).

AT₁ - Rezeptorenantagonisten senken über die Hemmung der vaskulären AT₁ - Rezeptoren den Blutdruck beträchtlich, sowohl bei hypertensiven als auch bei normotensiven Ratten. Dies wurde auch in dieser Versuchsreihe beobachtet. Die zerebrale Durchblutung während des Schlaganfalls ist hauptsächlich vom systemischen Blutdruck abhängig. Die Autoregulation des CBF ist während der zerebralen Ischämie eingeschränkt. Ein starker Abfall des arteriellen Mitteldrucks während oder nach der Ischämieperiode würde den Blutfluss in ischämischen Gehirngebieten beträchtlich vermindern.

Eine einmalige Behandlung mit Candesartan vier h vor Erzeugung einer zerebralen Ischämie hatte keine günstigen Auswirkungen im Vergleich mit den Kontrolltieren. Auch in diesem Fall wurden starke Blutdruckabfälle bei den mit AT₁ - Rezeptorantagonisten behandelten Ratten festgestellt und für den schlechten Zustand nach der Ischämie verantwortlich gemacht (Groth et al. 2003).

Hosomi et al. (1999) zeigten, dass eine pharmakologisch induzierte milde Hypertonie nach zerebraler Ischämie die Überlebensrate in Wüstenratten erhöht.

Wir schließen daraus, dass die i.v. Behandlung mit Irbesartan über die vaskulären AT₁ - Rezeptoren eine Reduktion der Blutversorgung in den ischämischen Gehirngeweben bewirkt, welche den Gewebeschaden noch vergrößert und die positive Wirkung der zerebralen AT₁ - Rezeptorblockade aufhebt. Dieses Erkenntnis ist auch klinisch relevant. Es scheint, dass eine sehr frühe Behandlung mit blutdrucksenkenden Substanzen wie z. B. mit AT₁ - Rezeptorantagonisten bei Patienten mit zerebralem Insult den Blutdruck beträchtlich senken kann und dadurch den Zustand verschlechtert.

In Protokoll 3 wurden normotensive Ratten vor der Durchführung eines ischämischen Schlaganfalls über fünf Tage systemisch mit Irbesartan behandelt. Irbesartan wurde in der gleichen Dosierung wie in Protokoll 2 gegeben. Um eine Blutdrucksenkung während der zerebralen Ischämie zu vermeiden, wurde die letzte Irbesartaninfusion 12 h vor der zerebralen Ischämie verabreicht. Die systemische Vorbehandlung mit Irbesartan über fünf Tage hinweg zeigte keinen Unterschied des neurologischen Status der mit Irbesartan behandelten Gruppe im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Gruppe.

Das Ergebnis war überraschend, da bei SHR Untersuchungen ergaben, dass die chronische Behandlung mit Candesartan eine Reduktion des Infarktvolumens nach temporärer oder permanenter zerebraler Ischämie zur Folge hat (Nishimura et al. 2000; Ito et al. 2002).

Auch bei normotensiven Ratten zeigte eine chronische Vorbehandlung mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten Candesartan eine Verbesserung des neurologischen Ergebnisses sowie eine Reduktion des zerebralen Infarktvolumens (Groth et al. 2003). Eine Erklärung für das Versagen der Vorbehandlung mit Irbesartan wäre eine nicht vollständige Blockade der zentralen AT₁ - Rezeptoren. Deshalb überprüften wir die Effizienz der Rezeptorblockade.

Beim Trinktest zeigte Irbesartan keine effektive und ausreichende Hemmung der zerebralen AT₁ - Rezeptoren über den Verlauf von 24 Stunden. Andererseits vermochte systemisch verabreichtes Candesartan die zentralen AT₁ - Rezeptoren über den Zeitraum von 24 h effektiv zu hemmen (Gohlke et al. 2002). Folglich ist die günstige Wirkung der chronischen systemischen Behandlung mit Candesartan im Vergleich zu Irbesartan auf die Effizienz der Hemmung der zerebralen AT₁ - Rezeptoren vor und während der Ischämieperiode zurückzuführen.

Angenommen, die neuroprotektive Wirkung der AT₁ - Rezeptorantagonisten führt zu veränderten Proteinexpressionsmustern, welche einige Stunden oder sogar Tage benötigen, ist es offensichtlich, dass nur eine **effiziente und chronische AT₁ - Rezeptorblockade** eine günstige Wirkung beim ischämischen Schlaganfall haben kann.

Die Blockade des AT₁ - Rezeptors durch AT₁ - Rezeptorantagonisten ist normalerweise kompetitiv und reversibel, jedoch weisen einige AT₁ - Rezeptorantagonisten wie zum Beispiel Candesartan eine stärkere Bindung zum AT₁ - Rezeptor auf und dissoziieren sehr langsam vom AT₁ - Rezeptor weg, was auch als unüberwindbare Hemmung im Vergleich zur kompetitiven Hemmung z. B. durch Irbesartan bezeichnet wird (Culman et al. 2002). Beide AT₁ - Rezeptorantagonisten überwinden die Bluthirnschranke, Candesartan zeigt jedoch eine über 24 Stunden anhaltende effektive Blockade der zentralen Effekte von Ang II (Gohlke et al. 2002). Irbesartan penetriert ebenso die Bluthirnschranke, aber auch in hohen Dosierungen wird keine vollständige Blockade der zentralen Effekte von Ang II erreicht, außerdem hält die Blockade nicht 24 h, sondern weniger als sechs h an.

Beide Ang II - Antagonisten sind effektiv bei der Blutdrucksenkung und beide sind gleichwertig in der Schlaganfallprophylaxe bei hypertonen Patienten. Bei peripherer Verabreichung hemmt Candesartan im Gegensatz zu Irbesartan jedoch effektiver die zentralen AT₁ - Rezeptoren, was sich auf den neurologischen Status nach zerebraler Ischämie günstig auswirkt. Im Hinblick auf die antihypertensive Behandlung bei Patienten mit Z. n. Apoplex zeigt dies möglicherweise einen wichtigen Behandlungsweg auf.

Die einzige klinische Studie hat den Vorteil einer AT₁ - Rezeptorblockade nach der Gehirnschämie gezeigt. Die ACCESS - Studie (The Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors) war eine randomisierte Doppelblindstudie an Schlaganfallpatienten. Einschlusskriterien waren ein initialer Blutdruck von über 200/110 mmHg sowie eine motorische Parese. Die Patienten wurden während sieben Tagen mit Placebo oder mit Candesartan behandelt. Nach sieben Tagen erhielten alle Patienten Candesartan, außer jenen, welche ein normotensives Blutdruckprofil aufwiesen. Nach drei Monaten wurde die Mortalitätsrate untersucht. Bei mit dem AT₁ - Antagonisten Candesartan behandelten Patienten waren die Mortalität, zerebrale Komplikationen und kardiovaskuläre Komplikationen um 47,5% reduziert (Schrader et al. 2003). Diese Studie zeigte deutlich, wie

wichtig es ist, hypertensive Patienten so früh wie möglich nach einem Schlaganfall mit AT₁ - Rezeptorantagonisten zu behandeln. Die SCOPE - Studie (Study on Cognition and Prognosis in the elderly) untersuchte die prophylaktische Wirkung von Candesartan auf vaskuläre Ereignisse bei älteren Patienten mit leichter Hypertension. Es wurden der kardiovaskuläre Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall untersucht, weiterhin wurden die kognitiven Funktionen, das Ausmaß der Demenz, die Gesamtmortalität und die renale Funktion erfasst. Die Untersuchungen ergaben eine 28% ige Reduktion des Schlaganfallrisikos in der mit Candesartan behandelten Gruppe gegenüber der mit Placebo behandelten Gruppe (Lithell et al. 2003).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die systemische Behandlung mit AT₁ - Rezeptorantagonisten dann effektiv ist, wenn diese auch die Bluthirnschranke überwinden und effektiv und langdauernd die zentralen AT₁ - Rezeptoren hemmen. Eine effektive und langandauernde Blockade der AT₁ - Rezeptoren im Gehirn ist die Voraussetzung für die günstige Wirkung der AT₁ - Rezeptorantagonisten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung von AT₁ - und AT₂ - Rezeptoren im Gehirn für die pathophysiologischen Vorgänge bei einem ischämischen Schlaganfall zu untersuchen und die Behandlungsstrategien mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan zu ermitteln, welche zur Verbesserung des neurologischen Status nach einer zerebralen Ischämie führen. Im ersten Teil der Versuchsreihen wurde der Beitrag des AT₂- Rezeptors zu den positiven Wirkungen der AT₁ - Rezeptorblockade beim zerebralen Insult untersucht. Bei Ratten wurden selektiv die AT₁ -, AT₂ - oder beide Subtypen der Angiotensinrezeptoren im Gehirn vor, während und nach der Erzeugung einer fokalen Ischämie gehemmt. Nach der zerebralen Ischämie war der neurologische Status nur bei den mit dem AT₁ - Rezeptorantagonisten Irbesartan behandelten Tieren signifikant besser, und das Infarktvolumen war deutlich geringer als bei den anderen Versuchsgruppen. Die Expression von induzierbaren Transkriptionsfaktoren c - Fos und c - Jun, welche mit dem neuronalen Tod in Zusammenhang gebracht werden, war nach dem Schlaganfall bei der mit Irbesartan behandelten Gruppe deutlich niedriger als bei den anderen Versuchsgruppen. Die gleichzeitige Hemmung der AT₂ - Rezeptoren im Gehirn hob alle günstigen Effekte der AT₁ - Rezeptorblockade auf. Dieser experimentelle Teil zeigte, dass die Stimulation des AT₂ - Rezeptors im Wesentlichen zu den günstigen Effekten der AT₁ - Rezeptorblockade nach einem ischämischen Schlaganfall beiträgt.

Im zweiten Teil der Versuchsreihen wurde untersucht, ob eine systemische Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode den neurologischen Status verbessert. Frühere Untersuchungen haben belegt, dass Irbesartan die Bluthirnschranke überwindet. Die einmalige i.v. Behandlung mit Irbesartan am Ende der Ischämieperiode verbesserte nicht den neurologischen Status nach dem Schlaganfall, obwohl die AT₁ - Rezeptoren im Gehirn in diesem Zeitraum blockiert waren. Ein starker Abfall des arteriellen Mitteldrucks nach der i.v. Irbesartan - Infusion und folglich eine verminderte Perfusion des ischämischen Gewebes im Gehirn hoben sehr wahrscheinlich die günstigen Effekte der AT₁ - Rezeptorblockade auf.

In der letzten Versuchsreihe wurden die Tiere fünf Tage vor der Induktion der zerebralen Ischämie i.v. mit Irbesartan oder Vehikel (Kontrollgruppe) behandelt. Bei neurologischen Untersuchungen an sieben nacheinander folgenden Tagen konnten keine Unterschiede in dem neurologischen Status festgestellt werden. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die zentralen AT₁ - Rezeptoren bei diesem therapeutischen Regime nicht vollständig und dauerhaft blockiert waren.

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, dass nur eine vollständige und dauerhafte Blockade der zentralen AT₁ - Rezeptoren den Gehirnschaden begrenzen und die Restitution nach

einem Schlaganfall verbessern kann. Der größte Teil der günstigen, neuroprotektiven Effekte nach einer AT_1 - Rezeptorblockade im Gehirn wird über die Stimulation des AT_2 - Rezeptors vermittelt. Ein systemisch applizierter AT_1 - Rezeptorantagonist kann nur dann neuroprotektiv wirken, wenn er die Bluthirnschranke effektiv überwindet und ein starker Blutdruckabfall während der Ischämieperiode oder der frühen Reperfusionphase vermieden wird.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., Bartkowski, H. (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17 (3), 472 - 6.

Blume, A., Seifert, K., Lebrun, C. J., Möllenhoff, E., Gass, P., Unger, T., Herdegen, T. (1998): Differential time course of angiotensin-induced AP-1 and Krox proteins in the rat lamina terminalis and hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 241 (2-3), 87 - 90.

Blume, A., Herdegen, T., Unger, T. (1999): Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J. Mol. Med.*, 77 (3), 339 – 57.

Chihab, R., Ferry, C., Koziel, V., Monin, P., Daval, J. L. (1998): Sequential activation of activator protein- 1- related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 63 (1), 105 - 120.

Choi, D. W. (1996): Ischemia- induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6 (5), 667 - 72.

Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T. (2002): The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J. Hum. Hypertens.*, 16 Suppl. 3, 64 - 70.

Culman, J., Höhle, S., Quadri, F., Edling, O., Blume, A., Lebrun, C., Unger, T. (1995): Angiotensin as neuromodulator / neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. *Clin. Exp. Hypertens.*, 17 (1-2), 281 - 93.

Culman, J., von Heyer, C., Piepenburg, B., Rascher, W., Unger, T. (1999): Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotension II in conscious, normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 367 (2-3), 255 - 65.

Dai, W. J., Funk, A., Herdegen, T., Unger, T., Culman, J. (1999): Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke*, 30 (11), 2391-9.

Diep, Q. N., Li, J. S., Schiffrin, E. L. (1999): In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension*, 34 (4 Pt 1), 617 - 24.

Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A., (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, 22 (9), 391 - 7.

Estus, S., Zaks, W., Freeman, R., Gruda, M., Bravo, R., Johnson, E. J. (1994): Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.*, 127 (6 Pt 1), 1717 - 27.

Fournier, A., Messerli, F.H., Achard, J. M., Fernandez, L. (2004): Cerebroprotection mediated by angiotensin II: a hypothesis supported by recent randomized clinical trials. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43 (8), 1343 - 7.

Fuji, K., Weno, B. L., Baumbach, G. L., Heistad, D. D. (1992): Effect of antihypertensive treatment on focal cerebral infarction. *Hypertension*, 19 (6 Pt 2), 713 – 6

Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T., Herdegen, T. (1998): Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 57 (1), 111 - 22.

Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F., Hu, X. J. (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 26 (4), 627 - 35.

De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., Unger, T. (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.*, 52 (3), 415 - 72.

Gohlke, P., Kox, T., Jürgensen, T., von Kügelgen, S., Rascher, W., Unger, T., Culman, J. (2002): Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 365 (6), 477 – 83.

Groth, W., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., Culman, J. (2003): Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J. Hypertens.*, 21 (11), 2175 - 82.

Guglielmo, M. A., Chan, P. T., Cortez, S., Stopa, E. G., McMillan, P., Johanson, C. E., Epstein, M., Doberstein, C.E. (1998): The temporal profile and morphologic features of neuronal death in human stroke resembles those observed in experimental forebrain ischemia: the potential role of apoptosis. *Neurol. Res.*, 20 (4), 283 - 96.

Hajdu, M. A., Heistad, D. D., Ghoneim, S., Baumbach, G. F. (1991): Effects of antihypertensive treatment on composition of cerebral arterioles. *Hypertension*, 18 (4 Suppl.), II 15 - 21.

Höhle, S., Blume, A., Lebrun, C., Culman, J., Unger, T (1995):Angiotensin receptors in the brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 77 (5), 306 - 15.

Hosomi, N., Mizushige, K., Kitadai, M., Ohyama, H., Ichihara, S. I., Takahashi, T., Matsuo, H. (1999): Induced hypertension treatment to improve cerebral ischemic injury after transient forebrain ischemia. *Brain Res.*, 835(2), 188 - 96.

Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J. A., Falcon-Neri, A., Saavedra, J. M. (2002): Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*, 33 (9), 2297 - 303.

Iwai, M., Liu, H. W., Chen, R., Ide, A., Okamoto, S., Hata, R., Sakanaka, M., Shiuchi, T., and Horiuchi, M. (2004): Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation*, 110 (7), 843 - 8.

Kagiyama, T., Kagiyama, S., Phillips, M. I. (2003): Expression of angiotensin type 1 and type 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Reg. Pept.*, 110 (3), 241 - 7.

Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G. (1986): Experimental studies of ischemic brain oedema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*, 8, 1 - 8.

Laflamme, L., Gasparo, M., Gallo, J. M., Payet, M. D., and Gallo-Payet, N. (1996): Angiotensin II induction of neurite outgrow by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors. *J. Biol. Chem.*, 271 (32), 22729 - 35.

Li, J., Culman, J., Hörtnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U., Unger, T. (2005): Angiotensin AT₂ receptor protects against cerebral ischemia – induced neuronal injury. *FASEB J.*, 19 (6), 617 - 9.

Li, D., Tomson, K., Yang, B., Mehta, P., Croker, B. P., Mehta, J. L. (1999): Modulation of constitutive nitric oxide synthase, bcl – 2 and Fas expression in cultures human coronary endothelial cells exposed to anoxia – reoxygenation and angiotensin II: role of AT₁ receptor activation. *Cardiovasc. Res.*, 41 (1), 109 – 15.

Lithell H., Hansson L., Skoog I., Elmfeldt D., Hofmann A., Olofsson B., Trenkwalder P., Zanchetti A., SCOPE Study Group (2003): The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double- blind intervention trial. *J. Hypertens.*, 21 (5), 875 - 86.

Lou, M., Bume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., Culman, J. (2004): Sustained blockade of brain AT₁ receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24(5), 536 - 47.

Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J., Unger, T. (1998): The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J. Exp. Med.*, 188 (4), 661 - 70.

von Lutterotti, N., Camargo, M. J., Campbell, W. G. Jr., Mueller, F. B., Timmermanns, P. B., Sealey, J. E., Laragh, J. H. (1992): Angiotensin II receptor antagonist delays renal damage and stroke in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens.* ,10 (9), 949 - 57.

Mabuchi, T., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Yanagihara, T., Hori, M., Matsumoto, M. (2000): Contribution of microglia / macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 31 (7), 1735 - 34.

Makino, I., Shibata, K., Ohgami, Y., Fujiwara, M., Furukawa, T. (1996): Transient upregulation of the AT₂ receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides*, 30 (6), 596 - 601.

McAuley, M. A. (1995): Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.*, 7 (2), 153 - 80.

Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, Z. F. (2000): Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.*, 301 (1), 173 - 87.

Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U. M., Bottari, S. P., Unger, T. (1996): The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 122 (1), 59 - 67.

Neumann-Haefelin, T., Wiessner, C., Vogel, P., Back, T., Hossmann, K.A. (1994): Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, junB and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14 (2), 206 - 16.

Nishimura, Y, Ito, T., Saavedra, J. M. (2000): Angiotensin II AT(1) blockades normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 31 (10), 2478 - 86.

Schrader, J., Luders, S., Kulschewski, A., Berger, J., Zidek, W., Treib, J., Einhaupl, K., Diener H. C., Dominiak P., Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors Study Group (2003): The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke*, 34 (7), 1699 - 703.

Steckelings, U. M., Bottari S. P., Stoll, M., Wagner, J., Unger, T. (1998): Repression of c-fos and c-jun gene expression is not part of AT₂ receptor coupled signal transduction. *J. Mol. Med.*, 76 (3-4), 202 - 7.

Steckelings, U. M., Bottari, S. P., Unger, T. (1992): Angiotension receptor subtypes in the brain. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13 (9), 365 - 8.

Stier, C. T. Jr., Adler, L. A., Levine, S., Chander, P. N. (1993): Stroke prevention by losartan in stroke - prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens. Suppl.*, 11 (3), 37 - 42.

Stier, C. T. Jr., Benter, I. F., Ahmad, S., Zuo, H. L., Selig, N., Roethel, S., Levine, S., Itskovitz, H. D. (1989): Enalapril prevents stroke und kidney dysfunction in salt – loaded stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 13 (2), 115 - 21.

Stroth, U., Meffert, S., Gallinat, S., Unger, T. (1998): Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 Receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 53 (1-2), 187 - 95.

Swanson, R. A., Morton, M. T., Tsao-Wu, G., Savalos, R. A., Davidson, C., Sharp, F. R. (1990): A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 10 (2), 290 - 3.

Takuma, K., Baba, A., Matsuda, T. (2004): Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progr. Neurobiol.*, 72 (2), 111 -27.

Tremblay, B. (1995): Clinical potential for the use of neuroprotective agents. A brief overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 765, 1 - 27.

Unger, T. (1999): The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J. Hypertens.*, 17 (12 Pt 2), 1775 - 86.

Walther, T., Olah, L., Harms, C., Maul, B., Bader, M., Hörtnagl, H., Schultheiss, H. P., Mies, G. (2002): Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. *FASEB J.*, 16 (2), 169 - 76.

Werner C., Hoffman W.E., Kochs E., Rabito S.F., Miletich D.J. (1991) Captopril improves neurological outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 22 (7), 910 - 4.

Zhao, Y., Biermann, T., Luther, C., Unger, T., Culman, J., and Gohlke, P. (2003): Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT2 receptor-mediated differentiation in PC12W cells. *J. Neurochem.*, 85, 759 - 67.

7. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Thomas Unger, dem ehemaligen Direktor, und Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi, dem derzeitigen Direktor des Pharmakologischen Instituts der Christian Albrechts Universität zu Kiel, für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel zur Versuchsdurchführung bedanken.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Culman für das Heranführen an experimentelles Arbeiten, die intensive Betreuung, die Offenheit und ständige Bereitschaft bei allen aufgetretenen Fragen Hilfestellung zu leisten. Weiter möchte ich mich bei Herr Brdon für die stetige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung bedanken.

Außerdem danken möchte ich meinen beiden Brüdern Gregor und Florian Funk sowie Frau Sabine Hofmann für die tatkräftige Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern Gretel und Hans-Jörg Funk, welche mir die entsprechende Schulbildung und das Studium der Humanmedizin erst ermöglicht haben. Ich danke ihnen für die wertvolle Unterstützung und die motivierenden Worte während der gesamten Zeit des Studiums und der Anfertigung der Dissertation.

8. LEBENS LAUF

Name: Alexandra Funk
 Geburtsdatum und - ort: 24.02.1976 in Radolfzell am Bodensee

Berufsausbildung / Schulbildung:

Seit 05/08	Assistenzärztin im ambulanten Bereich des Kinder- und Jugendpsychiatrischen Dienstes des Kantons Zürich, Schweiz
05/07 - 04/08	Assistenzärztin in der Akutpsychiatrie der Psychiatrischen Klinik Königsfelden, Psychiatrische Dienste Aargau AG, Schweiz
Seit 09/06	Weiterbildung in kognitiver Verhaltenstherapie am Klaus - Grawe - Institut für Psychologische Therapie, Zürich, Schweiz
02/06 - 04/07	Assistenzärztin in der Jugendpsychiatrie der Littenheid, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Littenheid TG, Schweiz
07/05 - 12/05	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik des Klinikums Ludwigsburg, Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg
05/04 - 07/05	Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II des Klinikums Pforzheim, Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg
11/02 - 04/03	Ärztin im Praktikum („Faisant Fonction d'Interne“) in der internistischen Abteilung des „Centre Hospitalier Universitaire Pellegrin“, Bordeaux, Frankreich
10/98 - 12/08	Dissertationsarbeit am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig - Holstein Campus Kiel
10/95 -10/02	Studium der Humanmedizin an der Friedrich - Schiller - Universität Jena und der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel, Abschluss: Staatsexamen
08/82 - 06/95	Grundschule und Gymnasium in Radolfzell, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Veröffentlichungen:

11/1999	Blockade of central angiotensin AT1 receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP - 1 transcription factors after focal brain ischemia in rats" (in Stroke als Co - Autor)
11/99	"Neurological Outcome and expression of AP - 1 transcription factors after focal brain ischemia: Effect of AT1 receptor blockade" (Sonderpreis der Deutschen Hochdruckliga für Poster)