

Aus dem Institut für Pharmakologie
des Universitätsklinikums Kiel, UK S-H
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi)

Die zentrale Wirkung von Candesartan in der Schlaganfalltherapie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Kiel
der
Christian-Albrechts-Universität

Vorgelegt von
Katja Maydowski
aus
Carlow
2008

1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Dr. Juraj Culman
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. sc. hum. Peter Gohlke
Tag der mündlichen Prüfung:	05.05.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den:	05.05.2011

Meiner Familie gewidmet

1 Inhaltverzeichnis

1	Inhaltverzeichnis	4
2	Abkürzungen.....	7
3	Einleitung	1
3.1	Die Pathophysiologie eines ischämischen Schlaganfalles	2
3.1.1	Die Exzitotoxizität.....	3
3.1.2	Die Peri-Infarkt Depolarisation.....	4
3.1.3	Die Inflammation.....	4
3.1.4	Apoptose beim ischämischen Schlaganfall	5
3.2	Veränderung der Genexpression beim ischämischen Schlaganfall	6
3.3	Das Renin-Angiotensin-System	8
3.3.1	Angiotensin-Rezeptoren	9
3.3.2	Signaltransduktion der AT1/AT2- Rezeptoren	10
3.3.3	Das Renin-Angiotensin-System im Gehirn	11
3.3.4	Regeneration der Neuone	12
3.3.5	Angiotensinrezeptorantagonisten	12
3.4	Ziel der Studie.....	13
4	Material und Methoden.....	14
4.1	Versuchstiere	14
4.2	Anästhesie und Narkose.....	14
4.3	Vorversuche: Experimentelles Vorgehen.....	14
4.3.1	Intraventrikuläre Candesartanapplikation via osmotischer Pumpe	14
4.3.2	Ang II-Applikation via intraventrikulärer Kanüle oder transfemoralem Zugang.....	17
4.3.3	Kreislaufmonitoring über transarteriellen Katheter.....	17

Inhaltverzeichnis

4.3.4	Trinkversuch	17
4.4	Vorversuche: Experimentelle Gruppen	18
4.4.1	Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung	18
4.4.2	Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe	19
4.4.3	Zentrale Ang II-Hemmung bei kontinuierlicher Candesartangabe	20
4.5	Hauptversuche: Experimentelles Vorgehen	21
4.5.1	Intraventrikuläre Candesartanapplikation via osmotischer Pumpe	21
4.5.2	Fokale Gehirnischämie und Reperfusion.....	21
4.5.3	Cerebrale Blutflussmessung.....	23
4.5.4	Neurologisches Defizits 24 h und 48 h nach Okklusion der Arteria cerebri media	23
4.5.4.1	Skala nach Bederson.....	23
4.5.4.2	Skala nach Garcia.....	24
4.5.5	Anfertigung der koronaren Hirnschnitte	26
4.5.6	Bestimmung des Infarkt- und Ödemvolumens.....	27
4.6	Hauptversuche: Experimentelle Gruppen	29
4.7	Verwendete Lösungen	30
4.8	Statistik	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Vorversuche.....	33
5.1.1	Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung	33
5.1.2	Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe	35
5.1.3	Zentrale Ang II-Hemmung bei kontinuierlicher Candesartangabe	37
5.2	Hauptversuche.....	37
5.2.1	Cerebrale Blutflussmessung.....	37

Inhaltverzeichnis

5.2.2	Neurologisches Defizit 24 h und 48 h nach Okklusion der Arteria cerebri media	38
5.2.3	Bestimmung des Infarkt- und Ödemvolumens.....	39
6	Diskussion	41
6.1	Gewähltes Modell.....	41
6.2	Aktuelle Studienlage bezüglich klinischer Studien	41
6.3	Aktuelle Studienlage bezüglich tierexperimenteller Studien.....	43
6.3.1	Versuchstiere: Hypertensiv versus normotensiv.....	43
6.3.2	Zeitpunkt der AT-1-Repetor-Blockade	47
6.3.3	Art der Applikation und Wahl des AT-1-Blockers.....	48
7	Zusammenfassung.....	51
8	Literaturverzeichnis.....	53
9	Abbildungsverzeichnis	66
10	Lebenslauf	68
11	Danksagung	69

2 Abkürzungen

- Acc Arteria carotis communis
- Ace Arteria carotis externa
- Aci Arteria carotis interna
- Acm Arteria cerebri media
- ACE Angiotensin Converting Enzyme
- AMPA α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
- Ang II Angiotensin II
- AP-1 Aktivatorprotein 1
- AT1-Rezeptor Angiotensin Typ 1 Rezeptor
- AT2-Rezeptor Angiotensin Typ 2 Rezeptor
- CBF Cerebraler Blutfluss
- COX-II Cyclooxygenase II
- icv. Intracerebroventrikuläre Injektion
- iNOS Induzierbare Stickstoffmonoxyd Synthase
- IP3 Inositoltriphosphat
- MCAO Middle cerebral artery occlusion
- MAPK Mitogen aktivierte Proteinkinase
- NMDA N-methyl-D-aspartase
- NO Stickstoffmonoxyd
- NOS Stickstoffmonooxidase
- ONOO⁻ Peroxidnitrit
- RAS Renin-Angiotensin-System
- SHR Spontan hypertensive Ratten

Abkürzungen

- ZVO Zirkumventrikuläre Organe

3 Einleitung

Der Schlaganfall belegt den 3. Platz der Todesstatistik (Statistisches Bundesamt 2003). Hierbei kommt es zu einem plötzlich einsetzenden neurologisches Defizit bedingt durch eine zentrale Ischämie oder Hämorrhagie. Diese Arbeit konzentriert sich auf den ischämischen Schlaganfall, der 80 % aller Schlaganfälle ausmacht. Ätiologisch kommen thromboembolische Ereignisse, mikroangiopathische und hämodynamische Veränderungen in Frage. Der größte Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie. Andere Risikofaktoren sind eine Hypercholesterinämie, eine Hyperurikämie, Herzrhythmusstörungen oder ein persistierendes Foramen ovale mit Vorhofseptumsaneurysma. Die Inzidenz für eine kurzzeitige Durchblutungsstörung beträgt in Deutschland 50/100000 Einwohnern pro Jahr. Für ischämische Schlaganfälle liegt diese bei 160-240/100000 Einwohnern pro Jahr. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu, etwa die Hälfte aller Schlaganfallpatienten ist über 70 Jahre alt. Die Prävalenz liegt bei 700-800/100000 Einwohnern. Die Mortalität liegt nach einem Jahr bei circa 25 %. Durch einen lokalen Gefäßverschluss, der zu einem Verlust der Sauerstoff- und Glukoseversorgung führt, kommt es zu einem Zusammenbruch des Funktions- und Erhaltungsstoffwechsel des betroffenen Gehirnareals. Circa 15 % des Herzzeitvolumens, dies sind 1,2 l Blut pro Minute, entfällt beim Menschen auf das Hirngewebe. Durch den Bayliss-Effekt wird selbst bei größeren Blutdruckschwankungen eine konstante Durchblutung des Gehirns gewährleistet. Zusätzlich besteht neben dieser vaskulären Autoregulation der Hirngefäße eine breite Reserve zwischen dem normalen zerebralen Blutfluss (CBF) bei einem Gesunden, der etwa 60-80ml pro Minute pro 100 g Hirngewebe beträgt, und dem zerebralen Blutfluss, bei dem es zu neurologischen Funktionsstörungen kommt (ab 20 ml/100 g in der Minute). Die Klinik eines ischämischen Schlaganfalles richtet sich nach dem betroffenen Hirnareal. Die Symptome können nur Minuten oder Stunden andauern (transitorisch-ischämische Attacken, TIA) oder dauerhaft bestehen (vollendeter Schlaganfall). Der Schlaganfall ist ein medizinischer Notfall. Zeit ist der wichtigste Faktor in der Behandlung eines akuten Schlaganfalles, hierbei spielen vor allem die ersten drei Stunden nach Auftreten der Symptome eine entscheidende Rolle. Die Mehrheit der Patienten erhält keine adäquate Therapie, da diese nicht schnell genug das Krankenhaus er-

reichen [Barber et al. 2001]. Die beste Versorgung eines Schlaganfalles beruht auf einem schnellen Erkennen der Symptome mit zügigem Transport in ein qualifiziertes Zentrum mit einer Stroke Unit. Die akute Schlaganfallbehandlung beinhaltet unter anderem das Monitoring der Vitalparameter mit ggf. spezifischen Therapien wie einer Lysetherapie bei Einhaltung des Zeitfensters (bis 3 h nach Auftreten erster Symptome) [Kwiatkowski et al. 1999, Hacke et al. 1999] sowie die Vorbeugung von Komplikation und frühe rehabilitative Maßnahmen. Die Behandlung auf einer Schlaganfallstation, verglichen mit einer allgemeinen Klinik, ist effektiv und reduziert die Mortalität um 18- 46 % [Langhorne 1997]. Aufgrund der schlechten Regenerationsfähigkeit geschädigter Hirnareale muss eine verbesserte Vorsorge sowie eine sofortige zielgerichtete Behandlung angestrebt werden. Schon heute ist der Schlaganfall die häufigste Ursache dauerhafter Behinderungen [Wolf et al. 1992]. Wegen der Häufigkeit stellen die Kosten für Akutbehandlung, Rehabilitation und medikamentöser Dauertherapie bedeutsame Ausgaben im Gesundheitswesen dar. Deshalb liegt ein Hauptschwerpunkt der Forschung in der Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten, um das Ausmaß ischämischer Hirnschädigungen einzudämmen.

3.1 Die Pathophysiologie eines ischämischen Schlaganfalles

Nach einem Sistieren der Blutversorgung kommt es innerhalb von wenigen Minuten zum Absterben der Neurone im Infarktkern. Das Gebiet um den Infarktkern, auch als Penumbra bezeichnet, besteht initial aus funktionell geschädigten, strukturell aber noch intakten Zellen, die über Kollateralgefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Während eine Reduktion der Gewebsnekrosen im Infarktkern nach stattgehabter zerebraler Ischämie nicht möglich ist, kann durch protektive Prozesse in der Penumbra die endgültige Ausdehnung eines Infarktes verringert werden. Minderperfundiertes Gewebe überlebt bei erhaltener Sauerstoffwechselrate bei der Hälfte der Patienten bis zu 17 Stunden. Die Penumbra kann insgesamt bis zu 50 % des Infarkt volumens ausmachen und bietet daher große therapeutische Interventionsmöglichkeiten [Furlan et al. 1996, Heiss et al. 1999].

Die Schädigungskaskade eines ischämischen Schlaganfalles ist multifaktoriell. Eingeleitet wird diese Kaskade mit der Phase der Exzitotoxizität. Dieser folgen über-

lappend die Phasen der Peri-Infarkt-Depolarisation, der Inflammation und der Apoptose.

Kaskade der pathophysiologischen Ereignisse nach zerebraler Ischämie

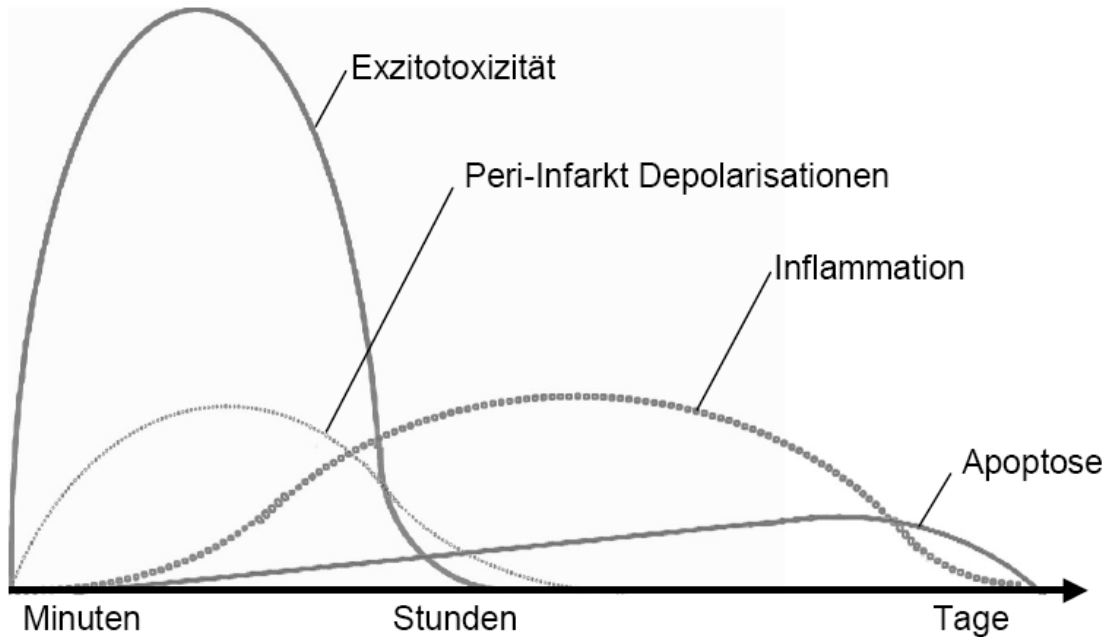


Abbildung 1: Bei Unterbrechung der Nährstoffversorgung kommt es innerhalb von Minuten durch Exzitotoxizität zur Zellschädigung. Durch die Peri-Infarkt-Depolarisation und die später einsetzende Inflammation wird umliegendes Gewebe geschädigt und geht konsekutiv in Apoptose [Dirnagl et al. 1999].

3.1.1 Die Exzitotoxizität

Während der Phase der Exzitotoxizität kommt es primär zum Versagen des Funktionsstoffwechsels. Nach dem Verschluss eines cerebralen Gefäßes führt der Energiemangel über eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase zur zellulären Akkumulation von Na^+ und Ca^{2+} und zu einer Zunahme der extrazellulären K^+ -Konzentration und damit zur Depolarisation. Dies führt zum Cl^- -Einstrom mit konsekutiver Zellschwellung und Zelltod. Zudem fördert die Depolarisation die Ausschüttung exzitatorischer Transmitter wie Glutamat. Die Wiederaufnahme von Glutamat ist durch den Energiemangel gestört. Es kommt zu einer Akkumulation im synaptischen Spalt. Dies bedingt eine vermehrte Aktivierung von Glutamatrezeptoren (AMPA- und NMDA-Rezeptoren) [Rogers und Hunter 1997]. Die Aktivierung sowohl Glutamatrezeptor-assoziiertes

(AMPA- und NMDA-Rezeptoren) als auch spannungsabhängiger Ionenkanäle an der postsynaptischen Membran bewirkt einen beschleunigten Einstrom von Na^+ , Ca^{2+} , Cl^{2-} und H_2O in die Zelle. Hierdurch kommt es zur Zellschwellung, dem Hirnödem [Choi 1996, Dirnagl et al. 1999]. Die Zelldehnung bewirkt ein zusätzliches Membranleck für den Eintritt von Ca^{2+} -Ionen [Sackin 1995]. Die intrazelluläre Kalziumüberladung und fehlende Sequestrierung von Ca^{2+} -Ionen im endoplasmatischen Retikulum bewirkt in Neuronen die Freisetzung der zytosolischen Protease Caplain, die zur Zytoskelettdegeneration führt und zur Störung axonaler Transportprozesse beiträgt.

3.1.2 Die Peri-Infarkt Depolarisation

Die Elimination der exzitatorischen Transmitter im synaptischen Spalt und die Repolarisation der Zelle erfordern einen hohen Energieaufwand. Im Ischämiekern führt der Energiemangel zur anoxischen Depolarisation ohne Repolarisation. Aufgrund der Instabilität folgen weitere Depolarisationen. Diese Peri-Infarkt-Depolarisationen treten oszillierend auf. Der hieraus resultierende Energiemehrbedarf führt zur weiteren Zellschädigung. Je öfter solche Peri-Infarkt-Depolarisationen erfolgen, umso größer ist der Ischämieschaden des Infarktgebietes.

Die Intensität der Exzitotoxizität entscheidet schlussendlich über den programmierten Zelltod, die Apoptose, im Rahmen verzögerter neuronaler Zelluntergänge und die Nekrose, bei der primär das Versagen metabolischer Prozesse mit Verlust der Membranintegrität der Zellen im Vordergrund steht. Der nekrotische Zelltod ist morphologisch gekennzeichnet von einer ischämischen Zytoplasmaschwellung, Zytoplasmaproduktion, Dilatation des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und der Ablösung einzelner Ribosomen vom rauhen endoplasmatischen Retikulum. Am Ende ist die Plasmamembran und die Membran des Zellkerns zerstört [Van Lookeren Campagne et al. 1996].

3.1.3 Die Inflammation

Die Schädigung der Zellen durch Radikale, Exzitotoxizität und Hypoxie induzieren die Phase der Inflammation, die bereits wenige Minuten nach einer cerebralen Ischämie eintritt und mehrere Tage anhält. In der Frühphase werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die zur Aktivierung der Mikroglia und zur Leukozyteninfiltration führen. Die Leukozyteninfiltration führt zu einer Störung der Mikrozirkulation im ischämischen

Infarktgebiet. Durch toxische Freisetzung von Zwischenprodukten durch Granulozyten und durch einen intrazellulären Kalziumanstieg kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid über die Stickstoffmonooxidase (NOS) [Nathan und Xie 1994, Iadecola et al. 1995]. Zu einer gesteigerten Stickstoffmonoxidsynthese im Ischämiegebiet trägt zu dem die (Calcium-unabhängige) induzierbare Isoform der Stickstoffmonooxidase (iNOS) bei, deren Bildung durch Zytokine in vaskulären Endothelzellen stimuliert wird [Iadecola et al. 1995, Galea und Glickstein et al. 1998, Galea und Golanov et al. 1998, Grandati et al. 1997]. Bei einer erhöhten iNOS-Konzentration kommt es zu einem Anstieg der Apoptoserate [Andreka et al. 2001, Khan et al. 2005]. NO kann seine Wirkung sowohl über die von zyklischem-Guanosin-3-,5-Monophosphat (cGMP)-abhängige Signaltransduktion durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase als auch über das DNA-schädigende Peroxynitrit (ONOO^-) vermitteln. Erhöhtes NO kann unter ischämischen Bedingungen die Energiegewinnung stören [Dawson et al. 1996]. Unter dieser Wirkung kommt es zur verstärkten Expression von Cyclooxygenase II (COX-II), dem Schlüsselenzym der proinflammatorischen Prostaglandinbiosynthese [Nogawa et al. 1998]. COX-II wirkt vasokonstriktorisch und plättchenaggregierend. Nach dem Ereignis umgeben nach wenigen Stunden neutrophile Granulozyten, aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten das Infarktterritorium. Ischämische Neurone, Gliazellen und Endothelzellen der nekrotischen Zentralzone und der Penumbra setzen Zytokine frei, die proinflammatorisch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen bewirken. Eine erhöhte Expression beispielsweise von IL- β , IL-6, IL-8, TNF- α und Wachstumsfaktoren ist über mehrere Tage nachweisbar [Feuerstein et al. 1998].

3.1.4 Apoptose beim ischämischen Schlaganfall

Aufgrund dieser Schadenskaskaden sterben Hirnzellen durch Apoptose oder Nekrose ab. Die Art des Zelltodes wird durch das Ausmaß der Zellschädigung bestimmt. Die Apoptose stellt eine Sonderform des Zelluntergangs dar mit Initiierung eines aktiven, energieverbrauchenden „Todesprogramms“ der Zelle ohne entzündliche Begleitreaktion [Padosch und Böttiger 2003]. Dieser Zelluntergang ist gekennzeichnet durch eine Zytoplasmaschrumpfung, einen Erhalt der Membran- und Mitochondrienintegrität, Abwesenheit von Entzündungsreaktionen, kondensiertes randständiges Chromatin sowie durch Zytoplasmafragmente (Apoptosekörperchen = apoptotic bodies)

[Thompson et al. 1995]. Endonukleasen bewirken die internukleosomale Fragmentierung der DNA [Kerr et al. 1972]. Anhand von Membranveränderungen wie z.B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran werden die schrumpfenden Zellen und die „apoptotic bodies“ erkannt und phagozytiert. Die sterbenden Zellen pumpen Ionen, vor allem K^+ , nach extrazellulär und kontrahieren ihr Zytoskelett, dadurch wird die Phagozytose erleichtert. Auf diese Weise werden die Zellbestandteile im Organismus wieder recycelt. Der gesamte Vorgang ist zu keiner Zeit mit einer Entzündungsreaktion verbunden [Kerr et al. 1972]. Die Hauptaufgabe der Apoptose liegt in der Beseitigung geschädigter, infizierter oder transformierter Zellen im Organismus, in der Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen während der Wachstumsphase, sowie der Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen. Bei Inaktivierung der Apoptose kommt es zu einer Zellwucherung, bei einem Überschuss zu einer degenerativen Erkrankung. Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren sind Induktoren der Apoptose. Diese Rezeptoren übertragen ein apoptotisches Signal nach Bindung eines Liganden. Dies führt zu einer Aktivierung von Caspasen (intrazelluläre Proteasen), was innerhalb weniger Stunden zum programmierten Zelltod führt [Wiens 2004]. Die Caspasen lassen sich in drei Subfamilien einteilen. Sie werden als Proenzyme exprimiert und bei einer Aktivierung proteolytisch an Konsensussequenzen voneinander getrennt. Danach vereinen sich zwei große und zwei kleine Proteine zu einem aktiven Tetramer. Die Initiator-Caspasen initiieren durch Aktivierung weiterer Caspasen die Effektorphase der Apoptose und verursachen letztendlich den Zelltod. Nach einem ischämischen Schlaganfall können sich die Neurone der Apoptose unterziehen. Die Apoptose und Regeneration stehen in einem engen Zusammenhang. Der letal geschädigte Infarktkern kann nicht regeneriert werden.

3.2 Veränderung der Genexpression beim ischämischen Schlaganfall

Ein ischämischer Schlaganfall verändert das Genexpressionsmuster in den Neuronen. Ursächlich hierfür ist die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche zum Teil durch Proteinkinasen direkt oder indirekt aktiviert werden [Feuerstein et al. 1998]. Sie binden sich im Zellkern an DNA-Erkennungssequenzen und aktivieren die Transkription protektiver Gene wie z. B. des Aktivatorproteins 1 (AP-1). Das AP-1 ist ein Regulatorprotein, welches an eine

spezifische DNA bindet und die Expression späterer Effektorgene bewirken kann. Die molekulare Zusammensetzung des AP-1 ist heterogen. Das AP-1 besteht aus zwei Untereinheiten und ist ein Dimer. Die Bestandteile rekrutieren sich hauptsächlich aus Mitgliedern der b-ZIP-Super-Proteinfamilie, welche ihrerseits aus den Jun-Proteinen (c-Jun, JunB, JunD) und Fos-Proteinen (c-Fos, FosB, fra1, fra2) besteht. Jun-Proteine können im Unterschied zu den Fos-Proteinen sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden, Fos-Proteine bilden nur Heterodimere [Steinmüller et al. 2001]. Die verschiedenen AP-1 Komplexe binden mit unterschiedlicher Affinität an TRE-ähnliche Promotersequenzen. Ihre Wirkung können transkriptionsaktivierend oder- hemmend sein und bewirken die Expression von verschiedenen Target-Genen [Curran und Morgan 1995, Hiroi et al. 1998].

AP-1 ist an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie der Proliferation, Apoptose und Zellregeneration beteiligt. Die Expression kann über das Ausmaß der Zellregeneration oder Apoptose entscheiden und erreicht den Höhepunkt in den ersten Stunden nach einer cerebralen Ischämie. Der AP-1 Komplex lässt sich unter normalen physiologischen Bedingungen im zentralen Nervensystem nachweisen [Herdegen und Leah 1998]. Ein cerebrale Ischämie verursacht eine rasche Induktion von c-Fos und c-Jun im gesamten ipsilateralen Kortex [Gass et al. 1992]. So wurden c-Fos und c-Jun in Neuronen in der Apoptose nachgewiesen [Walton et al. 1998, Estus et al. 1994, Ham et al. 1995]. Die Regenerations- und Überlebensfähigkeit der Neurone korreliert mit der Expression von c-Jun [Herdegen et al. 1997]. Der AP-1-Komplex bindet an die Bindungsstelle der Promoter/ oder Enhancer-Regionen der Gene. Viele Studien haben in den letzten Jahren eine Aktivierung unterschiedlicher AP-1 Komplexe durch eine große Anzahl von verschiedenen Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen nachgewiesen [Herdegen und Leah 1998, Kasibhatla et al. 1998]. In einer weiteren Studie wurde eine Beteiligung der „c-Jun-N-terminal-Kinase“ (JNK), einem Mitglied der MAP-Kinasen-Familie, an der Apoptoseinduktion durch NO nachgewiesen. Die Aktivierung der Kinase ist für die Aktivierung des AP-1 notwendig. Die zentrale Rolle von AP-1 wurde durch Abfangen desselben mittels Decoy-Oligonukleotiden gezeigt. Dies reduzierte die durch den NO-Donor (+/-)-S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) induzierte Apoptoserate deutlich [Taimor et al. 2001]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 einen bedeutenden Anteil an der intrazellulären Signalkaskade der NO-induzierten Apopto-

se darstellt. Weiter scheint AP-1 über eine Regulation von Bcl-2 Einfluss auf die Induktion der Apoptose im geschädigten Areal zu nehmen. Bcl-2 und auch Bcl-XL ermöglichen eine erhöhte Resistenz gegen ischämische Ereignisse und wirken durch Inhibition mitochondrialer Permeabilität und Formierung freie Radikale neuroprotektiv. Bcl-2 beispielsweise blockiert die hypoxie-induzierte Apoptose [Shimizu et al. 1996]. Somit wirken Bcl-2 und Bcl-XL antiapoptotisch. Es konnte eine zeitgleiche Aktivierung von c-Fos und eine Downregulation von Bcl-2 in infarziertem Hirngewebe nachweisen werden [Gillardon et al. 1996], was auch einen möglichen Einfluss des AP-1 auf die Bcl-2 vermittelten Wirkungen hinweisen könnte. Eine erhöhte c-Fos und c-Jun Expression könnte somit über eine Downregulation von Bcl-2 zu einer Induktion der Apoptose neuronaler Zellen führen [Dai et al. 1999, Gillardon et al. 1996].

3.3 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein endokriner Regulationsmechanismus zur Konstanthaltung von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck. Renin stammt aus den Granulazellen des juxtamedullärem Apparates der Niere und ist selbst kein Hormon, sondern ein proteolytisches Enzym. Es steuert die Bildung von Angiotensin II (Ang II). Ang II ist ein für die Blutdruckregulierung und Elektrolytbilanzierung wichtiges Hormon. Es wirkt vasokonstriktorisch und bewirkt die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere und führt so zu einer Blutdruckerhöhung. Die enzymatische Kaskade des RAS beginnt mit der Abspaltung des Dekapeptides Angiotensin I von Angiotensinogen durch Renin. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) verkürzt Angiotensin I um weitere 2 Aminosäuren, und es entsteht das Oktapeptid Ang II. Ang II bindet an spezifische Rezeptoren, wobei die Subtypen 1 und 2 (AT1, AT2) zum heutigen Zeitpunkt am besten charakterisiert sind [Lavoie und Sigmund 2003].

Die Bildung der Hauptkomponenten des RAS erfolgt in unterschiedlichen Organen. Angiotensinogen wird in der Leber, Renin in der Niere und das Angiotensin-Converting-Enzym in Gefäßendothelzellen der Lunge gebildet. Die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II findet im Plasma statt [Sturrock et al. 2004]. Neben diesem Plasma-RAS existieren auch so genannte Gewebe-Renin-Angiotensin-System. Hierunter versteht man die Expression aller RAS-Komponenten in einem Gewebe unabhängig von den Komponenten aus dem Plasma. Solche Gewebe-RASs sind

unter anderem in Herz, Gehirn, Gefäßwänden und Niere beschrieben [Lavoie und Sigmund 2003].

3.3.1 Angiotensin-Rezeptoren

Die bedeutendsten Angiotensin-Rezeptoren werden als AT1- und AT2-Rezeptoren bezeichnet. Rezeptoren mit der höchsten Affinität zu AT1-Rezeptor-Antagonisten und der niedrigsten Affinität zu AT2-Rezeptor-Liganden wie CGP42112A und PD123177 werden als AT1-Rezeptoren bezeichnet. Rezeptoren mit der höchsten Affinität zu CGP42112A und PD123177 und der niedrigsten Affinität zu Losartan werden als AT2-Rezeptoren bezeichnet [de Gasparo 2000].

Die klassischen Funktionen von AT1-Rezeptoren sind generalisierte Vasokonstriktion, Zellwachstum in den Gefäßen, Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde, eine höhere Natriumabsorption im proximalen Nierentubulus sowie die Erhöhung von Herzfrequenz und Kontraktilität durch Noradrenalinfreisetzung in synaptischen Nervenendigungen [Unger 2000]. Über den auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisierten AT1-Rezeptor bewirkt Ang II die Kontraktion präkapillärer Arteriolen und in geringerem Maße postkapillärer Venolen. Ang II wirkt auf glatte Gefäßmuskelzellen mitogen und bewirkt über die Produktion von Wachstumsfaktoren die Synthese von extrazellulärer Matrix. Ang II verstärkt adrenerge Stimuli durch erhöhte Freisetzung von Noradrenalin aus den terminalen synaptischen Nervenendigungen und durch verbessertes Ansprechen der Gefäße auf Noradrenalin. Der Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung kommt durch präsynaptische AT1-Rezeptoren zustande [Balt et al. 2001]. Man fand heraus, dass die Ang II-Wirkungen wie Konstanthaltung von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck fast ausschließlich über den AT1-Rezeptor vermittelt werden. Ang II wirkt über den AT1-Rezeptor zudem fördernd auf die Zellproliferation und -hypertrophie sowie auf inflammatorische Prozesse.

Die AT2-Rezeptor vermittelten Wirkungen umfassen Anti-Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Anti-Fibrose und Anti-Inflammation. Der geförderte Stillstand der Zellteilung ist Voraussetzung für die nachfolgende Zelldifferenzierung [Laflamme et al. 1996, Rodriguez-Pallares et al. 2004] und Apoptose. Bei pathologischen Prozessen wie Nervenschädigung oder Myokardinfarkt ist die Expression von AT2-Rezeptoren verstärkt [Busche et al. 2000, Gallinat et al. 1998]. Bei der Blutdruckregulation kommt dem AT2-Rezeptor die Rolle des Modulators zu.

Die AT2-Rezeptor vermittelten Wirkungen sind zum großen Teil den AT1-Rezeptor vermittelten Effekten entgegengesetzt sind. Durch die Gegensätzlichkeit der Wirkungen kann Ang II in einem Gewebe je nach aktuell dominierendem Rezeptor-Subtyp völlig unterschiedliche Effekte auslösen [de Gasparo et al. 2000]. Zusammenfassend scheint es auf funktioneller Ebene [Unger 1999] und auf der des intrazellulären Signalwegs [Sadoshima 2000, Carey et al. 2000] einen negativen bzw. modulierenden Crosstalk zwischen AT2- und AT1-Rezeptoren zu geben.

3.3.2 *Signaltransduktion der AT1/AT2- Rezeptoren*

AT1-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die durch das G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C führt zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃), welches zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt. Daraus resultieren eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und eine Aldosteronsekretion aus der Nebenniere. Die Aktivierung der Proteinkinase C führt zu einer Phosphorylierung der Schlüsselproteine, die sowohl bei der Gefäßkontraktion als auch beim Zellwachstum eine wichtige Rolle spielen. Zudem übt Ang II seine Wirkung über eine Aktivierung von Tyrosinkinasen aus, welche Proteine phosphorylieren, unter anderem Proteine, die an der Translokation der MAP-Kinasen (mitogen-aktivierten Proteinkinase) in den Nucleus beteiligt sind. Die meisten Signalwege mit einer Beteiligung der MAP-Kinase wurden mit Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung und Gefäßkontraktion in Zusammenhang gebracht [Yang et al. 1997, Huang et al. 1996]. Durch so eine Kaskade von Phosphorylierungen kommt es zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie c-Fos und c-Jun. So kann Ang II die Regulation der Genexpression beeinflussen [de Gasparo et al. 2000].

Die Signaltransduktion der AT2-Rezeptoren unterscheidet sich fast gänzlich von denen der AT1-Rezeptoren. Die Aktivierung von Protein-Phosphatasen spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung AT2-Rezeptor-gekoppelter Effekte. Identifiziert sind die Serin/Threonin-Phosphatase PP 2A (Protein-Phosphatase 2A) und die Tyrosin/Threonin-Phosphatase MKP-1 (Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase1) als auch die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (SH2-domain containing phosphatase 1) [Nouet und Nahmias 2000]. Diese Phosphatasen dephosphorylieren unter anderem auch Moleküle, die durch AT1-Rezeptor stimulierte Kinasen phosphoryliert werden, so dass an dieser Stelle auf Signaltransduktionsebene ein Crosstalk zwischen den

Effekten des AT1- und des AT2-Rezeptors besteht. Ein weiterer, wichtiger Signaltransduktionsweg scheint die vermehrte Bildung von NO und cGMP zu sein. Cyclisches GMP wiederum vermittelt viele der biologischen Aktionen von NO wie Vasodilatation, Natriuresis und Wachstumshemmung und Differenzierung [Nouet und Nahmias 2000, Gohlke et al. 1998]. Bei der AT2-Rezeptor-induzierten Zellapoptose besteht ein Teil der Signalkaskade in der vermehrten Synthese von Ceramiden, die wahrscheinlich die Aktivierung von Caspase 3 induzieren [Gallinat et al. 1999].

3.3.3 *Das Renin-Angiotensin-System im Gehirn*

Alle Komponenten des RAS wurden auch im Gehirn nachgewiesen. Ang II wird im Gehirn unabhängig von peripheren Organen gebildet. Die Hauptwirkung entfaltet Ang II über den AT1-Rezeptor und den AT2-Rezeptor. Beim AT1-Rezeptor lassen sich 2 Isoformen unterscheiden: AT1a-Rezeptor und AT1b-Rezeptor. Ang II beeinflusst am AT1-Rezeptor im Gehirn zahlreiche physiologische Prozesse wie die Regulation des Blutdruckes, die Wasser-/ Salzaufnahme, Natriuresis und Ausschüttung von Vasopressin. Der AT2-Rezeptor wird vor allem im fötalen Gewebe exprimiert und aus diesem Grund mit Zellentwicklung und Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht. Nach der Geburt sinkt der Anteil des Rezeptors zugunsten des AT1-Rezeptors [Tsumi et al. 1991]. Eine Studie mit zentral appliziertem Ang II führte bei Mäusen zu einem Blutdruckanstieg über AT1a und einem Anstieg der Trinkantwort über AT1b-Rezeptoren [Davisson et al. 2000]. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte zerebrale Aktivität des RAS-Systems entscheidend für die Auslösung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie sein kann. Bei hypertensiven Tieren fand sich eine Erhöhung der Ang II-Spiegel sowie eine Erhöhung des AT1-Rezeptorbestandes [Raizada et al. 1993, Saavedra 1992]. Nakamura et al. zeigte, dass normotensive Ratten nach einem in-vivo-Genstransfer von menschlichem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) erhöhte Ang II-Spiegel im Gehirn sowie eine Hypertonie entwickelten [Nakamura et al. 1999]. In weiteren Studien fand man heraus, dass zentral appliziertes Ang II dosisabhängig zu einer Beeinflussung des Barorezeptorreflexes und damit zur Beeinflussung des Blutdruckes führt [Paton et al. 1999]

Die zirkumventrikulären Organe, der Nucleus präopticus medianus und die Lamina terminalis repräsentieren Bereiche der Perzeption und Integration von Signalen, die zu einem Durstgefühl und zur Salzaufnahme führen. Verbunden sind diese Regionen

durch den Hypothalamus vor allem mit den paraventriculären und supraoptischen Kernen, dem limbischen System und dem Hirnstamm. Die zirkumventrikulären Organe besitzen keine Bluthirnschranke. Zu ihnen gehören das Organum vasculosum laminae terminalis, das Subfornikalorgan und die Area postrema. Alle besitzen AT1-Rezeptoren, welche in Interaktion sowohl mit dem bluteigenen als auch mit dem im Gehirn gebildeten Ang II treten können [Muratani et al. 1996]. Projektionen zu den präoptischen, hypothalamischen und limbischen Strukturen bedingen eine Trinkantwort und sind entscheidend in der Kontrolle des Salzappetites [Fitzsimons 1998].

3.3.4 *Regeneration der Neurone*

Nach Myokardinfarkten fand sich ein Anstieg der AT2-Rezeptoren im geschädigten Gewebe [Unger 1999]. Durch Stimulation des AT2-Rezeptors in neuronalem Gewebe fanden sich Effekte, welche man auch bei Regenerationsvorgängen fand [Lucius et al. 1998]. Bei Nervenquetschungen peripherer Nerven fand sich eine Hochregulation sowohl der AT1-Rezeptoren als auch der AT2-Rezeptoren, wobei die zeitabhängige Hochregulation der AT2-Rezeptoren mit einer erfolgreichen Regeneration der Nervenfasern einherging [Gallinat et al. 1998]. Eine andere Arbeit zeigte, dass diese Ergebnisse auf das zentrale Nervensystem übertragbar sind. Unter in vitro durchgeführten Bedingungen zeigte man an postnatalen Retinaexplantaten, dass Ang II konzentrationsabhängig AT2-Rezeptor-vermittelt zu einem Auswachsen der Neuriten führte. Gleiche Ergebnisse fanden sich unter vivo Konditionen an Quetschpräparaten des Nervus opticus [Lucius et al. 1998]. Vor allem die Aktivierung des AT2-Rezeptors führt somit zu einer axonalen Regeneration nach neuronalen Läsionen.

3.3.5 *Angiotensinrezeptorantagonisten*

Die heute zur Verfügung stehenden AT1-Rezeptorantagonisten besitzen eine hohe Selektivität für diesen Rezeptorsubtyp. Effektiv werden diese zur Behandlung einer arteriellen Hypertonie eingesetzt. Hierbei handelt es sich um nicht-peptidische Antagonisten, welche zur oralen Behandlung zur Verfügung stehen. Die unterschiedlichen Präparate unterscheiden sich in ihrer Rezeptoraffinität und der Wirkdauer.

Angiotensin-Antagonisten hemmen kompetitiv oder auch, wie Candesartan, nicht-kompetitiv und selektiv die durch Ang II hervorgerufenen Wirkungen am Angiotensin-II-Typ1-(AT1-) Rezeptor.

In vitro konnte gezeigt werden, dass Candesartan eine sehr hohe Affinität zum AT1-Rezeptor aufweist mit längerandauernder Rezeptorhemmung, verglichen mit anderen AT1-Rezeptorantagonisten [Vanderheyden et al. 1999]. Es zeigte sich, dass Candesartan zur effektivsten Blockade zerebraler AT1-Rezeptoren führte. Candesartan führte hierbei zu einer kompletten 24-stündigen Blockade der zentralen Rezeptoren und konnte 5-10x niedriger dosiert werden als zum Beispiel Ibesartan und Losartan [Culman et al. 2002, Gohlke und Von Kügelgen et al. 2002]. Durch die einmalige tägliche Gabe und die gute Verträglichkeit konnten auch die Patienten mit einer mangelnden Compliance zu einer dauerhaften, blutdrucksenkenden Therapie motiviert werden. Eine dauerhafte, systemische Behandlung mit Candesartan reduzierte dosisabhängig die Interaktion von Ang II am AT1-Rezeptor sowohl im Gehirn als auch außerhalb der Bluthirnschranke [Nishimura et al. 2000 a)]. Durch die nachgewiesene effektive und langandauernde Rezeptorblockade wurde Candesartan in dieser Studie gewählt [Gohlke und Von Kügelgen et al. 2002, Culman et al. 2002].

3.4 Ziel der Studie

Aufgrund der oben beschriebenen Funktionen des RAS wurde eine mögliche neuroprotektive Wirkung von AT1-Blockern bei der Therapie eines ischämischen Schlaganfalles vermutet. In daraufhin durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen und klinischen Studien zur AT1-Rezeptor-Blockade und deren Auswirkungen auf Inzidenz und Ausmaß von Hirninfarkten konnte in den letzten Jahren mehrfach ein deutlicher Benefit dieser Behandlungen mit einer konsekutiven Verbesserung der neurologischen Ausfälle und einer Reduktion des Infarktareals nachgewiesen werden. Inwieweit hierbei eine vollständige Blockade zentraler AT1-Rezeptoren ohne Beeinflussung peripherer, vaskulärer AT1-Rezeptoren eine Rolle für die beobachteten neuroprotektiven Effekten spielt, konnte noch nicht mit abschließender Sicherheit geklärt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkungen des AT1-Blockers Candesartan auf einen ischämischen Insult durch eine rein zentrale AT1-Blockade zu untersuchen. Hierzu wählten wir ein Tiermodell mit direkter intracerebroventrikulärer Applikation von Candesartan bei der normotensiven Ratte und untersuchten die Auswirkung der Therapie auf eine mögliche Neuroprotektion bei einem Schlaganfall.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten normotensive, männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200 bis 300 Gramm, die über den Züchter Charles River (Sulzfeld/ Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden hinsichtlich Temperatur (25 °C), Luftfeuchtigkeit (60 %) und Tag-Nacht-Rhythmus (12/12 Stunden) unter standardisierten Bedingungen in fensterlosen Räumen in Makrolonkäfigen zu zweit oder dritt gehalten. Die Tiere erhielten bis zum Versuch freien Zugang zu Trockenfutter¹ und Wasser. Alle Versuche wurden im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben durchgeführt.

4.2 Anästhesie und Narkose

Die Narkose wurde mittels einmaliger intraperitonealer Injektion von Chloralhydrat (400 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt.

4.3 Vorversuche: Experimentelles Vorgehen

4.3.1 Intraventrikuläre Candesartanapplikation via osmotischer Pumpe

Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurden osmotischen Pumpen² steril mit verschiedenen Konzentrationen Candesartan (4.2 ng/kg Körpergewicht/die, 12.6 ng/kg Körpergewicht/die, 41.8 ng/kg Körpergewicht/die) befüllt. Der Querschnitt der kokonförmigen Pumpe besteht aus einer äußeren semipermeablen Membran, einer Kammer mit einem osmotischen Agents (hochkonzentrierte Natriumchloridlösung) und der inneren nicht permeablen, jedoch flexiblen Wand für die zu verabreichende Substanzlösung. Die Funktionsweise beruht auf dem Einstrom von Flüssigkeit durch die semipermeable Membran, der daraus folgenden Volumenerhöhung in der äußeren

¹ Altromin 1324®

² 2ML4 (Fa. Alzet, USA)

Kammer und der damit verbundenen Kompression der inneren Kammer. An der Pumpe wurde ein 3.5 cm langer Metallkatheter angebracht. Die befüllten Pumpen wurden über 24 Stunden in einem Wasserbad bei 37° Celsius erwärmt. Die tägliche Pumprate betrug bei 37 °C Körpertemperatur je nach Candesartankonzentration 0.1, 0.3 oder 1.0 nmol/h. Zum Versuch wurde der Kopf des Tieres in einem Stereotaxiergerät¹ fixiert. Dorsomedial im Nacken wurde nach Schur und Desinfektion ein etwa 2 cm Hautschnitt ausgeführt, mit einer stumpfen Schere eine subkutane Tasche im Bereich der linken Schulter präpariert und die Pumpe eingebracht. Nach Freilegung der Kalotte erfolgte mit dem Stereotaxiegerät die Bohrung eines Loches zur intraventrikulären Applikation (linksseitig 1.3 mm lateral und 0.6 mm caudal des Bregmas). Der mit der Pumpe verbundene Metallkatheter wurde nun über das Bohrloch in den Ventrikel eingeführt und mit Zahnzement fixiert. Die Laufzeit betrug fünf Tage.

¹ David Kopf Instruments

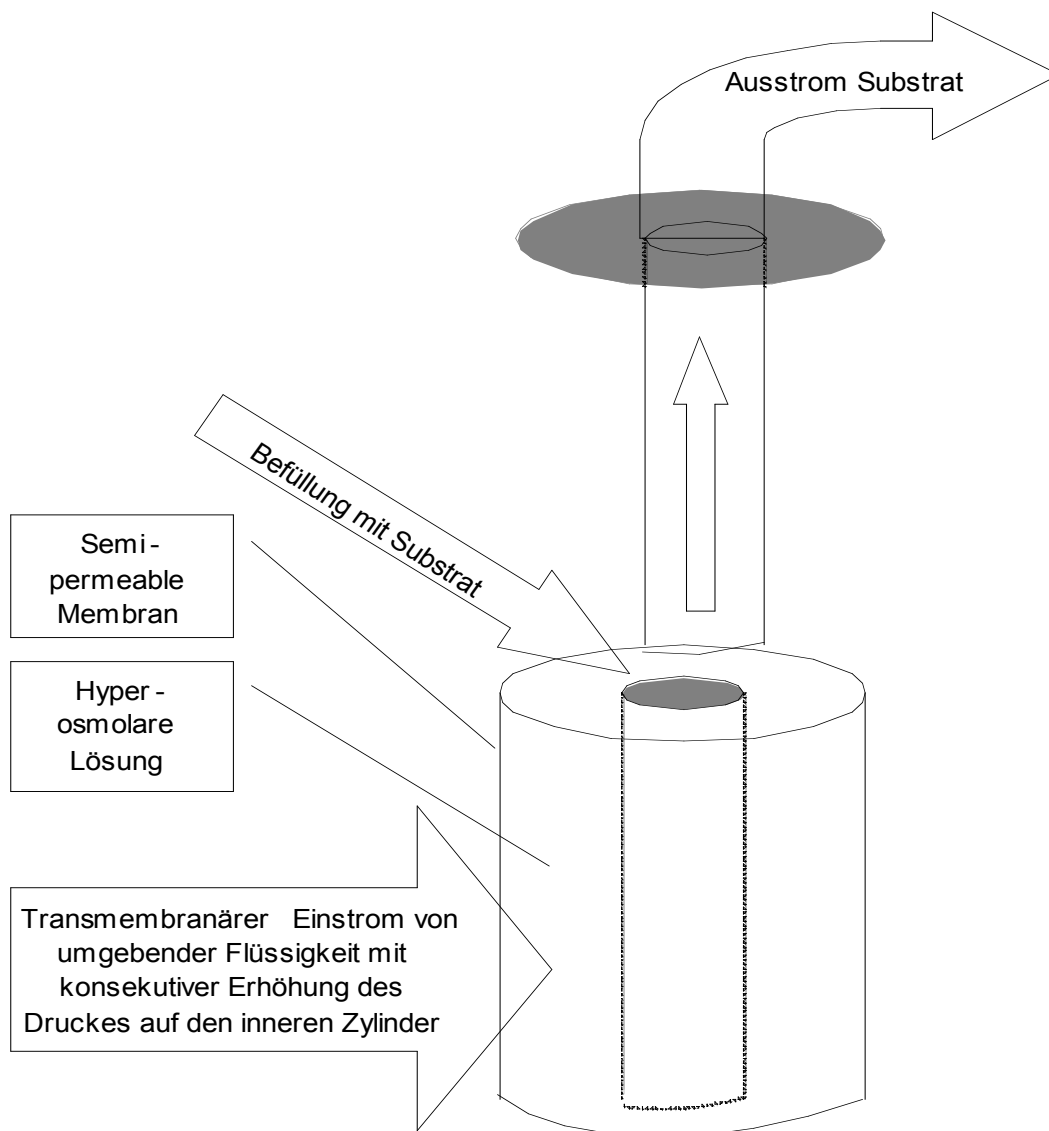


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der ALZET Osmotic Pump model 2ML4.

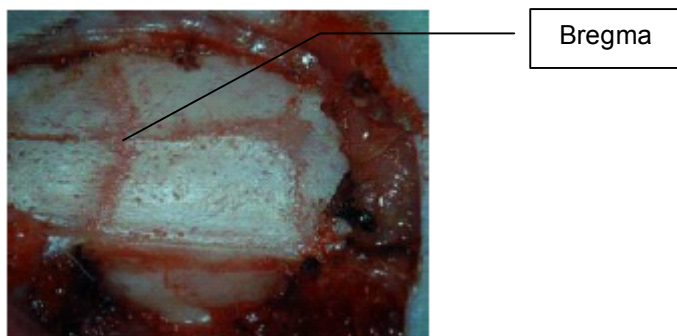


Abbildung 3: Intraoperative Sicht auf die Kalotte mit Schädelnähten.

4.3.2 *Ang II-Applikation via intraventrikulärer Kanüle oder transfemoralem Zugang*

Die Applikation von Ang II erfolgte je nach Versuchsgruppe entweder venös oder intraventrikulär. Im Falle der venösen Applikation wurde ein Polyethylenkatheter über die linke Femoralvene bis in die Vena cava inferior vorgeschoben. Nach Füllung des Katheters mit Heparin-NaCl 0.9 % wurde dieser subcutan bis zum Nacken des Tieres getunnelt und fixiert. Bei der intraventrikulären Applikation wurde analog der obigen Beschreibung ein zweites Bohrloch (rechtsseitig 1.3 mm lateral und 0.6 mm caudal des Bregmas) installiert und hierüber eine Plastikhülse (Innendurchmesser 1 mm) eingebracht und mit Hilfe von Zahn-Zement fixiert. Die Applikation erfolgte in beiden Fällen manuell mittels Spritze.

4.3.3 *Kreislaufmonitoring über transarteriellen Katheter*

In der rechten Leiste wurde ein Polyethylenkatheter über die Femoralarterie bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben und in gleicher Weise wie der venöse Katheter gefüllt, getunnelt und fixiert. Die Blutdruck- [mmHg] und Herzfrequenzmessung [1/min] erfolgte kontinuierlich¹, die Auswertung wurde Computer-gestützt durchgeführt.

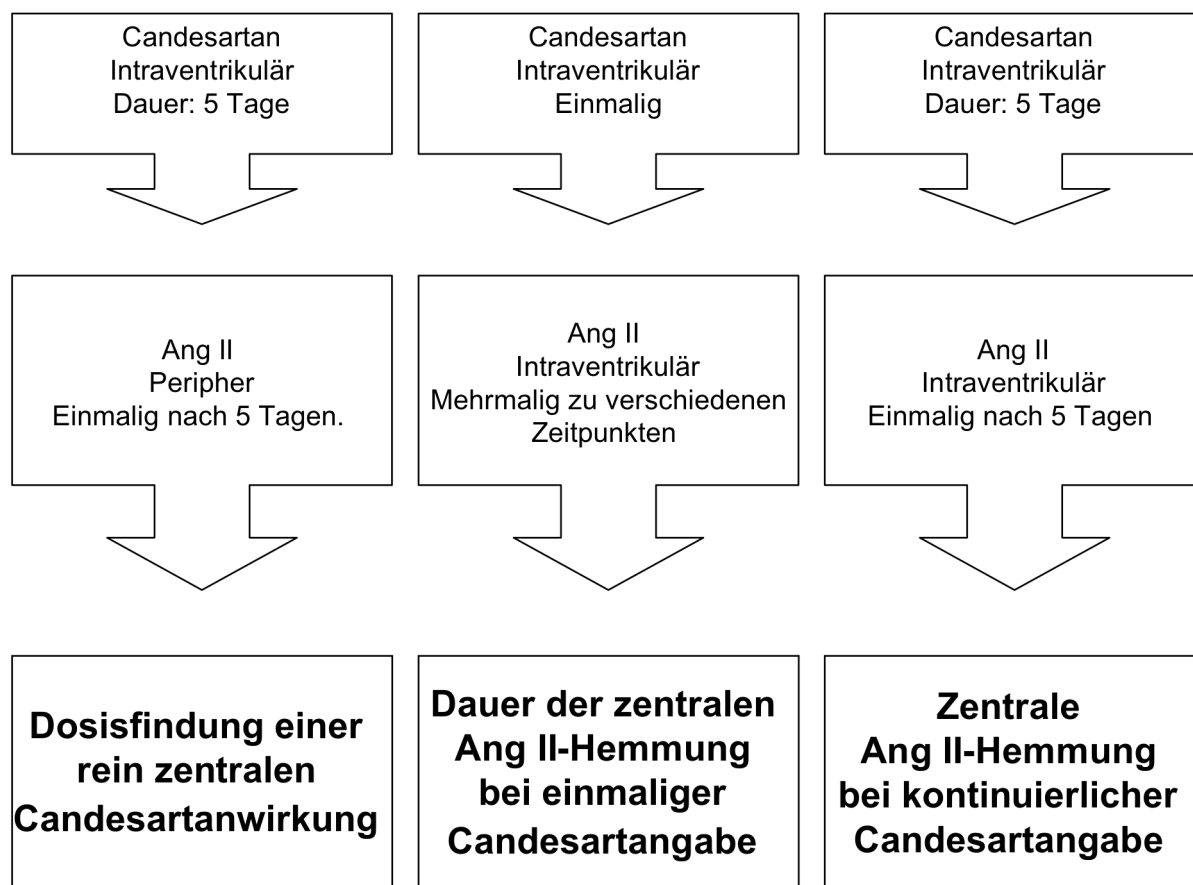
4.3.4 *Trinkversuch*

Durch Wiegen der Trinkgefäße vor und nach den Versuchen wurde die Flüssigkeitsaufnahme [ml] der Tiere bestimmt.

¹ DruckTransducer (DTX/Plus, Spectramed), Gold Brush Recorder

4.4 Vorversuche: Experimentelle Gruppen

Die Vorversuche gliederten sich in drei Gruppen.



4.4.1 Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung

Das Ziel dieser Gruppe war die Feststellung der Dosis von Candesartan bei intraventrikulärer Applikation, welche eine rein zentrale Wirkung bedingt. Hierzu wurde Candesartan in verschiedenen Dosierungen (0.1, 0.3, 1.0 nmol/h) intraventrikulär über fünf Tage mit der osmotischen Pumpe infundiert. Am vierten Tag erfolgte die Implantation des venösen und arteriellen Femoralkatheters. Am sechsten Tag wurde unter ständiger Kontrolle des Blutdruckes und der Herzfrequenz das nicht-Blut-Hirnschranken-gängige Ang II (50 ng/kg Körpergewicht) peripher über einen venösen Katheter infundiert. Hierdurch wurde untersucht, inwieweit das zentral gegebene Candesartan die periphere Wirkung von Ang II antagonisiert. Zur Kontrolle wurden

jeweils eine Gruppe mit zentraler Candesartan- und peripherer NaCl-Applikation sowie eine Gruppe mit zentraler NaCl- und peripherer Ang II-Applikation durchgeführt.

Die verwendeten Gruppen sind im Folgenden aufgeführt:

Kontrollgruppe Ang II (n=12):	- NaCl zentral für 5 Tage - Ang II 50 ng/kg KG peripher
Kontrollgruppe Candesartan: (n=9)	- Candesartan 1.0 nmol/h zentral für 5 Tage - NaCl peripher
Candesartan 0.1 (n=15):	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral für 5 Tage - Ang II 50 ng/kg KG peripher
Candesartan 0.3 (n=14):	- Candesartan 0.3 nmol/h zentral für 5 Tage - Ang II 50 ng/kg KG peripher
Candesartan 1.0 (n=8):	- Candesartan 1.0 nmol/h zentral für 5 Tage - Ang II 50 ng/kg KG peripher

4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartan-gabe

Ziel dieser Gruppe war die Feststellung der Dauer einer zentralen Ang II-Hemmung durch Candesartan. Hierzu wurde Candesartan in einer Dosis von 0.1 nmol/h intraventrikulär einmalig infundiert. Nach Injektion von Candesartan erfolgte in unterschiedlichen Zeitabständen (10 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h) die intraventrikuläre Applikation von Ang II (25 ng/kg Körpergewicht) mit konsekutiver Messung des peripheren Blutdruckes, der Herzfrequenz und des Trinkverhaltens. Als Kontrollgruppen dienten jeweils eine Gruppe mit alleiniger intraventrikulärer Applikation von Candesartan oder Ang II.

Die verwendeten Gruppen sind im Folgenden aufgeführt:

Kontrollgruppe Ang II (n=5):	- Ang II zentral einmalig 25 ng/kg KG
Kontrollgruppe Candesartan: (n=9)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig
Ang II 10 min nach Candesartan : (n=8)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig - Ang II 25 ng/kg KG zentral einmalig nach 10 min
Ang II 1 h nach Candesartan : (n=9)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig - Ang II 25 ng/kg KG zentral einmalig nach 1 h
Ang II 3 h nach Candesartan : (n=8)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig - Ang II 25 ng/kg KG zentral einmalig nach 3 h
Ang II 6 h nach Candesartan : (n=8)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig - Ang II 25 ng/kg KG zentral einmalig nach 6 h
Ang II 12 h nach Candesartan : (n=8)	- Candesartan 0.1 nmol/h zentral einmalig - Ang II 25 ng/kg KG zentral einmalig nach 12 h

4.4.3 Zentrale Ang II-Hemmung bei kontinuierlicher Candesartangabe

Ziel dieser Gruppe war die Bestätigung der zentralen Ang II-Hemmung durch kontinuierlich appliziertes Candesartan. Hierzu wurde Candesartan in einer Dosis (0.1 nmol/h) intraventrikulär über fünf Tage mit der osmotischen Pumpe infundiert. Am vierten Tag erfolgte die Implantation eines arteriellen Femoralkatheters zum Kreislaufmonitoring. Am sechsten Tag wurde Ang II in einer Dosis von 25 ng/kg Körpergewicht intraventrikulär appliziert. Nach Injektion von Ang II erfolgte die Messung des peripheren Blutdruckes, der Herzfrequenz und des Trinkverhaltens.

Die verwendete Gruppe ist im Folgenden aufgeführt:

Candesartan und Ang II zentral: - Candesartan 0.1 nmol/h zentral für 5
(n=6) Tage
- Ang II zentral einmalig 25 ng/kg KG

4.5 Hauptversuche: Experimentelles Vorgehen

4.5.1 Intraventrikuläre Candesartanapplikation via osmotischer Pumpe

Siehe 4.3.1

4.5.2 Fokale Gehirnschämie und Reperfusion

Aufgrund einer guten Kollateralisierung der Hirngefäße bei der Wistar-Ratte ist bei einem distalen Verschluss eines größeren Gefäßes ein Infarkt nicht sicher zu erwarten. Eine alleinige Okklusion der Arteria cerebri media bewirkt kaum gleichmäßig reproduzierbare Infarkte. Brint et al. konnten in ihren Studien über Rattenmodelle zeigen, dass der gleichzeitige Verschluss der ipsilateralen Arteria carotis communis und der Arteria cerebri media größere und besser reproduzierbare Infarkte verursacht [Brint et al. 1988]. Aus diesem Grunde verwendeten wir das Modell nach Koizumi [Koizumi et al. 1986]. Bei dieser Methode wird ein Monofilament¹ einseitig bis zur Arteria cerebri media vorgeschoben und gleichzeitig die Arteria carotis communis verschlossen. Zur Herstellung des Monofilaments wurde die Spitze eines Fadens¹ mit einer Silikonschicht² zur Vergrößerung des Durchmessers um etwa 0.25 mm überzogen. Am Hals erfolgte ventromedial ein ca. zwei cm langer Schnitt mit einer Schere. Mit atraumatischen Pinzetten wurden die medialen Halsmuskeln und der Thymus zur Seite präpariert. Zunächst wurde die rechte Arteria carotis communis von den umliegenden Gewebsstrukturen unter einem Operationsmikroskop freipräpariert und proximal der Bifurkation ligiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Präparation und Ligatur der Arteria carotis externa. Danach wurde die Arteria carotis interna in ihrem Verlauf

¹ 4/0, 1,5 Metrik, Monofilament, ETHILON, ETHICON GmbH & Co., KG, Deutschland

² Provil, Bayer AG, Deutschland

bis zum Canalis carotis an der Schädelbasis isoliert. Das Monofilament wurde nach der Arteriotomie vorgeschoben, bis bei ca. 17 mm ein Widerstand spürbar war. Der Widerstand resultierte aus dem Erreichen der Bifurkation zwischen Arteria cerebri anterior und Arteria cerebri media. Durch die Platzierung des Monofilaments in dieser Position wurde ein Verschluss der Arteria cerebri media erreicht. Das Monofilament wurde fixiert und 90 min nach Okklusion der Arteria cerebri media wieder entfernt. Die Okklusion mit einer Dauer von 90 min und die anschließende Reperfusion (Messdauer 30 min) wurde durch ein Doppler-Laser-Verfahren zur Blutflussmessung (LDF, siehe unten) überwacht. Während der Okklusion der Arteria cerebri media und der Reperfusion wurde mittels einer Heizdecke eine Körpertemperatur von 37 °C aufrechterhalten. Anschließend wurde die Wunde durch eine Naht versorgt.

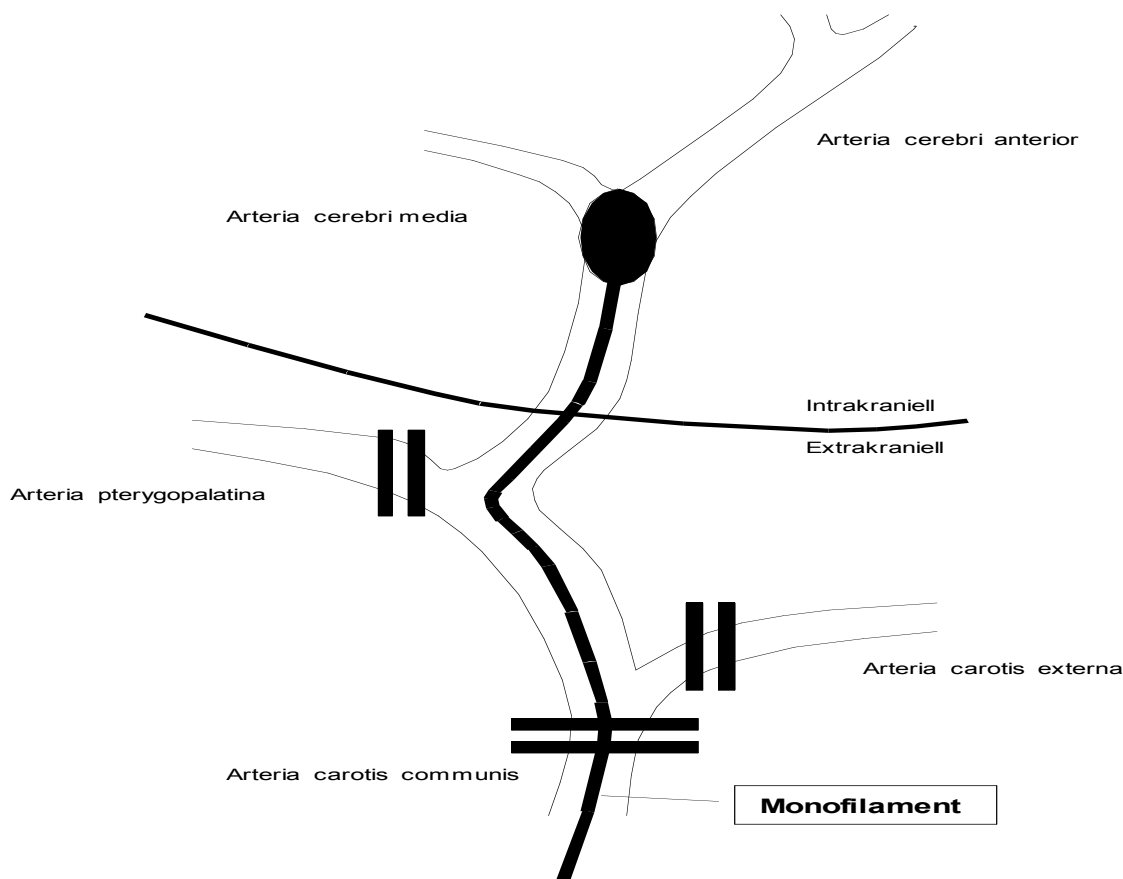


Abbildung 4: Anatomische Skizzen der Karotiden mit Verschluss der Acc und Acm.

4.5.3 Cerebrale Blutflussmessung

Die zerebrale Blutflussmessung [ml/min] wurde mittels semiquantitativer Bestimmung der regionalen kortikalen Perfusion durch LDF-Detektoren¹ durchgeführt. Hierzu wurde analog der Technik der zentralen Ang II-Applikation eine Hülse durch ein Bohrloch (rechtsseitig: 5 mm lateral und 1 mm caudal des Bregmas) eingebracht und darüber der LDF-Detektor platziert. Die Messung erfolgte über die 90 min der Okklusion der Arteria cerebri media und die ersten 30 min der Reperfusion. Dieses Verfahren erfasst in kleinen oberflächlichen Gewebevolumina den Blutfluss in der Mikrozirkulation [Skarphedinsson et al. 1988]. Dabei werden Blutfußgeschwindigkeiten von 0.01 bis 10 mm/s erfasst². Technische Grundlage der Messung ist das Doppler-Prinzip: von einem Laser emittiertes, monochromatisches Licht wird von den Erythrozyten reflektiert und durch deren Bewegung in der Frequenz verändert. Aus dem Spektrum der Frequenzveränderung kann die Flussgeschwindigkeit errechnet werden [Oberberg 1990]. In der Phase der Okklusion der Arteria cerebri media musste der ipsilaterale cerebrale Blutfluss um mindestens 25 % des Ausgangswertes abfallen, alle Tiere ohne ausreichenden Abfall wurden aus der Studie ausgeschlossen.

4.5.4 Neurologisches Defizits 24 h und 48 h nach Okklusion der Arteria cerebri media

Die neurologische Untersuchung jedes Tieres erfolgte 24 h und 48 h nach Ende der Okklusion der Arteria cerebri media. Diese wurde nicht selbst durchgeführt, um die Auswertung zu verblinden. Um die neurologischen Defizite zu quantifizieren, wurden die Skalen nach Bederson [Bederson et al. 1986] und nach Garcia [Garcia et al. 1995] verwendet.

4.5.4.1 Skala nach Bederson

In dieser Untersuchungsmethode wurden die Flexion der Vorderpfoten, eine Widerstandsprüfung auf seitlichen Druck und ein "Sich-im-Kreis-drehen" berücksichtigt. Bei

¹ Laser Doppler Flussmessung

² Moor instruments Ltd., Millwey, UK

Vorkommen eines der genannten Symptome wurde jeweils ein Punkt vergeben. Die Wertung reichte von 0 (= kein neurologisches Defizit) bis 3 (= maximales neurologisches Defizit) Punkte.

4.5.4.2 Skala nach Garcia

In dieser Untersuchungsmethode wurden sechs Teste durchgeführt.

1. Spontane Aktivität

Beobachtung des Bewegungsumfanges des Tieres über 5 min im offenen Käfig. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 0 Punkte für eine fehlende Bewegung
- 1 Punkt für minimale Bewegung
- 2 Punkte bei Bewegungen ohne Annähern an alle Seiten des Käfigs
- 3 Punkte bei Umherbewegung mit Erkundung des Käfigs und Zuwendung mindestens dreier Seiten des Käfigs

2. Die Symmetrie in der Bewegung aller vier Gliedmaßen

Beobachtung aller vier Gliedmaßen, während das Tier am Schwanz in die Luft gehoben wurde. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 0 Punkte bei Plegie der linken Vorderpfote
- 1 Punkt bei ausgeprägter Hemiparese links
- 2 Punkte diskreter Hemiparese links
- 3 Punkte für eine Symmetrie aller 4 Gliedmaßen

3. Ausstrecken der Vorderpfoten

Beobachtung des Bewegungsmusters der Vorderpfoten. Das Tier wurde mit den Vorderpfoten an eine Tischkante gesetzt und der hintere Teil des Körpers am Schwanz in die Luft gehoben. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 0 Punkte für keine Bewegung
- 1 Punkt für bei minimaler Bewegung der linken Vorderpfote
- 2 Punkte bei einem unsymmetrischen Gangbild mit geringerer Ausstreckung der linken Vorderpfote
- 3 Punkte für ein symmetrisches Gangbild mit symmetrischer Ausstreckung der Vorderpfoten

4. Klettern und Kraftprüfung

Das Tier wurde auf das Käfiggitter gesetzt. Ein gesundes Tier kletterte mit allen vier Gliedmaßen. Durch Zug am Schwanz des Tieres ließ sich die Kraft prüfen. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 1 Punkt, wenn kein Klettern möglich war oder das Tier sich nur in kreisenden Bewegungen fortbewegen konnte
- 2 Punkte bei Kraftminderung der linken Körperhälfte
- 3 Punkte bei problemlosen Hochklettern am Käfig

5. Körper-Propriozeption

Beobachtung der Reaktion des Tieres auf Berührung mit einem Holzstäbchen an beiden Körperseiten. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 1 Punkt bei fehlender Reaktion
- 2 Punkte bei verzögerter Reaktion der linken Körperhälfte
- 3 Punkte bei seitengleicher Reaktion auf den Stimulus

6. Reaktion auf Berührung der Vibrissae

Reaktion auf Berührung der Vibrissae mit einem Holzstäbchen. Annäherung an das Tier, ohne mit dem Holzstäbchen in das Gesichtsfeld zu kommen. Die Punktevergabe erfolgte wie folgt:

- 1 Punkt bei fehlender Reaktion der linken Kopfhälfte
- 2 Punkte bei verzögerter und abgeschwächter Reaktion der linken Kopfbewegung
- 3 Punkte bei seitengleicher Reaktion auf den Stimulus mit Kopfbewegung

Durch Zusammenaddieren aller Punkte der 6 Untersuchungseinheiten erhielt man eine Beurteilung über das neurologische Defizit. Zur genaueren Beurteilung ließ sich hierbei noch die Spontanaktivität ausschließen (Addition von Einheit 2-6). Die errechneten Werte reichten von minimal 3 bis maximal 18, je kleiner der Wert ist, desto größer war das neurologische Defizit.

4.5.5 *Anfertigung der koronaren Hirnschnitte*

2 Tage nach Okklusion der Arteria cerebri media wurden die Tiere mit Chloralhydrat (400 mg/kg) narkotisiert. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, und über eine in die Aorta vorgeschobene Kanüle erfolgte mit eiskalter PBS¹- und 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung die Tötung des Tieres. Nach der Perfusion wurde die Kalotte mittels vorsichtiger Schnitte entlang der Sagittalnaht geöffnet. Das Gehirn wurde mit einem Spatel entnommen und zur Fixierung für eine Nacht in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung aufbewahrt. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine 3 bis 4-tägige Lagerung in 30 %-iger Glukose bei 4° Celsius. Im nächsten Schritt wurden mit einem Kryostaten bei -20° Celsius koronare, 40 µm dicke Schnitte nach einem Atlas für Ratten [Paxinos und Watson 1986] angefertigt. Die koronaren Schnitte wurden vom Bregma ausgehend +3,7 mm, bis hin zum Bregma -6,7 mm angefertigt.

¹ Kochsalz, mit Phosphat gepuffert

4.5.6 *Bestimmung des Infarkt- und Ödemvolumens*

Hierfür wurde jeder zwanzigste Hirnschnitt auf einen mit Gelantine beschichteten Objektträger aufgebracht. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung mit Kresylviolett nach folgendem Schema.

- 1.Schritt: Hirnschnitt 1 Minute in destilliertem Wasser waschen
- 2.Schritt: Hirnschnitt für 3 Minuten in 100 %-igem Ethanol inkubieren
- 3.Schritt: Hirnschnitt für 15 Minuten in 100 %-igem Xylol inkubieren
- 4.Schritt: Hirnschnitt für 3 Minuten in Ethanol inkubieren
- 5.Schritt: Hirnschnitt 1 Minute in destilliertem Wasser waschen
6. Schritt: Hirnschnitt für 5 Minuten in 0,1 %-igem Kresylviolett färben
- 7.Schritt: Hirnschnitt 1 Minute in destillierten Wasser waschen
- 8.Schritt: Hirnschnitt für wenige Sekunden in sauren Alkohol waschen bis zur optimalen Färbung
- 9.Schritt: Hirnschnitt 1 Minute in destilliertem Wasser waschen

Nachdem die Hirnschnitte getrocknet waren, wurden diese mit einem Deckglas versehen. Dann wurden diese an insgesamt 12 Stellen des Gehirnes analysiert.

Dies geschah nach festgelegten Koordinaten. Der Ausgangspunkt hierfür war das Bregma. Von dort aus +3.7 mm, + 2.9 mm, +1.3 mm, +0.5 mm, -0.3 mm, -1.1 mm, -1.9mm, -2.7mm, -3.5 mm, -4.3 mm, -5.1 mm und -6.7 mm. Anschließend wurden die Hirnschnitte mit einer Digitalkamera¹ fotografiert. Danach erfolgte die Markierung des Infarktareals mit dem Leica image analysis system² auf allen Hirnschnitten. Die Berechnung des Infarktvolumens [mm³] erfolgte aus dem Produkt der Summe der Infarktareale und der Distanz zwischen den einzelnen Hirnschnitten [Zhang und Pardridge 2001]. Des Weiteren wurde das Ödemvolumen [mm³] berechnet. Hierfür

¹ Victor Company of Japan, Color Video Camera

² Leica Mikrosystem, 64825 Bensheim, Deutschland

wurde die Differenz aus der Fläche beider Hirnhemisphären gebildet [Justicia und Planas 1999].

Das Infarktvolumen wird vom begleitenden Hirnödem beeinflusst. Mit der Formel von Swanson [Swanson et al. 1990] konnte man prozentual das gesamte betroffene Infarktareal darstellen.

$$\% \text{ des Infarktes} = 100 \times (V_C - V_I) / V_C$$

% des Infarktes: Prozentsatz der vom Infarkt betroffenen Hemisphäre; V_C = normale Hemisphärenvolumen der kontralateralen Seite; V_I = normale Hemisphärenvolumen der ipsilateralen Seite; $V_C \sim d \times \sum_i^n A_c$; $V_I \sim d \times \sum_i^n A_i$; d = Distanz zwischen den Hirnschnitten; A_c = Fläche des gesunden Hirngewebes auf der kontralateralen Hemisphäre auf Schnitt i ; A_i = Fläche des gesunden Gehirngewebes auf der ipsilateralen Hemisphäre auf Schnitt i .

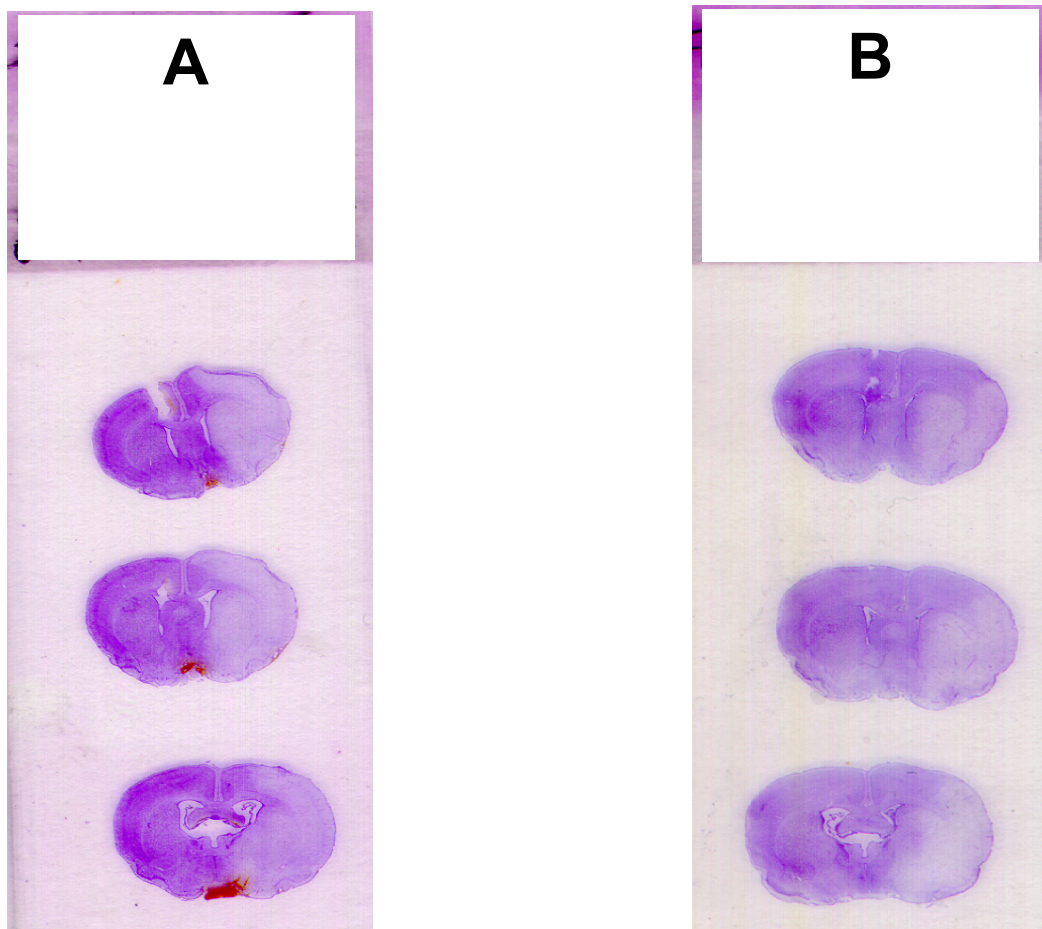


Abbildung 5: Die Bilder zeigen serielle, 40 µm dicke Gehirnschnitte, welche mit Kresylviolette gefärbt wurden. A = Vorbehandlung der Tiere mit NaCl, B = Vorbehandlung der Tiere mit Candesartan 0.1 nmol/h.

4.6 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen

Ziel des Hauptversuches war die Bestimmung des neurologischen Defizits und des Infarkt volumens / perifokalen Ödemvolumens nach Ischämie und Reperfusion.

Die Tiere wurden hierfür in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe wurde über fünf Tage mit Candesartan 0.1 nmol/h intraventrikulär behandelt, die Kontrollgruppe erhielt NaCl intraventrikulär. Am sechsten Tag wurde neben einer Ligatur der Arteria carotis communis eine Okklusion der rechten Arteria cerebri media für 90 min durchgeführt. Nach Reperfusion wurden im Anschluss in den darauf folgenden 24h und 48 h neurologische Untersuchungen durchgeführt. Anschließend erfolgten die kardiale Perfusion und die Entnahme der Gehirne. In den darauf folgenden Tagen erfolgte die

Anfertigung koronarer Schnitte mit Färbung zur Bestimmung des Infarkt Volumens und des Ödemvolumens.

Die verwendeten Gruppen sind im Folgenden aufgeführt:

Kontrollgruppe (n=5):	- NaCl zentral für 5 Tage
Candesartan (n=6):	- Candesartan zentral für 5 Tage

4.7 Verwendete Lösungen

Zusammensetzung	PBS 10x, pH7.4	PB 10x pH7.4	PBST 1x pH7.4	PBST mit NGS
NaCl	80 g		80 g	80 g
Na₂HPO₄*H₂O	11.5 g	11.5 g	11.5 g	11.5 g
KH₂PO₄	2 g	2 g	2 g	2 g
KCl	2 g	2 g	2 g	2 g
HCl	Titrierung des pH	Titrierung des pH	Titrierung des pH	Titrierung des pH
Dest. H₂O	800-1000 ml	800-1000 ml	800-1000 ml	800-1000 ml
Triton X-100			1ml gelöst in 499 ml PBS)	1ml gelöst in 499 ml PBS)
NGS (Normal goat serum)				1ml auf 50 ml PBST

Zusammensetzung	Glukose 30 %	Parafor- malde- hyd 4 %	Cande- sartan- Lösung pH8	4 % Chloral- hydrat- lsg	DAB
NaCl	80 g				
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	11.5 g	11.5 g			
KH ₂ PO ₄	2 g	2 g			
KCl	2 g	2 g			
HCl			Titrierung des pH		
Dest. H ₂ O	800-1000 ml	800-1000 ml		100 ml	Nach An- leitung
Triton X-100					
NGS (Normal goat serum)					
Glukose	150 ml gelöst in 300 ml PBS				
Paraformaldehyd		40 g (bei 60°C ge- löst in 900 ml PB			
Candesartan			20 mg		
Na ₂ CO ₃			5 ml 1N Lsg.		
NaCl 0.9 %			95 ml		
Chloralhydrat				4 g	
					1
DAB-Tbl.					1

4.8 Statistik

Alle Ergebnisse wurden, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Die Anzahl der jeder Berechnung zugrunde liegenden Versuchstiere wurde mit n angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS¹ mittels gepaarten/ungepaarten T-Tests durchgeführt unter Anpassung des Signifikanzlevels nach Bonferroni. Die statistische Signifikanz wurde definiert als $p \leq 0.05$.

¹ SPSS 12.0 für Windows

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche

5.1.1 *Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung*

In der Kontrollgruppe Ang II mit einmaliger intravenöser Gabe von Ang II 50 ng/kg (osmotische Pumpe mit NaCl befüllt) fand sich ein Anstieg des mittleren arteriellen Druckes um $36,27 \pm 1,63$ und eine Senkung der Herzfrequenz um $54,17 \pm 4,82$. In der Kontrollgruppe Candesartan mit der intraventrikulären Behandlung mit Candesartan (1.0 mmol/h) und peripheren Gabe von NaCl fand ein signifikant geringerer Blutdruckanstieg um $3,86 \pm 0,69$ und ein Anstieg der Herzfrequenz um $18,44 \pm 5,86$ (signifikant gegenüber Kontrollgruppe Ang II).

Bei den Behandlungsgruppen zeigten sich bei abnehmender Dosis des Candesartans eine zunehmende Erhöhung des peripheren Blutdruckes sowie eine zunehmende Senkung der Herzfrequenz. In der Gruppe der Tiere mit einer 1.0 mmol/h Candesartan-Therapie zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe Ang II ein signifikant geringeren Anstieg des mittleren arteriellen Druckes um $8,93 \pm 1,26$ sowie eine signifikant geringere Senkung der Herzfrequenz um $8,8 \pm 7,41$. Durch Reduktion der Candesartan-Dosis auf 0.3 mmol/h fand sich ein ebenfalls ein signifikant geringerer Blutdruckanstieg gegenüber der Kontrollgruppe Ang II von $15,9 \pm 1,07$ und eine signifikant geringere Senkung der Herzfrequenz um $23,29 \pm 4,53$. Bei einer Behandlung mit 0.1 mmol/h Candesartan erreichte der Blutdruck und die Herzfrequenz ähnliche Werte wie in der Kontrollgruppe Ang II ($35,49 \pm 1,60$ bzw. $41,85 \pm 4,41$, nicht signifikant gegenüber Kontrollgruppe Ang II).

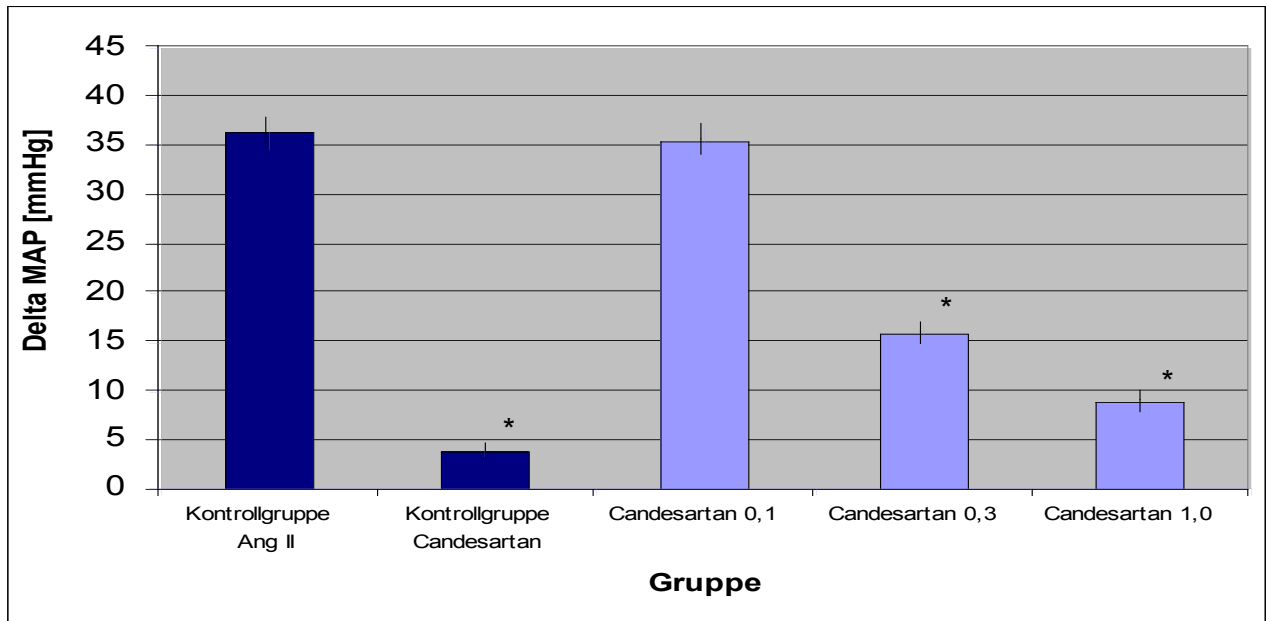


Abbildung 6: Anstieg des mittleren arteriellen Drucks (Delta MAP) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.1 Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II.

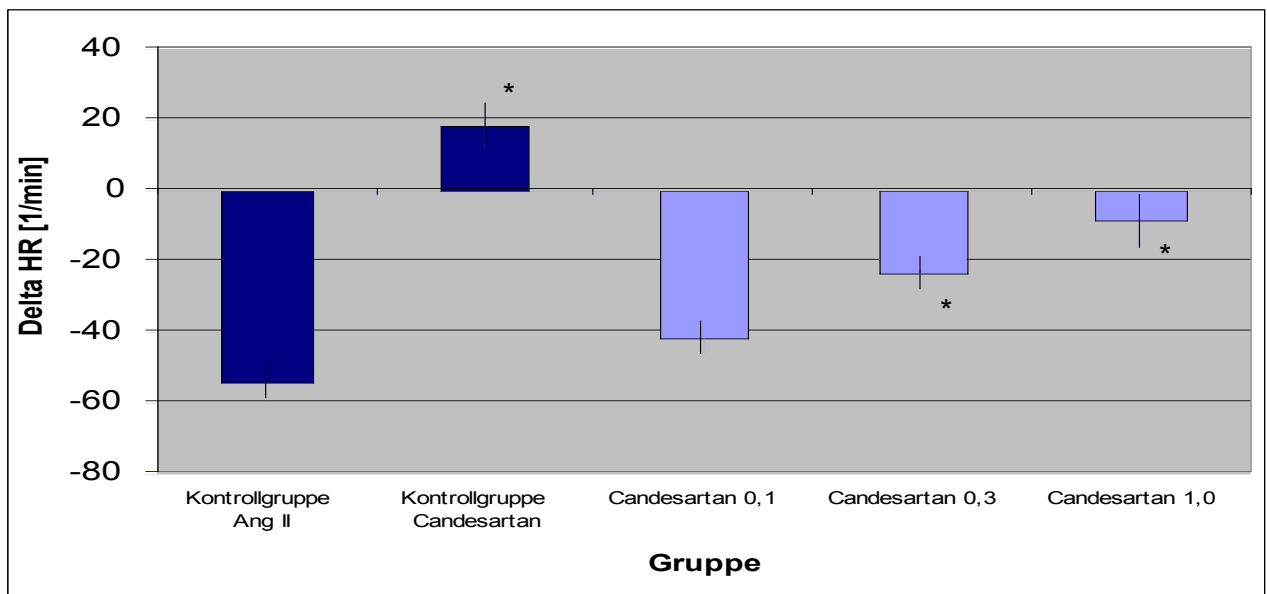


Abbildung 7: Anstieg / Senkung der Herzfrequenz (Delta HR) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.1 Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II.

5.1.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartan-gabe

In der Kontrollgruppe Ang II zeigte sich nach einmaliger intraventrikulärer Gabe von Ang II (25 nmol/kg Körpergewicht) ohne Vorbehandlung mit Candesartan ein Anstieg des mittleren arteriellen Druckes um 24.72 ± 4.12 und ein Anstieg der Herzfrequenz um 8 ± 16.50 . Im Trinkversuch fand sich ein Wasserverbrauch von 6.52 ± 0.32 . In der Kontrollgruppe Candesartan fand sich nach einmaliger intraventrikulärer Behandlung mit 0.1 mmol/h Candesartan ohne intraventrikuläre Gabe von Ang II lediglich ein Anstieg des mittleren arteriellen Druckes um 4.48 ± 0.57 ($p < 0.05$ gegen Kontrollgruppe Ang II) und ein Anstieg der Herzfrequenz um 19.44 ± 4.28 .

Mit zunehmender Dauer des Intervalls zwischen Candesartan- und Ang II-Applikation zeigte sich eine Zunahme des peripheren Blutdruckes und der Trinkmenge, die Herzfrequenzmessung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Bei Applikation von Ang II 10 Minuten nach Candesartan fand sich ein signifikant geringerer Anstieg des mittleren arteriellen Druckes (2.89 ± 0.75) sowie eine signifikant geringere Trinkmenge mit einem Wasserverbrauch von 0.11 ± 0.05 im Vergleich zur Kontrollgruppe Ang II. Die Herzfrequenz stieg um 9.25 ± 6.2 . Bei Ang II-Applikation nach 1 / 3 / 6 Stunden nach Candesartangabe zeigte sich gegenüber der Applikation nach 10 Minuten ein höherer Blutdruckanstieg sowie ein steigender Wasserverbrauch (Blutdruckanstieg: 7.44 ± 1.54 / 11.01 ± 1.15 / 14.36 ± 1.5 ; Wasserverbrauch: 0.14 ± 0.1 / 2.69 ± 0.75 / 4.27 ± 0.05). Gegenüber der Kontrollgruppe Ang II war der Blutdruckanstieg in allen 3 Gruppen signifikant geringer, in Hinsicht auf die Wasseraufnahme der Tiere war gegenüber der Kontrollgruppe Ang II eine signifikant geringere Wasseraufnahme nur in den Gruppen mit Ang II-Applikation nach 1 und 3 Stunden zu verzeichnen. Die Veränderung der Herzfrequenz betrug in diesen 3 Gruppen $+12.56 \pm 9.16$, -10.88 ± 10.75 , $+0.5 \pm 9.85$ (nicht signifikant gegenüber Kontrollgruppe Ang II). Applizierte man Ang II 12 Stunden nach Candesartan, so zeigte sich ein noch leicht verringerter Anstieg des Blutdruckes (17.96 ± 0.89) im Vergleich zur Kontrollgruppe Ang II, dieser Unterschied wies jedoch keine statistische Signifikanz mehr auf. Bezüglich des Trinkverhaltens (Wasserverbrauch: 5.8 ± 0.64) und Herzfrequenz (Zunahme um 23.13 ± 11.27) waren die Werte mit denen der Kontrollgruppe Ang II vergleichbar.

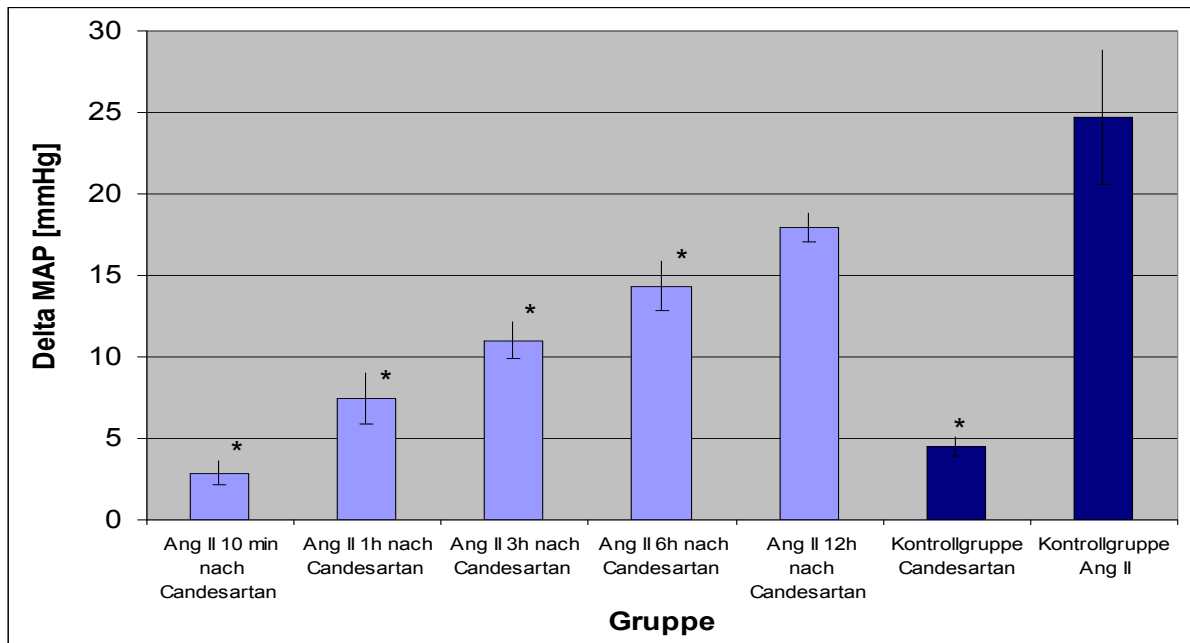


Abbildung 8 : Anstieg des Blutdruckes (Delta MAP) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II.

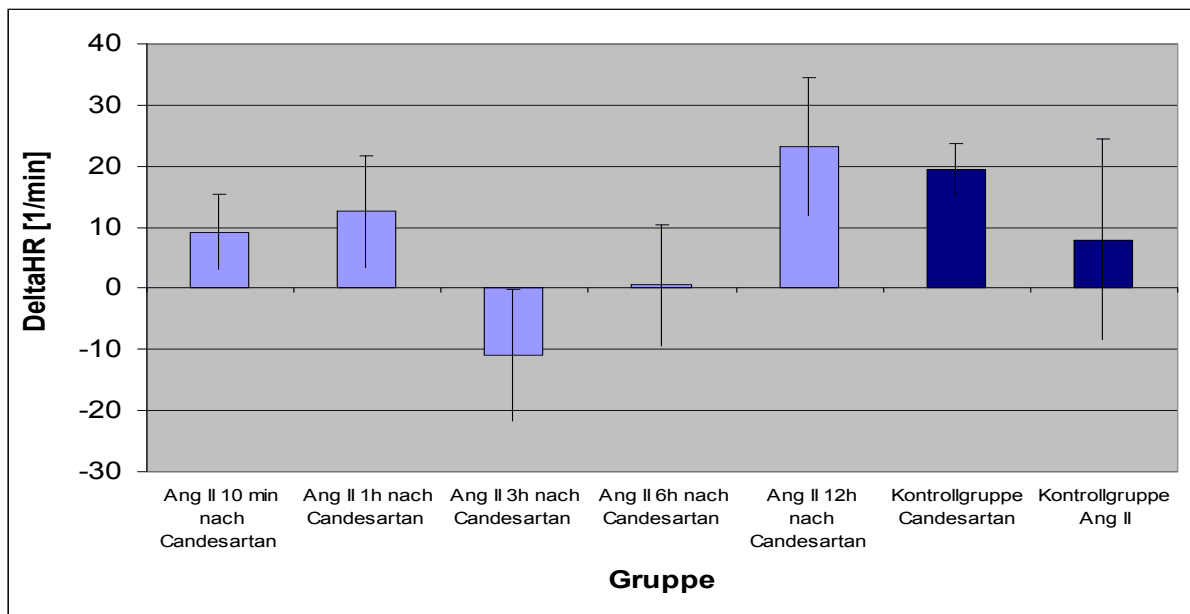


Abbildung 9 : Anstieg / Abfall der Herzfrequenz (Delta HR) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe).

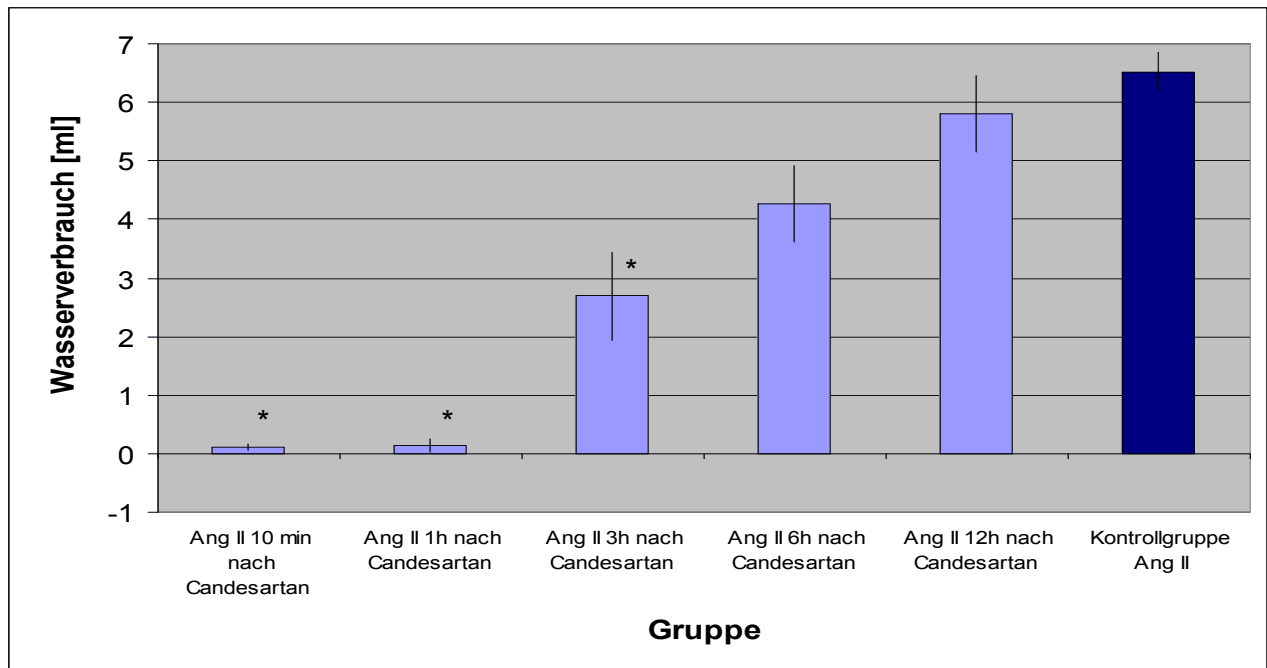


Abbildung 10: Änderung des Wasserverbrauches in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II.

5.1.3 Zentrale Ang II-Hemmung bei kontinuierlicher Candesartangabe

In diesen Versuchen wurde nach 5-tägiger intraventrikulärer Candesartanapplikation mit nachfolgender ebenfalls intraventrikulärer Ang II-Gabe keine Veränderung des mittleren peripheren Blutdruckes verzeichnet (Blutdruckanstieg um 0.28 ± 1.70). Die Herzfrequenz stieg bei den Tieren nach Ang II-Gabe um 18.83 ± 9.26 an. Analog zu den Ergebnissen bezüglich der Veränderung des Blutdruckes zeigten die Tiere auch im Trinkversuch keine vermehrte Wasseraufnahme (0.02 ± 0.01) (Daten graphisch nicht dargestellt).

5.2 Hauptversuche

5.2.1 Cerebrale Blutflussmessung

Beim dem Vergleich der Candesartan-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich zu Versuchbeginn ein vergleichbarer intrakranieller Blutfluss (138.17 ± 18.85 versus 139.62 ± 19.05). Nach Verschluss der A. carotis communis und der A. cerebri media kam es in beiden Gruppen in den ersten 20-30 Minuten zu einem signifikanten Abfall des Flows um über 80 % (24 ± 3.17 versus 23.62 ± 7.18). Im Verlauf der 90 Minuten

der Okklusion war eine minimale Durchblutungszunahme zu verzeichnen. Nach Reperfusion kam es in der Candesartan-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme des cerebralen Blutflusses, dieser erreichte ca. 55 % des Ausgangs-Blutflusses (74.67 ± 13). In der Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der intrakraniellen Durchblutung, allerdings stieg hier der Fluss nicht statistisch signifikant an und erreichte nach 30 Minuten Reperfusion nur knapp 34 % des Ausgangsflusses (47.58 ± 13.22). Der Blutfluss nach 30 Minuten Reperfusion war in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

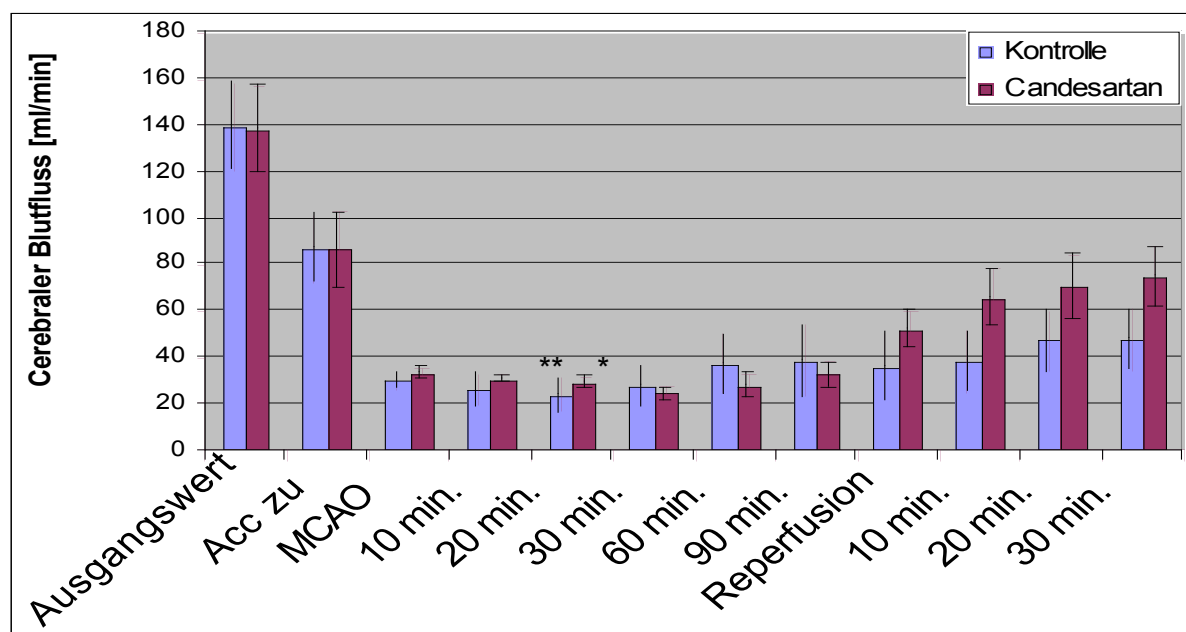


Abbildung 11: Änderung des cerebralen Blutflusses während der 90-minütigen MCAO/Ligatur der Acc und während der Reperfusion in den beiden Gruppen (Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen). *: $p \leq 0.05$ für Candesartan 20 min versus Ausgangswert bzw. versus 30min nach Reperfusion; **: $p \leq 0.05$ für Kontrolle 20 min versus Ausgangswert. Acc = Arteria carotis communis, MCAO = middle cerebral artery occlusion.

5.2.2 Neurologisches Defizit 24 h und 48 h nach Okklusion der Arteria cerebri media

24 Stunden nach Reperfusion wiesen die mit Candesartan therapierten Tiere in der Evaluation nach Garcia einen Punktwert von 10 ± 0.25 bzw. 7.5 ± 0.34 (mit bzw. ohne Spontanaktivität) auf, nach Bederson erreichte die Gruppe einen Mittelwert von 1.9 ± 0.24 . Nach 48 Stunden zeigte sich eine geringfügige Verbesserung des neurologischen Defizits (10.4 ± 0.49 / 7.9 ± 0.55 bzw. 1.92 ± 0.2 nach Garcia mit / ohne Spontanaktivität bzw. Bederson; nicht signifikant gegenüber 24 Stunden). In der Kon-

trollgruppe fanden sich nach 24 Stunden Werte von 8.1 ± 0.45 / 6.5 ± 0.45 nach Garcia (mit / ohne Spontanaktivität). In der Evaluation nach Bederson erreichten die Tiere Werte von 2.4 ± 0.25 . Nach 48 Stunden kam es zu keiner Verbesserung des Defizits unabhängig von der Evaluations-Methode (8 ± 0.77 / 6.4 ± 0.56 bzw. 2.5 ± 0.22 nach Garcia mit / ohne Spontanaktivität bzw. Bederson).

Beim direkten Vergleich der Therapiegruppe gegen die Kontrollgruppe zeigte sich bei der Evaluation nach Garcia mit Spontanaktivität zu beiden Zeitpunkten ein signifikant geringeres neurologisches Defizit in der Therapiegruppe mit Candesartan. Bei der Evaluation nach Garcia ohne Spontanaktivität und der Evaluation nach Bederson zeigte sich zu beiden Zeitpunkten tendenziell ebenfalls ein geringeres neurologisches Defizit in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe, hier wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

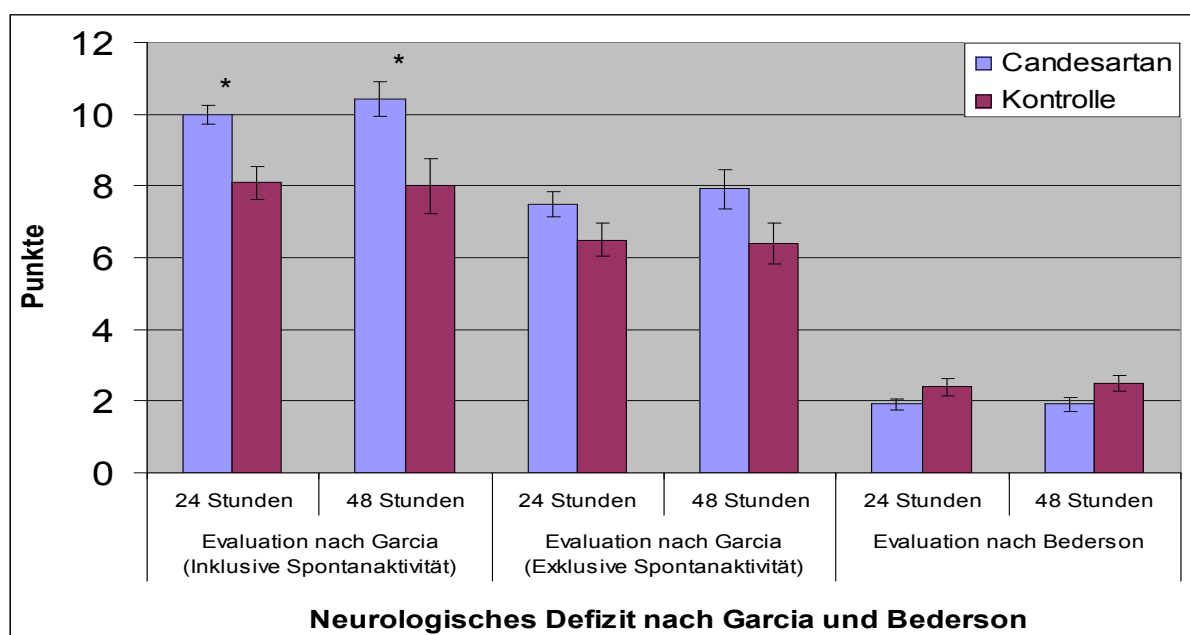


Abbildung 12: Evaluation des neurologischen Defizits 24h/48 h nach MCAO/Ligatur der Acc und Reperfusion nach Garcia inklusive/ exklusive Spontanaktivität sowie nach Bederson in den beiden Gruppen (Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen). *: $p \leq 0.05$ für Candesartan versus Kontrolle.

5.2.3 Bestimmung des Infarkt- und Ödemvolumens

Bei der Bestimmung des perifokalen Ödemvolumens zeigte sich in der Therapiegruppe mit Candesartan ein tendenziell geringeres Ödem im Vergleich zur Kontrollgruppe (71.94 ± 5.7 versus 82.6 ± 15.73 ; nicht signifikant). Bei der Ausmessung des

Infarkt volumens beider Gruppen zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Volumina mit einer Verminderung des Infarktvolumens zugunsten der Therapiegruppe (191.19 ± 12.9 versus 233.98 ± 26.8 , nicht signifikant).

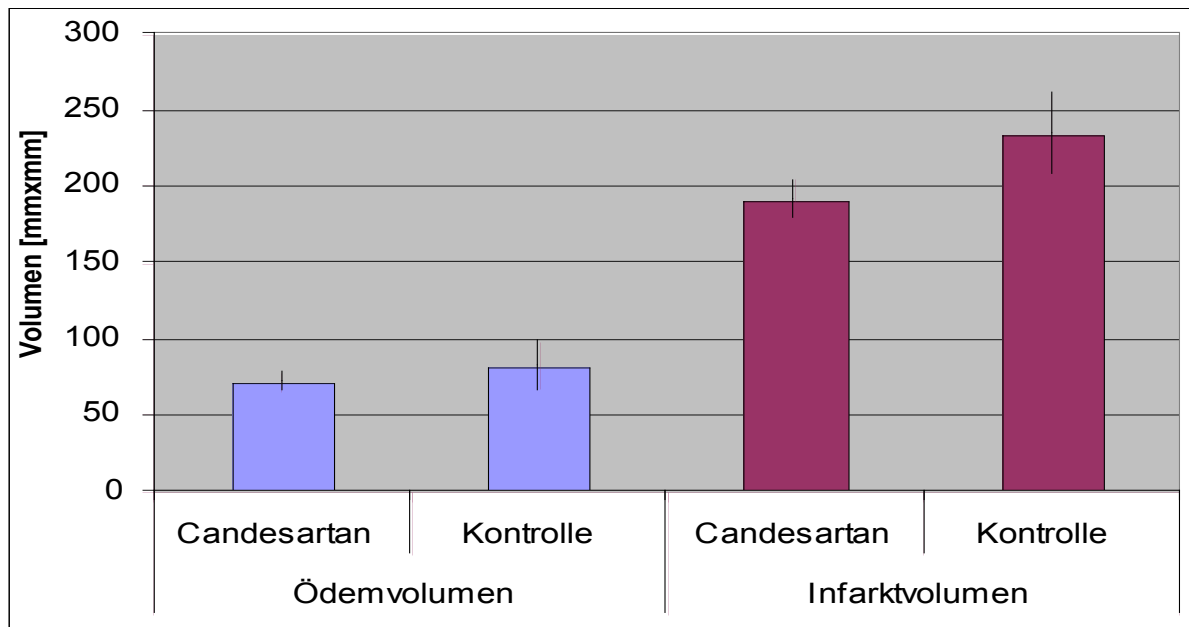


Abbildung 13: Vergleich des Infarkt- und Ödemvolumens nach MCAO/Ligatur der Acc und Reperfusion in den beiden Gruppen (Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen).

6 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass eine kontinuierliche, zentrale Candesartan-Applikation über eine reine Blockade der zentralen AT-1-Rezeptoren ohne Beeinflussung des peripheren Blutdruckes zu einer signifikanten Verringerung des neurologischen Defizits sowie einer deutlichen jedoch nicht signifikanten Reduktion des Infarktareals und des perifokalen Ödems nach einem Schlaganfall führt. Hierbei wurde die Candesartan-Dosis so gewählt, dass sie bei zentraler Applikation zu keinerlei Beeinträchtigung des peripheren Blutdruckes führt.

6.1 *Gewähltes Modell*

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der cerebrovaskulären Anatomie und Physiologie im Vergleich zum Menschen haben sich Studien an Ratten zum Verständnis der pathologischen Vorgänge fokaler cerebraler Ischämien verdient gemacht. In dieser Studie wurde neben der Ligatur der Arteria carotis communis die Arteria cerebri media über 90 Minuten mittels eines Monofilaments verschlossen mit anschließender Reperfusion. Ein Okklusionszeitraum von 90 Minuten führt zu optimalen ischämischen Schäden im betroffenen Hirnareal. In Studien fand man heraus, dass eine Okklusion von 30 Minuten nur zu unzureichenden Hirnschäden führt, eine Okklusionsdauer von über 90 Minuten führt jedoch zu einer deutlichen Mortalitätssteigerung [McAuley 1995].

6.2 *Aktuelle Studienlage bezüglich klinischer Studien*

In der jüngeren Vergangenheit wurden mehrere große klinische Studien über die Wirkung von Angiotensin-Rezeptor-Blockern auf die Inzidenz und den Verlauf von Schlaganfällen publiziert. Hierbei wurde mehrfach ein positiver Effekt der AT1-Blockade auf den klinischen Verlauf belegt.

Die LIFE- und die SCOPE-Studien untersuchten moderat hypertensive Patienten auf die Effekte einer präventiven AT-1-Blockade in Hinsicht auf kardiovaskuläre und cerebrovaskuläre Ereignisse. In der SCOPE-Studie wurden 4964 Patienten doppelblind in eine Therapiegruppe mit Candesartan und eine Kontrollgruppe mit Placebo (zu-

zöglich einer antihypertensiven Therapie mit Diuretika, Betablockern, Calciumantagonisten und ACE-Hemmern nach Bedarf) randomisiert. Es zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion des Risikos für nicht-tödliche Schlaganfälle um 28 % ($p=0,041$) sowie eine deutliche aber nicht statistisch signifikante Verringerung des Risikos für ein schweres kardiovaskuläres Ereignis zugunsten der Candesartangruppe. Die Häufigkeit von Herzinfarkten oder die kardiovaskuläre Mortalität unterschieden sich nicht in den beiden Gruppen [Lithell et al. 2003]. In der LIFE-Studie wurden 9193 Patienten einer Therapie mit Losartan oder Atenolol zugeführt. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikant höhere Quote für primäre kardiovaskuläre Ereignisse ($p=0.021$) und tödliche/nicht-tödliche Schlaganfälle ($p=0.001$) in der mit Atenolol therapierten Gruppe [Dahlöf et al. 2002]. Weitere Subgruppen-Analysen der Daten der LIFE-Studie hinsichtlich der Schlaganfälle zeigten eine statistisch relevante Verringerung des tödlichen Schlaganfallrisikos und des atheromathös bedingten Schlaganfalles. Eine Reduktion von hämorrhagischen oder embolischen Schlaganfällen konnte ebenfalls belegt werden, eine Signifikanz war jedoch nicht nachweisbar [Kjeldsen et al. 2005, Kizer et al. 2005].

In der ACCESS-Studie wurden 500 Patienten unmittelbar nach Erleiden eines Schlaganfalles prospektiv in zwei Therapiearme (Candesartan versus Placebo) doppelverblindet randomisiert. Ziel war es, eine moderate Blutdrucksenkung durch Candesartan nach einem akuten Schlaganfall einer tolerierten Hypertension ohne medikamentöse Therapie gegenüberzustellen, da der Nutzen einer antihypertensiven Therapie in der akuten cerebralen Ischämie immer noch kontrovers diskutiert wird. Die Studie musste jedoch nach 342 Patienten vorzeitig beendet werden, da die Candesartan-Therapiegruppe eine statistisch signifikant niedrigere 12-Monats-Mortalität und Anzahl an (Cardio-/Cerebro-) vaskulären Ereignissen aufwies. [Schrader et al. 2003].

In der MOSES-Studie wurden 1405 Hoch-Risiko Patienten mit arterieller Hypertonie innerhalb von 24 Monaten nach Erleiden eines Schlaganfalles im Sinne einer Studie zur Sekundärprophylaxe in zwei Therapieregime prospektiv randomisiert (Eprosartan versus Nitrendipin). Hierbei wies die Therapiegruppe mit Eprosartan ein statistisch signifikant geringeres Risiko auf, ein erneutes primäres Ereignis (kardiovaskulär/cerebrovaskulär/Todesfall) zu erleiden ($p=0.014$) [Schrader et al. 2005].

Interessant ist bei allen hier angeführten Studien, dass die Therapiegruppen jeweils vergleichbare Blutdruckwerte wie die Kontrollgruppen aufwiesen. Die nachgewiesenen Effekte der Antiotensin-Rezeptor-Blockade in Hinsicht auf eine Protektion vor cerebrovaskulären Ereignissen sind somit wahrscheinlich nicht auf die alleinige antihypertensive Wirkung der Medikamente zurückzuführen. Vielmehr sind andere Effekte der Antiotensin-Rezeptor-Blockade zu konstatieren, welche jedoch noch nicht im Detail bekannt sind.

6.3 Aktuelle Studienlage bezüglich tierexperimenteller Studien

In tierexperimentellen Untersuchungen wurden vielfach Angiotensin-Rezeptor-Blocker und deren Auswirkungen auf Inzidenz und Ausmaß von Schlaganfällen untersucht. Diese Studien zeigten im überwiegenden Anteil einen deutlichen Benefit der AT-1-Rezeptor-Blocker-Behandlung mit einer konsekutiven Verbesserung der neurologischen Ausfälle und einer Reduktion des Infarktareals bei den therapierten Tieren. Das Studiendesign der unterschiedlichen Arbeiten und die hierdurch bedingten unterschiedlichen Erklärungen zur Wirkung von AT-1-Blockern unterschieden sich jedoch hinsichtlich der untersuchten Tiere, dem Zeitpunkt der Initiierung der Therapie sowie der Art der AT-1-Blocker-Applikation und Wahl des AT-1-Blockers. Im Folgenden soll eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze und die daraus resultierenden Ergebnisse demonstriert werden.

6.3.1 Versuchstiere: Hypertensiv versus normotensiv

Es ist seit längerem bekannt, dass bei hypertensiven Ratten eine langfristige antihypertensive Behandlung durch AT-1-Blocker zu einer Verminderung der Rate von Schlaganfällen führt [von Lutterotti et al. 1992, Stier et al. 1993, Inada et al. 1997]. Mehrere aktuelle Arbeiten an hypertensiven Ratten dokumentierten einen protektiven Effekt einer Candesartan-Behandlung mit einer signifikanten Reduktion des Infarktareals, des perifokalen Ödems und der neurologischen Ausfälle bei langfristiger präventiver Anwendung vor einem Schlaganfall [Nishimura et al. 2000 b), Ito et al. 2002, Lu et al. 2005]. Hierbei wurde eine Normalisierung des Shiftes der cerebrovaskulären Autoregulation hin zu erhöhten Blutdruckwerten [Nishimura et al. 2000 b)] sowie eine Reduktion der Gefäßwanddicke und eine Erhöhung des Durchmessers der mittleren Cerebralarterie nachgewiesen [Ito et al. 2002]. Da eine permanente arterielle Hyper-

tonie mit einem erhöhten Vasotonus und einem Umbau der Arterienwände einhergeht [Véniant et al. 1992, Haidu et al. 1991], kommt es hierdurch kompensatorisch zu einer Anpassungshypertrophie der Gefäße mit einer Widerstandszunahme im betroffenen Stromgebiet sowie einer Verschiebung der cerebrovaskulären Autoregulation in Richtung höherer Blutdruckwerte. Im Falle eines Schlaganfalles bedeutet dies eine verminderte Adaptation und Reduktion der Durchblutungsreserve im Bereich von ischämiebedingt vermindert perfundiertem Gewebe aufgrund einer verminderten Vasodilatation [Vraamark et al. 1995]. Die Veränderung der Gefäße und der cerebrovaskulären Autoregulation durch die langfristige Candesartantherapie wird daher als eine der Hauptursachen der protektiven Wirkung bei hypertensiven Tieren diskutiert, da sich durch die Normalisierung der zuvor veränderten cerebralen Autoregulation eine bessere Adaptation der Durchblutung im Schlaganfall ergibt. Als weitere mögliche Ursache der Protektion durch AT-1-Blocker wird die verminderte AT-1-Rezeptor vermittelte Wirkung bzw. die verstärkte AT-2-Rezeptor vermittelte Wirkung von Angiotensin II im Gehirn diskutiert. Untersuchungen über die Bindung von Angiotensin II an AT-1- und AT-2-Rezeptoren bei hypertensiven Ratten zeigten im Bereich der mittleren Cerebralarterie eine Verteilung der Bindung von Angiotensin an AT-1- zu AT-2-Rezeptoren von ca. 90 zu 10 %, unter Candesartantherapie kam es hier zu einer massiven Reduktion der AT-1-Bindung innerhalb und ausserhalb der Blut-Hirnschranke um ca. 80 % [Nishimura et al. 2000 b)]. In einer weiteren Arbeit konnte nach 4-wöchentlicher Behandlung mit Candesartan eine Downregulation von AT-1-Rezeptoren und eine Up-Regulation von AT-2-Rezeptoren gezeigt werden [Lu et al. 2005]. Diese verstärkte Expression von AT-2-Rezeptoren und der entsprechenden mRNA wurde bei peripheren Nervenläsionen und bei Hirninfarkten bereits mehrfach belegt [Gallinat et al. 1998, Makino et al. 1996]. Durch eine Blockade der zentralen AT-1-Rezeptoren erfolgt eine verminderte Stimulation der Superoxid- und Peroxynitritproduktion. Dadurch werden cytotoxische Effekte inklusive einer Permeabilitätsstörung der Blut-Hirn-Schranke vermieden, wodurch sich eine Verminderung des cerebralen Ödems erklären lässt [Nishimura et al. 2000 b), Pueyo et al. 1998, Wei et al. 1986]. Ebenso werden AT-1-Rezeptor vermittelte Effekte wie Zellwachstum und Proliferation, die postischämische Inflammation, die Einwanderung verschiedener Zelltypen wie z.B. aktivierte Mikroglia oder Makrophagen sowie die Expression von c-Fos und c-Jun inhibiert [Dai et al. 1999, Lou et al. 2004, Yamakawa et al. 2003, Unger et

al. 1996]. Die AT-2-Rezeptor vermittelten Wirkungen umfassen Anti-Proliferation, neuronale Regeneration, Zelldifferenzierung, Apoptose, Anti-Fibrose und Anti-Inflammation. Die über den AT-2-Rezeptor vermittelten Angiotensin II Wirkungen sind zum großen Teil den AT1-Rezeptor-vermittelten Effekten entgegengesetzt [Lucius et al. 1998, Zhao et al. 2003, de Gasparo et al. 2000]. Die Bedeutung dieser Verschiebung der AT-1- und AT-2-Rezeptor vermittelten Wirkungen trägt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zur protektiven Wirkung von Candesartan durch entsprechende Beeinflussung des pathophysiologischen Prozesses des Schlaganfalles bei.

Mehrere Autoren untersuchten die Effekte einer Candesartantherapie beim Schlaganfall in der normotensiven Ratte [Dai et al. 1999, Groth et al. 2003, Brdon et al. 2007]. Hintergrund dieser Versuche war die zunehmende Bedeutung einer AT-1-Rezeptor-Blockade bei normotensiven Patienten zur kardiovaskulären Protektion. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Patienten, welche ein Hochrisikoprofil für kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen wie z.B. Patienten mit stattgehabtem Herzinfarkt, angeborenem Herzfehler oder einem Diabetes Mellitus. In diesen Versuchen konnte eine vergleichbare Wirkung der Candesartantherapie mit Reduktion des neurologischen Defizits und Verkleinerung des Infarktareals/perifokalen Ödems wie bei hypertensiven Individuen nachgewiesen werden. Als mögliche Erklärung für den hier beschriebenen Effekt wurden mehrere Argumente diskutiert. Auch bei normotensiven Ratten konnte nach Candesartantherapie eine Verschiebung der cerebrovaskulären Autoregulation hin zu niedrigeren Blutdruckwerten beobachtet werden [Vraamark et al. 1995, Nishimura et al. 1998]. Da jedoch bei normotensiven Tieren pathologische Gefäßwandveränderungen (Zunahme der Wanddicke, verminderte Dilatationsfähigkeit) nicht wie bei hypertensiven Tieren auftreten, stellen die Autoren die Bedeutung dieser „verbesserten“ Autoregulation für die protektiven Effekte der Candesartantherapie in Frage [Groth et al. 2003, Brdon et al. 2007]. Weiter zeigte sich, dass die Applikation von Candesartan unmittelbar vor dem ischämischen Insult keinerlei protektive Wirkung zeigte [Groth et al. 2003]. Eine ausgeprägte Senkung des systemischen Blutdruckes, welcher bei einer ischämiebedingten Störung der cerebralen Autoregulation für die Perfusion des Gehirnes hauptsächlich verantwortlich ist, führte zu einer Verschlimmerung des ischämischen Schadens im Gehirn, wohingegen die Induktion einer leichten Hypertonie als positiv in Hinsicht auf die Entstehung des cerebralen Ödems und des Überlebens beschrieben wurde [Groth et al. 2003, Hosomi et al.

1999]. In einer weiteren Arbeit konnte eine deutlich verminderte Expression von c-Fos und c-Jun, Bestandteilen des Aktivator-Proteins AP-1, unter AT-1-Antagonisierung mit Irbesartan nachgewiesen werden [Dai et al. 1999]. Normalerweise findet sich eine Stimulation der Expression von c-Fos und c-Jun in kortikalen Regionen, welche den ischämischen Infarkt überleben [An et al. 1993]. AP-1 ist an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder Zellregeneration beteiligt. Gillardon et al. konnten eine gleichzeitige Aktivierung von c-Fos und eine Downregulation von Bcl-2 in infarziertem Hirngewebe nachweisen [Gillardon et al. 1996]. Bcl-2 seinerseits blockiert die hypoxie-induzierte Apoptose [Shimizu et al. 1996]. Eine erhöhte c-Fos und c-Jun Expression könnte somit über eine Downregulation von Bcl-2 zu einer Induktion der Apoptose neuronaler Zellen führen [Dai et al. 1999, Gillardon et al. 1996]. Dies deckt sich mit anderen Daten, welche eine Korrelation zwischen der verminderten Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos/c-Jun und einer Verbesserung des neurologischen Status der Versuchstiere zeigen [Dai et al. 1999]. Ebenso konnte durch Behandlung mit Irbesartan eine Reduktion von aktivierter-Caspase-3 positiver Zellen im Grenzbereich eines ischämischen Infarktkerns nachgewiesen werden [Lou et al. 2004]. Die Aktivierung von Caspase-3 gilt als entscheidender Schritt in der Apoptose [Huppertz et al. 1999]. AT-1 Blocker scheinen somit sowohl über eine Verminderung der Expression von c-Fos und c-Jun als auch über eine Reduktion von Caspase-3 zu einer verminderten Apoptoserate und somit zu einem verzögerten neuronalen Zelltod zu führen. Passend zu diesen Ergebnissen konnte in neueren Arbeiten eine deutliche wenn auch nicht signifikante Verminderung der Neutrophilen-Adhäsion im Endothel von Schlaganfallpatienten unter Candesartantherapie gezeigt werden [Hallevi et al. 2007]. Beim Schlaganfall führt eine Leukozyteninfiltration zu einer Störung der Mikrozirkulation. Durch Freisetzung von Zwischenprodukten und durch einen intrazellulären Kalziumanstieg kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid über die Stickstoffmonooxidase (NOS) [Nathan und Xie 1994, Iadecola et al. 1995]. Bei einer Zytokin-vermittelten Erhöhung der calcium-unabhängigen iNOS-Konzentration kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Apoptoserate [Andreka et al. 2001, Khan et al. 2005]. Zusammen mit den oben beschriebenen Effekten einer Blockade der AT-1-Rezeptor und verstärkten Stimulation von AT-2-Rezeptoren wird somit die Rolle der Modulation der inflammatorischen und immunologischen Antwort auf einen Schlaganfall einer Can-

desartantherapie als maßgeblicher Faktor der Neuroprotektion dieser Therapie gedeutet.

In der aktuellen Arbeit verwendeten wir normotensive Versuchstiere. Die Wahl der normotensiven Tiere erfolgte, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch vorgängige pathologische Veränderungen (Gefäßwandveränderungen, Shift der cerebralen Autoregulation) durch eine manifeste arterielle Hypertonie zu umgehen und eine alleinige Untersuchung der Blockade von AT-1-Rezeptoren zu ermöglichen.

6.3.2 *Zeitpunkt der AT-1-Repetor-Blockade*

In der Mehrheit der Studien wurde Candesartan vor Induktion des ischämischen Schlaganfalles appliziert [Nishimura et al. 2000 b), Dai et al. 1999, Groth et al. 2003, Ito et al. 2002]. Hierbei schwankte die Zeitspanne zwischen Candesartangabe und Schlaganfall zwischen 4 Stunden und 28 Tagen. Die bereits beschriebenen positiven Effekte der Therapie mit Candesartan bezüglich Größe des Infarktareals und des perifokalen Ödems sowie die Verbesserung der neurologischen Ausfälle wurde hierbei nur bei längerfristiger Candesartantherapie (>5 Tage) beobachtet [Nishimura et al. 2000 b), Dai et al. 1999, Groth et al. 2003, Ito et al. 2002], eine kurzzeitige AT-1-Rezeptorblockade unmittelbar vor einem ischämischen Insult zeigte keine positive Beeinflussung des Infarktareals oder der neurologischen Schäden [Groth et al. 2003, Ito et al. 2002]. Diese Beobachtung lässt sich gut in Einklang bringen mit den oben beschriebenen Erklärungen der AT-1-Blocker-Therapie. Ein Re-Modelling der cerebralen Gefäße mit einer nachhaltigen Veränderung der cerebrovaskulären Autoregulation wie auch eine Veränderung der Rezeptor-Dichte von AT-1- und AT-2-Rezeptoren ist nur durch eine längerfristige Behandlung zu erwarten. Zudem belegte eine Studie zur Langzeit-AT-1-Blockade mit Losartan eine verbesserte cerebrale Angiogenese mit konsekutiver Verminderung der Infarktgröße [Forder et al. 2005].

Einige Arbeiten beschäftigen sich mit einer Candesartan-Therapie nach einem ischämischen Schlaganfall [Brdon et al. 2007, Engelhorn et al. 2004]. Hier zeigen sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Während in einer Studie Candesartan nur zu einer deutlichen Verbesserung der neurologischen Ausfälle und zu einer Verminderung der Infarktgröße führte, wenn es innerhalb von 3 Stunden nach dem Insult appliziert wurde, blieb in derselben Studie eine positive Wirkung der AT-1-Blockade bei Beginn der Therapie nach 24 Stunden nach Schlaganfall aus [Brdon et al. 2007]. Im

Gegensatz hierzu wurde in einer anderen Arbeit ein positiver Effekt der Candesartan-Therapie sowohl bei einer Einzelgabe nach 24 Stunden als auch bei wiederholter 24-stündlicher Gabe über 7 Tage mit erster Applikation 24 Stunden nach dem ischämischen Insult mit einer Verbesserung des neurologischen Outcomes und der Infarktgröße beschrieben [Engelhorn et al. 2004]. Möglicherweise liegt die Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in dem jeweiligen Studiendesign. Während in der ersten Studie eine 90-minütige Okklusion der mittleren Zerebralarterie durchgeführt wurde, wurde in der zweiten Studie nur eine 60-minütige Ischämiezeit durchgeführt. Die hieraus resultierenden unterschiedlichen Schweregrade der ischämischen Schädigung müssen somit in die Diskussion miteinbezogen werden.

In der hier vorliegenden Arbeit haben wir eine 5-tägige Dauerapplikation vor dem Schlaganfall durchgeführt. Hierdurch wurden in Anlehnung an die aktuelle Studienlage mögliche Fehlerquellen wie eine zu kurzfristige AT-1-Blockade ohne Möglichkeit zur Adaptation des Organismus an die veränderte vaskuläre Regulation vermieden.

6.3.3 *Art der Applikation und Wahl des AT-1-Blockers*

Die Mehrzahl der Studien untersuchte die Auswirkungen einer systemischen AT-1-Blockade mittels oraler [Ozacmak et al. 2007, Gohlke und Von Kügelgen et al. 2002], intravenöser [Groth et al. 2003, Gohlke und Kox et al. 2002] oder subcutaner [Nishimura et al. 2000 b), Brdon et al. 2007, Ito et al. 2002] Candesartangabe. Andere Autoren verwandten Losartan systemisch (oral/iv/intraperitoneal) [Bui et a. 1992, Polidori et al. 1996, Culman et al. 1999, Li et al. 1993]. Bezüglich der Penetration von Losartan durch die Bluthirnschranke liegen hierbei widersprüchliche Daten vor. Während einige Autoren nach systemischer oraler Losartantherapie keine ausreichende Interaktion mit zentralen AT-1-Rezeptoren nachweisen konnten und deswegen auf eine insuffiziente Passage des Medikamentes durch die Blut-Hirn-Schranke schlossen [Bui et a. 1992], belegten andere Studien einen ausreichenden inhibitorischen Effekt von peripher (iv, oral, intraperitoneal) zugeführtem Losartan auf Wirkungen, welche über zentrale AT-1-Rezeptoren vermittelt werden [Polidori et al. 1996, Culman et al. 1999, Li et al. 1993]. Bezüglich der Gabe von Candesartan belegen hingegen zahlreiche Publikationen, dass dieser AT-1-Blocker bei systemischer Applikation zentrale AT-1-Rezeptoren sowie Effekte von zentral appliziertem Angiotensin II effektiver blockiert als andere AT-1-Blocker wie Losartan, Irbesatan oder Telmisartan

[Gohlke und Von Kügelgen et al. 2002, Gohlke und Kox et al. 2002, Culman et al. 1999, Nishimura et al. 2000 b), Gohlke et al. 2001, Brdon et al. 2007]. Candesartan weist hierbei eine gute Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke auf und zeigt einen nahezu unüberwindbaren Rezeptorantagonismus mit nur sehr langsamer Dissoziation vom Rezeptor [Vauquelin et al. 2001]. Aus diesem Grunde lassen sich mittels systemischer Candesartan-Gabe Auswirkungen einer zentralen AT-1-Blockade untersuchen, die oben angesprochenen Studien belegen die protektive Wirkung der Candesartanapplikation auf den Verlauf des Schlaganfalles. Allerdings sind bei peripherer Applikation Wirkungen des Pharmakons auf periphere AT-1-Rezeptoren nicht gänzlich auszuschließen und in die Diskussion mit einzubeziehen.

Mehrere Studien untersuchten die ausschließliche Blockade cerebraler AT-1-Rezeptoren durch intracerebroventrikuläre Infusion eines AT-1-Rezeptor-Antagonisten oder einer intracisternalen Applikation eines AT-1-Rezeptor Antisense-Oligonucleotids [Dai et al. 1999, Lou et al. 2004, Yamakawa et al. 2003]. Hier konnte eine Reduktion der postischämischen Inflammation sowie eine Verminderung der Apoptoserate in den Regionen um das Infarktgebiet nachgewiesen werden. Das Resultat einer Verminderung des Infarktareals und eines verbesserten neurologischen Outcomes war vergleichbar mit den oben beschriebenen Arbeiten zur systemischen Applikation eines AT-1-Rezeptor-Antagonisten und konnte hierbei auf eine rein zentral wirksame AT-1-Blockade zurückgeführt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit haben wir eine 5-tägige Dauerapplikation eines AT-1-Blockers intracerebroventrikulär durchgeführt. Dies ist die erste Arbeit, welche hierzu den äußerst effektiven AT-1-Blocker Candesartan verwendet. Bisher wurde zur zentralen Applikation ausschließlich mit Irbesartan oder einem AT-1-Rezeptor Antisense-Oligonucleotid gearbeitet [Dai et al. 1999, Lou et al. 2004, Yamakawa et al. 2003]. Die Dosis des Pharmakons wurde hierbei so gewählt, dass eine Beeinflussung des peripheren Blutdruckes vermieden wurde. Hierzu haben wir die Candesartandosis so reduziert, dass peripher verabreichtes Angiotensin II in seiner Wirkung auf den Kreislauf nicht beeinträchtigt wurde. Hierdurch wurde eine Auswirkung auf kardiovaskuläre Effekte, welche durch vaskuläre AT-1-Rezeptoren vermittelt werden, ausgeschlossen. Die zentrale AT-1-Blockade der hierbei ermittelten Candesartan-Dosierung wurde zudem durch eine parallele intraventrikuläre Candesartan- und Angiotensin II-Applikation bestätigt, hierbei zeigte sich kein nennenswerter Effekt des applizierten

Angiotensins. Durch einmalige zentrale Candesartan-Applikation und in verschiedenen Zeitintervallen nachfolgende ebenfalls zentrale Angiotensin II-Applikation konnte die Dauer der zentralen Candesartanwirkung bei intracerebroventrikulärer Applikation auf 3-6 Stunden verifiziert werden. Durch die zentrale Applikation von Candesartan konnten wir eine signifikante Verbesserung der cerebralen Durchblutung in der Therapiegruppe nach Reperfusion zeigen, weiter war eine signifikante Reduktion des neurologischen Defizites sowie eine deutliche aber nicht signifikante Reduktion der Infarktgröße und des perifokalen Ödems evident. Somit belegt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal einen neuroprotektiven Effekt einer rein zentral wirksamen AT-1-Rezeptor-Blockade durch Candesartan. Dieser Nachweis ist im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur, welche eine Neuroprotektion im ischämischen Insult durch Candesartan belegt, als Bestätigung der herausragenden Rolle der zentralen AT-1-Rezeptoren in der Pathogenese des Schlaganfalles mit der oben beschriebenen Modulation von inflammatorischen und regenerativen Prozessen zu sehen.

7 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein endokriner Regulationsmechanismus zur Konstanthaltung von Plasmavolumen, Plasmaosmolarität und Blutdruck. Die Komponenten des RAS sind sowohl peripher als auch zentral nachweisbar. Die Wirkung des Endproduktes Angiotensin II wird hierbei über AT1- und AT2-Rezeptoren vermittelt. Über den AT1-Rezeptor werden neben der Kreislaufregulation Effekte wie die Zellproliferation, die postischämische Inflammation, die Anti-Apoptose und die Migration verschiedener Zelltypen in das ischämische Areal vermittelt. Über AT2-Rezeptoren werden Anti-Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Anti-Fibrose und Anti-Inflammation reguliert. Die über den AT2-Rezeptor vermittelten Angiotensin II Wirkungen sind zum großen Teil den AT1-Rezeptor-vermittelten Effekten entgegengesetzt.

In tierexperimentellen Studien konnte vielfach nachgewiesen werden, dass eine Blockade von AT1-Rezeptoren zu einer Verminderung des Ausmaßes eines ischämischen Insultes mit begleitender Verringerung des perifokalen Ödems sowie einer deutlichen Verbesserung des neurologischen Defizits nach einem Schlaganfall führt. Diese Arbeiten beziehen sich zum großen Teil auf hypertensive Tiere. Hierbei werden vor allem eine Modulation der cerebralen Autoregulation wie auch eine direkte Wirkung der AT1-Blockade mit konsekutiv vermehrter Stimulation von AT2-Rezeptoren als mögliche Ursache der beobachteten Verbesserungen beschrieben. Aufgrund des zunehmenden Einsatzes von AT-1-Blockern bei normotensiven Patienten mit kardiovaskulären Risikoprofil wurden in jüngerer Vergangenheit zudem mehrere Untersuchungen an normotensiven Tieren durchgeführt. Hier bestätigten sich die positiven Befunde in Hinsicht auf eine Neuroprotektion. Da hierbei Hypertoniebedingte Veränderungen keinen großen Einfluss haben, wurde hierdurch die Bedeutung der AT1-Rezeptor vermittelten Wirkung hervorgehoben. In diesem Zusammenhang scheint vor allem die Modulation der Inflammation und Regeneration in neuronalem Gewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Auch in großen klinischen Studien konnte eine protektive Wirkung von AT1-Rezeptor-Blockern belegt werden.

Wir wollten in der vorliegenden Arbeit die selektive Hemmung der zentralen AT1-Rezeptoren und deren Wirkung auf die Pathophysiologie des Schlaganfalles an normotensiven Tieren untersuchen. Da die Mehrzahl der tierexperimentellen Arbeiten sowie die großen klinischen Studien eine systemische Applikation von AT1-Rezeptor-Blockern verwendet und nur wenige Arbeiten bisher eine zentrale Applikation des Pharmakons durchführten, konzentrierten wir uns daher auf eine intracerebroventrikuläre Injektion des AT1-Blockers. Hierzu wählten wir eine 5-tägige Dauerapplikation via osmotischer Pumpe direkt in den Ventrikel. Erstmals verwendeten wir in dieser Arbeit den hochpotenten AT1-Blocker Candesartan zur intracerebroventrikulären Applikation. Die Dosis des Pharmakons wurde hierbei so gewählt, dass peripher verabreichtes Angiotensin II in seiner Wirkung auf den Kreislauf nicht beeinträchtigt wurde. Hierdurch wurde der Einfluss einer möglichen Blockade von vaskulären (peripheren) AT1-Rezeptoren ausgeschlossen. In unseren Versuchen konnte die Dauer der zentralen Candesartanwirkung bei intracerebroventrikulärer Applikation auf 3-6 Stunden verifiziert werden. Hiernach wählten wir ein Modell der cerebralen Ischämie mittels Ligatur der Arteria carotis communis und Monofilamentokklusion der mittleren Cerebralarterie über 90 Minuten mit anschließender Reperfusion. Als Erfolgsparameter wurden die Ausdehnung des ischämischen Insults und des perifokalen Ödems sowie das hierdurch entstandene neurologische Defizit gewählt. Durch die zentrale Applikation von Candesartan konnten wir eine signifikante Verbesserung der cerebralen Durchblutung in der Therapiegruppe nach Reperfusion zeigen, weiter war eine signifikante Reduktion des neurologischen Defizits sowie eine deutliche aber nicht signifikante Reduktion der Infarktgröße und des perifokalen Ödems evident. Somit belegt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal einen neuroprotektiven Effekt einer rein zentral wirksamen AT1-Rezeptor-Blockade durch Candesartan. Dieser Nachweis ist im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur, welche eine Neuroprotektion im ischämischen Insult durch Candesartan belegt, als Bestätigung der herausragenden Rolle der zentralen AT1-Rezeptoren in der Pathogenese des Schlaganfalles mit der oben beschriebenen Modulation von inflammatorischen und regenerativen Prozessen zu sehen.

8 Literaturverzeichnis

1. An G, Lin T-N, Liu J-S, Xue J-J, He Y-Y, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol*. 1993 May;33(5):457-64.
2. Andreka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH. Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2001 Feb 16;88(3):305-12.
3. Balt JC, Mathy MJ, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Inhibition of facilitation of sympathetic neurotransmission and angiotensin II-induced pressor effects in the pithed rat: comparison between valsartan, candesartan, eprosartan and embusartan. *J Hypertens*. 2001 Dec;19(12):2241-50.
4. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, Hill MD, Buchan AM. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology*. 2001 Apr 24;56(8):1015-20.
5. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986 May-Jun;17(3):472-6.
6. Brdon J, Kaiser S, Hagemann F, Zhao Y, Culman J, Gohlke P. Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J Hypertens*. 2007 Jan;25(1):187-96.
7. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988 Aug;8(4):474-85.
8. Bui JD, Kimura B, Phillips MI. Losartan potassium, a nonpeptide antagonist of angiotensin II, chronically administered p.o. does not readily cross the blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol*. 1992 Aug 14;219(1):147-51.
9. Busche S, Gallinat S, Bohle RM, Reinecke A, Seebeck J, Franke F, Fink L, Zhu M, Sumners C, Unger T. Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A

-
- single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol.* 2000 Aug;157(2):605-11.
10. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2):155-63.
 11. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 1996 Oct;6(5):667-72.
 12. Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens.* 2002 Aug;16 Suppl 3:S64-70.
 13. Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W, Unger T. Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angio-tensin II in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1999 Feb 19;367(2-3):255-65.
 14. Curran T, Morgan JI. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol.* 1995 Mar;26(3):403-12. Review.
 15. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):995-1003.
 16. Dai WJ, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J. 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* 1999; 30:2391–2398.
 17. Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, Sigmund CD. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(1):103-6.
 18. Dawson DA, Ruetzler CA, Carlos TM, Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and microcirculatory perfusion in acute stroke in the SHR. *Keio J Med.* 1996 Sep;45(3):248-52; discussion 252-3.

19. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):415-72.
20. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391-7.
21. Engelhorn T, Goerike S, Doerfler A, Okorn C, Forsting M, Heusch G, Schulz R. The angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan increases cerebral blood flow, reduces infarct size, and improves neurologic outcome after transient cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:467–474.
22. Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 1):1717-27.
23. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation.* 1998 May-Aug;5(3-4):143-59.
24. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):583-686. Review.
25. Forder JP, Munzenmaier DH, Greene AS. Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H1989–H1996.
26. Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, Baron JC. Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol.* 1996 Aug;40(2):216-26.
27. Galea E, Glickstein SB, Feinstein DL, Golanov EV, Reis DJ. Stimulation of cerebellar fastigial nucleus inhibits interleukin-1beta-induced cerebrovascular inflammation. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):H2053-63.
28. Galea E, Golanov EV, Feinstein DL, Kobylarz KA, Glickstein SB, Reis DJ. Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6 Pt 2):H2035-45.

-
29. Gallinat S, Busche S, Schütze S, Krönke M, Unger T. AT₂ receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.* 1999 Jan 22;443(1):75-9.
 30. Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T. 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.* 1998 Jun 1;57(1):111-22.
 31. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995 Apr;26(4):627-34; discussion 635.
 32. Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Köck P, Hacke W, Kiessling M. Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Acta Neuropathol.* 1992;84(5):545-53.
 33. Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M, Kuschinsky W. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Mol Brain Res.* 1996;40: 254–260.
 34. Gohlke P, Kox T, Jürgensen T, von Kügelgen S, Rascher W, Unger T, Culman J. Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002 Jun;365(6):477-83. Epub 2002 Apr 5.
 35. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2):349-55.
 36. Gohlke P, Von Kügelgen S, Jürgensen T, Kox T, Rascher W, Culman J, Unger T. Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Hypertens.* 2002 May;20(5):909-18.
 37. Gohlke P, Weiss S, Jansen A, Wienen W, Stangier J, Rascher W, et al. The AT₁ receptor antagonist, telmisartan, administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298:1–8.

-
38. Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol.* 1997 Oct;122(4):625-30.
 39. Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens.* 2003 Nov;21(11):2175-82.
 40. Hacke W, Brodt T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von Kummer R, Donnan G, Heiss WD, Wahlgren NG, Spranger M, Boysen G, Marler JR. Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology.* 1999;53(7 Suppl 4):S3-14.
 41. Hajdu MA, Heistad DD, Ghoneim S, Baumbach GL. Effects of antihypertensive treatment on composition of cerebral arterioles. *Hypertension.* 1991 Oct;18(4 Suppl):II15-21.
 42. Hallevi H, Hazan-Halevy I, Paran E. Modification of neutrophil adhesion to human endothelial cell line in acute ischemic stroke by dipyridamole and candesartan. *Eur J Neurol.* 2007 Sep;14(9):1002-7.
 43. Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron.* 1995 May;14(5):927-39.
 44. Heiss WD, Thiel A, Grond M, Graf R. Contribution of immediate and delayed ischaemic damage to the volume of final infarcts. *Lancet.* 1999 May 15;353(9165):1677-8.
 45. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 Dec;28(3):370-490.
 46. Herdegen T, Skene P, Bähr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 1997 May;20(5):227-31.
 47. Hiroi N, Marek GJ, Brown JR, Ye H, Saudou F, Vaidya VA, Duman RS, Greenberg ME, Nestler EJ. Essential role of the fosB gene in molecular,

- cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci*. 1998 Sep 1;18(17):6952-62.
48. Hosomi N, Mizushige K, Kitadai M, Ohyama H, Ichihara SI, Takahashi T, Matsuo H. Induced hypertension treatment to improve cerebral ischemic injury after transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1999 Jul 24;835(2):188-96.
49. Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem*. 1996 Jun 28;271(26):15635-41.
50. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Jul;200(1):1-18.
51. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol*. 1995 Jan;268(1 Pt 2):R286-92.
52. Inada Y, Wada T, Ojima M, Sanada T, Shibouta Y, Kanagawa R, Ishimura Y, Fuji-sawa Y, Nishikawa K. Protective effects of candesartan cilexetil (TCV-116) against stroke, kidney dysfunction and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 1997 Oct;19(7):1079-99.
53. Ito T, Yamakawa H, Bregonzio C, Terrón JA, Falcón-Neri A, Saavedra JM. Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*. 2002 Sep;33(9):2297-303.
54. Justicia C, Planas AM. Transforming growth factor- α acting at the epidermal growth factor receptor reduces infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:128-132.
55. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol Cell*. 1998 Mar;1(4):543-51.

-
56. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. Review. No abstract available.
 57. Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh AK, Singh I. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Feb;25(2):177-92.
 58. Kizer JR, Dahlöf B, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Wachtell K, Edelman JM, Snapinn SM, Harris KE, Devereux RB. Stroke reduction in hypertensive adults with cardiac hypertrophy randomized to losartan versus atenolol: the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*. 2005 Jan;45(1):46-52. Epub 2004 Dec 6.
 59. Kjeldsen SE, Lyle PA, Kizer JR, Dahlöf B, Devereux RB, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn SM, Harris KE, Wedel H; LIFE Study Group. The effects of losartan compared to atenolol on stroke in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy. The LIFE study. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005 Mar;7(3):152-8.
 60. Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T. and Ooneda, G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke* 8. 1986: 1–8.
 61. Kwiatkowski TG, Libman RB, Frankel M, Tilley BC, Morgenstern LB, Lu M, Broderick JP, Lewandowski CA, Marler JR, Levine SR, Brott T. Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Recombinant Tissue Plasminogen Activator Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 1999 Jun 10;340(23):1781-7.
 62. Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Ef-

- fect counteracted by the AT1 receptors. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22729-35.
63. Langhorne P. (correspondence to P. Langhorne, No authors listed). How do stroke units improve patient outcomes? A collaborative systematic review of the randomized trials. Stroke Unit Trialists Collaboration. *Stroke.* 1997 Nov;28(11):2139-44. Review.
64. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003 Jun;144(6):2179-83. Review.
65. Li Z, Bains JS, Ferguson AV. Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res Bull.* 1993;30(1-2):33-9.
66. Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A; SCOPE Study Group. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens.* 2003 May;21(5):875-86.
67. Lou M, Blume A, Zhao Y, Gohlke P, Deuschl G, Herdegen T, Culman J. 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* 2004; 24:536–547.
68. Lu Q, Zhu YZ, Wong PT. Neuroprotective effects of candesartan against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport.* 2005 Nov 28;16(17):1963-7.
69. Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med.* 1998 Aug17;188(4):661-70.
70. Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T. Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides.* 1996 Dec;30(6):596-601.
71. McAuley MA. Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1995 Summer;7(2):153-80. Review.

-
72. Muratani H, Teruya H, Sesoko S, Takishita S, Fukiyama K. Brain angiotensin and circulatory control. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996 Jun-Jul;23(6-7):458-64. Review.
 73. Nakamura S, Moriguchi A, Morishita R, Yamada K, Nishii T, Tomita N, Ohishi M, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. Activation of the brain angiotensin system by in vivo human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats. *Hypertension*. 1999 Aug;34(2):302-8.
 74. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):915-8.
 75. Nishimura Y, Ito T, Hoe K, Saavedra JM, a). Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain Res*. 2000 Jul 14;871(1):29-38.
 76. Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM, b). Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2000 Oct;31(10):2478-86.
 77. Nishimura Y, Xu T, Jöhren O, Häuser W, Saavedra JM. The angiotensin AT1 receptor antagonist CV-11974 regulates cerebral blood flow and brain angiotensin AT1 receptor expression. *Basic Res Cardiol*. 1998;93 Suppl 2:63-8.
 78. Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10966-71.
 79. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Jan-Feb;11(1):1-6. Review.
 80. Oberg PA. Laser-Doppler flowmetry. *Crit Rev Biomed Eng*. 1990;18(2):125-63.
 81. Ozacmak VH, Sayan H, Cetin A, Akyildiz-Igdem A. AT1 receptor blocker candesartan-induced attenuation of brain injury of rats subjected to chronic cerebral hypoperfusion. *Neurochem Res*. 2007 Aug;32(8):1314-21. Epub 2007 Mar.

-
82. Padosch SA, Böttiger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischaemia: pathophysiology and possible therapeutic implications. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2003 Oct;16(5):439-45.
 83. Paton JF, Kasparov S. Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - a microinjection study in the rat. *J Physiol.* 1999 Nov 15;521 Pt 1:213-25.
 84. Paxinos G., Watson C. (1986): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition. Academic Press, New York.
 85. Polidori C, Ciccocioppo R, Pompei P, Cirillo R, Massi M. Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Eur J Pharmacol.* 1996 Jul 4;307(3):259-67.
 86. Pueyo ME, Arnal J-F, Rami J, Michel J-B. Angiotensin stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274:C214–C220.
 87. Raizada MK, Sumners C, Lu D. Angiotensin II type 1 receptor mRNA levels in the brains of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem.* 1993 May;60(5):1949-52.
 88. Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci.* 2004 Sep;20(6):1489-98.
 89. Rogers DC, Hunter AJ. Dissociation of effects of glutamate receptor antagonists on excitotoxic and hypoxic neuronal cell death in a novel rat cortical culture system. *Brain Res Bull.* 1997;44(2):131-9.
 90. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992 May;13(2):329-80. Review. No abstract available.
 91. Sackin H. Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:333-53. Review. No abstract available.
 92. Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):1187-9.
 93. Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, Einhäupl K, Diener HC, Dominiak P; Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors Study Group. The ACCESS Study: evaluation of Acute Cande-

- sartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke*. 2003 Jul;34(7):1699-703. Epub 2003 Jun 19.
94. Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, Hammersen F, Plate K, Berger J, Zidek W, Dominiak P, Diener HC; MOSES Study Group. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke*. 2005 Jun;36(6):1218-26. Epub 2005 May 5.
95. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J-i, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*. 1996;56:2161–2166.
96. Skarphedinsson JO, Hårding H, Thorén P. Repeated measurements of cerebral blood flow in rats. Comparisons between the hydrogen clearance method and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol Scand*. 1988 Sep;134(1):133-42.
97. Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C, Thiel G. Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J*. 2001 Dec 15;360(Pt 3):599-607.
98. Stier CT Jr, Adler LA, Levine S, Chander PN. Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*. 1993 Apr;11(3):S37-42.
99. Sturrock ED, Natesh R, van Rooyen JM, Acharya KR. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Nov;61(21):2677-86.
100. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:290–293.
101. Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J*. 2001 Nov;15(13):2518-20. Epub 2001 Sep 17.
102. Thompson EB, Thulasi R, Saeed MF, Johnson BH. Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in

-
- human leukemic CEM-C7 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jun 12;761:261-75.
103. Tsutsumi K, Strömberg C, Viswanathan M, Saavedra JM. Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology.* 1991 Aug;129(2):1075-82.
104. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertension.* 1996;14(suppl 5):S95–S103.
105. Unger T. Differences among angiotensin II type 1 receptor blockers: characteristics of candesartan cilexetil. *Blood Press Suppl.* 2000;1:14-8. Review.
106. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens.* 1999 Dec;17(12 Pt 2):1775-86.
107. Van Lookeren Campagne M, Verheul HB, Vermeulen JP, Balázs R, Boer GJ, Nicolay K. Developmental changes in NMDA-induced cell swelling and its transition to necrosis measured with ¹H magnetic resonance imaging, impedance and histology. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996 May 31;93(1-2):109-19.
108. Vanderheyden PM, Fierens FL, De Backer JP, Fraeyman N, Vauquelin G. Distinction between surmountable and insurmountable selective AT1 receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT1 receptors. *Br J Pharmacol.* 1999 Feb;126(4):1057-65.
109. Vauquelin G, Fierens F, Verheijen I, Vanderheyden P. Insurmountable AT(1) receptor antagonism: the need for different antagonist binding states of the receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jul;22(7):343-4. No abstract available.
110. Véniant M, Clozel JP, Kuhn H, Clozel M. Protective effect of cilazapril on the cerebral circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19 Suppl 6:S94-9. Review.
111. von Lutterotti N, Camargo MJ, Campbell WG Jr, Mueller FB, Timmermans PB, Sealey JE, Laragh JH. Angiotensin II receptor antagonist delays renal

- damage and stroke in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 1992 Sep;10(9):949-57.
112. Vraamark T, Waldemar G, Strandgaard S, Paulson OB. Angiotensin II receptor antagonist CV-11974 and cerebral blood flow autoregulation. *J Hypertens.* 1995 Jul;13(7):755-61.
113. Walton M, MacGibbon G, Young D, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. Do c-Jun, c-Fos, and amyloid precursor protein play a role in neuronal death or survival? *J Neurosci Res.* 1998 Aug 1;53(3):330-42.
114. Wei EP, Ellison MD, Kontos HA, Povlishock JT. O₂ radicals in arachidonate-induced increased blood brain barrier permeability to proteins. *Am J Physiol.* 1986;251:H693-H699.
115. Wiens M. [Fundamental mechanisms of apoptosis in the simplest invertebrates, the Porifera]. [Article in German]. *Z Gerontol Geriatr.* 2004 Jun;37(3):190-9.
116. Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ, Kannel WB. Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke.* 1992 Nov;23(11):1551-5.
117. Yamakawa, Phillips MI, Saavedra JM. Intracisternal administration of angiotensin II AT1 receptor antisense oligodeoxynucleotides protects against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept* 2003; 111:117-122.
118. Yang H, Lu D, Vinson GP, Raizada MK. Involvement of MAP kinase in angiotensin II-induced phosphorylation and intracellular targeting of neuronal AT1 receptors. *J Neurosci.* 1997 Mar 1;17(5):1660-9.
119. Zhang Y, Pardridge WM. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke.* 2001 Jun;32(6):1378-84.
120. Zhao Y, Biermann T, Culman J, Luther C, Unger T, Gohlke P. Contribution of bradykinin and nitric oxide to the AT2 receptor-mediated differentiation in PC12 W cells. *J Neurochem* 2003; 85:759-767.

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Bei Unterbrechung der Nährstoffversorgung kommt es innerhalb von Minuten durch Exzitotoxizität zur Zellschädigung. Durch die Peri-Infarkt-Depolarisation und die später einsetzende Inflammation wird umliegendes Gewebe geschädigt und geht konsekutiv in Apoptose [Dirnagl et al. 1999]..... 3
- Abbildung 2: Schematischer Aufbau der ALZET Osmotic Pump model 2ML4. 16
- Abbildung 3: Intraoperative Sicht auf die Kalotte mit Schädelnähten. 16
- Abbildung 4: Anatomische Skizzen der Karotiden mit Verschluss der Acc und Acm.22
- Abbildung 5: Die Bilder zeigen serielle, 40 µm dicke Gehirnschnitte, welche mit Kresylviolette gefärbt wurden. A = Vorbehandlung der Tiere mit NaCl, B = Vorbehandlung der Tiere mit Candesartan 0.1 nmol/h.....29
- Abbildung 6: Anstieg des mittleren arteriellen Drucks (Delta MAP) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.1 Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II. 34
- Abbildung 7: Anstieg / Senkung der Herzfrequenz (Delta HR) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.1 Dosisfindung einer rein zentralen Candesartanwirkung). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II. 34
- Abbildung 8 : Anstieg des Blutdruckes (Delta MAP) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II. 36
- Abbildung 9 : Anstieg / Abfall der Herzfrequenz (Delta HR) in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe)..... 36
- Abbildung 10: Änderung des Wasserverbrauches in den verschiedenen Versuchsgruppen (Siehe 4.4.2 Dauer der zentralen Ang II-Hemmung bei einmaliger Candesartangabe). *: $p \leq 0.05$ gegenüber Kontrollgruppe Ang II. 37
- Abbildung 11: Änderung des cerebralen Blutflusses während der 90-minütigen MCAO/Ligatur der Acc und während der Reperfusion in den beiden Gruppen

(Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen). *: $p \leq 0.05$ für Candesartan 20 min versus Ausgangswert bzw. versus 30min nach Reperfusion; **: $p \leq 0.05$ für Kontrolle 20 min versus Ausgangswert. Acc = Arteria carotis communis, MCAO = middle cerebral artery occlusion..... 38

Abbildung 12: Evaluation des neurologischen Defizits 24h/48 h nach MCAO/Ligatur der Acc und Reperfusion nach Garcia inklusive/ exklusive Spontanaktivität sowie nach Bederson in den beiden Gruppen (Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen). *: $p \leq 0.05$ für Candesartan versus Kontrolle..... 39

Abbildung 13: Vergleich des Infarkt- und Ödemvolumens nach MCAO/Ligatur der Acc und Reperfusion in den beiden Gruppen (Siehe 4.7 Hauptversuche: Experimentelle Gruppen). 40

10 Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname: Katja Maydowski
Geburtsdatum: 08.03.1980
Geburtsort: Carlow
Familienstand: Geschieden

Schulischer Werdegang

1986-92: Anne-Frank-Grundschule Carlow
1992-98: Gymnasium Gadebusch Carlow (1998 Abitur)

Universitärer Werdegang

03/99-03/02: Studium der Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen
03/02-05/06: Studium der Humanmedizin
Christian-Albrechts-Universität Kiel
28.08.2001 Ärztliche Vorprüfung
29.08.2002 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
15.09.2004 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
17.05.2006 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Arbeitsverhältnisse

06/06-01/07: Assistenzarzt
Abteilung für Innere Medizin (Chefarzt Dr. M Strigel)
Krankenhaus Stockach
seit 02/07: Assistenzarzt
Abteilung für Neurologie (Chefarzt Dr. W. Kusch)
Herz-Jesu-Krankenhaus Münster

11 Danksagung

Herrn PD Dr. Juraj Culman danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie die persönliche und fachlich ausgezeichnete Unterstützung bei der Bearbeitung der Dissertation.

Herrn Jan Brdon danke ich in besonderer Weise für die exzellente Hilfe und lustige Zeit bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche. Im diesem Rahmen möchte ich mich ebenfalls bei allen weiteren Mitarbeitern des Tierstalles bedanken.

Bei Frau Dr. Zhao Yi bedanke ich mich für die Unterstützung in der Durchführung der histologischen Aufarbeitungen und Färbungen sowie für ihre Geduld mit mir und ihre tatkräftige Hilfe bei dieser Arbeit.

Meinen besonderen Dank richte ich an Frau Marion Pauer, welche mir durch ihren persönlichen Einsatz eine erfolgreiche Durchführung meiner Dissertation ermöglicht hat.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Partner Dr. med. Richard Hummel richten, ohne den ich niemals ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen hätte. Er hat nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden, sondern mir mit seinem Fachwissen, seiner konstruktiven Kritik und seinen vielen Ideen immer wieder den nötigen Antrieb gegeben, um diese Arbeit in der jetzigen Form fertig zu stellen.

An erster Stelle möchte ich jedoch meiner Familie danken, die immer für mich da ist und die ich in allen Lebenssituationen an meiner Seite weiß. Ohne Sie wären ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden. Danke!