

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

**Omapatrilat: Zentrale Effekte und die Penetration durch die Blut-
Hirn-Schranke bei der Ratte**

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

vorgelegt von

Wenke Schmedt auf der Günne
aus Osnabrück
Kiel 2017

1. Berichterstatter: Apl. Prof. Dr. Dr. Juraj Culman, Institut für Experimentelle u. Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wilfrid Jänig, Physiologisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.06.2017

(gez.: Prof. Dr. Peter Gohlke, Institut für Experimentelle u. Klinische Pharmakologie; Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	2
1.1.	RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM	3
1.2.	NATRIURETISCHES-PEPTID-SYSTEM.....	6
1.3.	OMAPATRILAT	9
1.4.	BLUT-HIRN-SCHRANKE	10
1.5.	FRAGESTELLUNG	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1.	VERSUCHSTIERE	14
2.2.	PHARMAKA UND CHEMIKALIEN	14
2.3.	GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN	15
2.4.	HERSTELLUNG UND IMPLANTATION VON KATHETERN.....	15
2.5.	MESSUNG DES MITTLEREN ARTERIELLEN BLUTDRUCKES UND DER HERZFREQUENZ.....	17
2.6.	APPLIKATION DER SUBSTANZEN	17
2.7.	STATISTISCHE ANALYSE	17
3.	VERSUCHSPROTOKOLLE UND ERGEBNISSE	19
3.1.	EINFLUSS VON INTRACEREBROVENTRIKULÄR APPLIZIERTEM OMAPATRILAT AUF DEN ANG I (INTRACEREBROVENTRIKULÄR ODER INTRAVENÖS) -INDUZIERTEN BLUTDRUCKANSTIEG	21
3.2.	EINFLUSS VON ORAL APPLIZIERTEM OMAPATRILAT AUF DEN ANG I (INTRAVENÖS ODER INTRACEREBROVENTRIKULÄR) -INDUZIERTEN BLUTDRUCKANSTIEG	25
3.3.	EINFLUSS VON INTRAVENÖS APPLIZIERTEM OMAPATRILAT AUF DEN ANG I (INTRAVENÖS ODER INTRACEREBROVENTRIKULÄR) -INDUZIERTEN BLUTDRUCKANSTIEG	28
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	42
6.	REFERENZEN	44
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
8.	ORIGINALREGISTRIERUNG	58
9.	DANKSAGUNG	61
10.	LEBENS LAUF	62
11.	VERÖFFENTLICHUNGEN	63

1. Einleitung

Omapatrilat (OMA) gehört zu einer Klasse von Antihypertensiva, den sogenannten Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI). Es hemmt gleichzeitig und mit ähnlicher Potenz die Neutrale Endopeptidase (NEP) und das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE). Auf diese Weise werden zwei wichtige Systeme der kardiovaskulären Regulation beeinflusst: das Natriuretische-Peptid-System (NPS) und das Renin-Angiotensin-System (RAS). Eine wesentliche Bedeutung bei der Regulation von Blutdruck, Volumen- und Elektrolythaushalt kommt dem RAS zu. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind gut untersucht und weitgehend bekannt. Das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II), welches durch das ACE aus der Vorstufe Angiotensin I (Ang I) gebildet wird, stellt das Haupteffektorhormon des RAS dar. Es ist sowohl an physiologischen Abläufen im Rahmen der Kreislaufregulation, z. B. dem Blutdruckanstieg nach einem Volumenmangel, als auch an pathologischen Strukturveränderungen an Gefäßen, Herz, und Gehirn beteiligt. An dieser Stelle sind zu nennen: die Mediahypertrophie der Blutgefäße, die Ventrikelhypertrophie und die Nephrosklerose. Weiterhin spielt Ang II eine Rolle bei strukturellen Umbauprozessen (*remodeling*), wie sie im Rahmen von Herzischämien auftreten. An Abläufen während eines Schlaganfalls ist Ang II ebenso beteiligt. Im klinischen Alltag gut etabliert sind die Angiotensin Typ 1-Rezeptor (AT1-Rezeptor)-Antagonisten und die ACE-Hemmstoffe, die an unterschiedlichen Stellen in das RAS eingreifen. Bereits seit Jahren werden sie zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, der chronischen Herzinsuffizienz, nach Myokardinfarkt und bei diabetischer Nephropathie eingesetzt.

Neben dem RAS ist in den letzten Jahren die Bedeutung des NPS für die Kreislaufregulation herausgearbeitet worden. Die natriuretischen Peptide (NP) können die Blutdruckantwort durch renale, zentrale und lokal vaskuläre Mechanismen regulieren. Als natürliche Gegenspieler des RAS sind sie vasodilatatorisch, natriuretisch, diuretisch und antiproliferativ wirksam. Die NEP ist für die Inaktivierung der endogen gebildeten NP verantwortlich. Die Hemmung dieses Enzyms führt zu einem Konzentrationsanstieg dieser Peptide. Im Gegensatz zur gut etablierten Hemmung des RAS konnte das NPS durch pharmakologische Intervention lange nicht zufriedenstellend beeinflusst werden. Reine Hemmstoffe der NEP haben sich bei der Behandlung der Hypertonie als unzureichend wirksam erwiesen. Die fehlende Blutdrucksenkung ist vermutlich durch Aktivitätszunahme des RAS erklärt. Erst durch die kombinierte Hemmung beider Systeme, wie bei VPI, gelang es hämodynamische Effekte zu erzielen. Als erster klinisch verfügbarer Vertreter der VPI hat sich OMA als wirksam in der Behandlung der arteriellen Hypertonie und Herzinsuffizienz erwiesen. Die Kombination von zwei wichtigen pharmakologischen

Prinzipien führt im Tiermodell sowie in klinischen Studien zu einer ausgeprägten dosisabhängigen Blutdrucksenkung. Daneben gibt es Hinweise auf organoprotektive Effekte, die ein wesentliches Ziel neben der antihypertensiven Therapie darstellen. Über eine mögliche Cerebroprotektion, die man vor allem den AT1-Rezeptorantagonisten aber auch ACE-Hemmstoffen zuspricht, ist bisher noch nichts bekannt. Sowohl das RAS als auch das NPS konnte auch im Gehirn nachgewiesen werden.

In der hier vorliegenden Studie wurde untersucht, ob OMA nach systemischer Gabe, d.h. per oral (po) oder intravenös (iv) verabreicht, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) penetrieren und auf diese Weise zentral wirken kann.

1.1. Renin-Angiotensin-System

Das klassische RAS ist ein Hormonsystem, welches auf das Blut beschränkt ist. Das α 2-Globulin Angiotensinogen, das Präkursorprotein der Angiotensinpeptide, wird von der Leber konstitutiv ins Blut sezerniert. Die Aspartylprotease Renin wird durch verschiedene Reize aus den juxtaglomerulären Zellen der Nieren in die Blutbahn freigesetzt und spaltet dort aus dem Angiotensinogen das Dekapeptid Ang I ab. Die Reninfreisetzung wird durch Natrium- und Volumenmangel und Blutdruckabfall stimuliert. Aus Ang I wird durch das vorwiegend endothelständige ACE das Oktapeptid Ang II, das biologisch wirksame Angiotensinpeptid, abgespalten. Der Abbau durch Angiotensinasen führt schließlich zu inaktiven Metaboliten. Die über den AT1-Rezeptor vermittelten Effekte von Ang II sind: Vasokonstriktion, Sympathikusaktivierung, Vasopressin (AVP)- und Endothelinfreisetzung, Aldosteronfreisetzung und eine Stimulation von Wachstumsfaktoren.

Neben dem klassischen peripheren RAS konnten weiterer Gewebe ständige RAS im Gehirn, Niere, Gefäßwand, Herz und Nebenniere nachgewiesen werden. Über den klassischen Signaltransduktionsweg hinaus wurden in den letzten Jahren weitere Achsen entdeckt: Prorenin/Proreninrezeptor/MAP Kinase Achse, ACE2/Ang1-7/MAS Rezeptor Achse, AngIV/AT4/Insulin-regulierte Aminopeptidase Achse. Aktuelle Studien konnten darüber hinaus die Existenz eines intrazellulären RAS beweisen (Zhuo et al. 2011; Gwathmey et al. 2012).

Angiotensinrezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen

Ang II aktiviert zwei Subtypen von Angiotensinrezeptoren, den AT1- und den Angiotensin Typ 2-Rezeptor (AT2-Rezeptor). Zum großen Teil sind die Effekte, die über den AT1- und AT2-Rezeptor vermittelt werden, entgegengesetzt. Die meisten klassischen physiologischen Effekte von Ang II auf das kardiovaskuläre System (direkte arterielle

Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, Aktivierung des Sympathikus, Wasser- und Natriumretention in der Niere) sind an den AT1-Rezeptor gekoppelt. Dieser Rezeptor ist zudem in pathophysiologische Prozesse wie z.B. der Gefäßmediahypertrophie, Ventrikelhypertrophie, Nephrosklerose sowie an Umbauprozessen nach Gewebsschädigung involviert. Der AT1-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Die Bindung von Ang II an den AT1-Rezeptor aktiviert 4 klassische Signalkaskaden, nämlich Phospholipase A2, Phospholipase C, Phospholipase D und Kalzium Kanäle vom L-Typ (Diem et al. 2001). Dies führt zu einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium, einer nachfolgenden Aktivierung der Proteinkinase C und letztlich zur Vasokonstriktion. Außerdem wird durch Bindung von Ang II an den AT1-Rezeptor die Adenylatzyklase blockiert, was letztlich vasokonstriktorisch wirkt. In einer weiteren Kaskade kommt es zur Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen (z.B. Kinasen) und schließlich zur Aktivierung von induzierbaren Transkriptionsfaktoren (ITF) wie c-Fos und c-Jun (Blume et al. 1999). Durch Aktivierung der wachstumsrelevanten ITF über den AT1-Rezeptor werden die trophischen Effekte von Ang II vermittelt (Blume et al. 1999).

Der AT2-Rezeptor wird sehr stark in fetalen Geweben exprimiert, dagegen kaum in bereits ausdifferenziertem Gewebe, wie dem Gehirn von Erwachsenen (de Gasparo et al. 2000). Beim Erwachsenen werden die AT2-Rezeptoren nur noch in wenigen Organen (z.B. Uterus, Herz und wenige Gehirnareale) gebildet. Eine erhöhte Expression von AT2-Rezeptoren konnte im Rahmen von pathologischen Prozessen, so z.B. nach einem Herzinfarkt nachgewiesen werden (Unger et al. 1999). Die Bindung von Ang II an den AT2-Rezeptor führt zu einer Hemmung der Zellproliferation und zur Differenzierung und Regeneration, so konnte im Tiermodell an Mäusen die Atherogenese reduziert werden (Tiyerili et al. 2012). Auch in neuronalem Gewebe ist der AT2-Rezeptor nach Schädigung vermehrt exprimiert und kann eine neuronale Differenzierung und Regeneration induzieren (Lucius et al. 1998; Wu et al. 2013).

Das zerebrale Renin-Angiotensin-System

Das zentrale RAS ist an der kardiovaskulären Regulation und der Flüssigkeits-Elektrolyt Homeostase beteiligt und komplementiert auf diese Weise die klassischen Funktionen des peripheren RAS. Daneben scheint es bei Gehirn-spezifischen Funktionen wie Erinnerung, Stress, Lernprozessen eine Rolle zu spielen (Culman et al. 2001). Im Unterschied zu allen anderen lokalen RAS ist das zerebrale vom systemischen RAS durch die BHS getrennt. Angiotensinogen kommt weitverbreitet im Gehirn vor, hohe Konzentrationen konnten im Hypothalamus und Hirnstamm nachgewiesen werden. Die Synthese von Angiotensinogen findet hauptsächlich in den Gliazellen wie den Astrozyten und den Ependymzellen statt (Imboden et al. 1987).

Renin ist im Hypothalamus, im Cerebellum und in der Amygdala besonders hoch konzentriert. Der Nachweis von Renin gelang sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen (Healy et al. 1984).

ACE konnte in allen Gehirnarealen nachgewiesen werden. Besonders hohe Konzentrationen finden sich im Plexus choroideus (PC), im Ependym der Ventrikel, in den Mikrogefäßen sowie in den circumventrikulären Organen (CVOs) (Subfornikalorgan (SFO) und im Organum vasculorum Laminae terminalis (OVLT)) (Chai et al. 1987; Correa et al. 1987). Im Gehirn ist ACE in Gliazellen, Neuronen, neuronalen Plasmamembranen und Gefäßendothelien lokalisiert (Pickel et al. 1986; Strittmacher et al. 1984). Das zentrale ACE ist ähnlich wie das periphere kein substratspezifisches Enzym. Es hydrolisiert verschiedene Peptide wie z.B. Bradykinin, Opiode, Substanz P und andere.

Ang II konnte im Gehirn ubiquitär nachgewiesen werden. Es fanden sich viele angiotensinerge Neuronen und Synapsen im Hypothalamus. Im Hirnstamm befinden sich Ang II-immunreaktive Neurone im Nucleus tractus solitarii (NTS). Aufgrund der nahen Lokalisation vagaler Afferenzen in diesem Kerngebiet, vermutet man einen Einfluss von Ang II auf den Barorezeptorreflex. Mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden konnten angiotensinerge Afferenzen vom Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) zur Neurohypophyse dargestellt werden (Imboden et al. 1989).

Im zentralen Nervensystem (ZNS) dominiert in allen Kerngebieten, die an der Kreislauf- und Volumenregulation sowie an der Vermittlung zentraler Ang II Effekte beteiligt sind, der AT1-Rezeptor (Obermüller et al. 1991), so im PVN und im Nucleus supraopticus (SON) des Hypothalamus sowie im limbischen System und Hirnstamm. Die anatomischen Projektionen zu den präoptischen, vorderen hypothalamischen und limbischen Strukturen bedingen eine Trinkantwort, diejenigen zum PVN und SON eine Ausschüttung von AVP aus der Neurohypophyse. Auch im Hirnstamm sind AT1-Rezeptoren im NTS exprimiert. Man vermutet, dass Ang II hier eine Inhibition des Barorezeptorreflexes bewirkt. Auf zellulärer Basis kommen Angiotensin-Rezeptoren auf Neuronen als auch auf Astrozyten vor (Sumners et al. 1990).

Trotz seines geringen Vorkommens im erwachsenen Gehirn scheint auch der AT2-Rezeptor an der Regulation des Blutdruckes und der Wasseraufnahme involviert zu sein (Höhle et al. 1995). Der AT2-Rezeptor ist hauptsächlich im Locus coeruleus, in ventralen und dorsalen Teilen des lateralen Septums, in einigen Kernen des Thalamus sowie in dem Nucleus olivaris inferior lokalisiert (Song et al. 1992).

Zentrale Effekte von Angiotensin II

Nach intracerebroventrikulärer (icv) Gabe von Ang II kommt es zum Blutdruckanstieg, zur AVP-Sekretion und zur Trinkantwort (Hogarty et al. 1992). Weiterhin ist Ang II im Gehirn an

der Expression von ITF beteiligt (Blume et al. 1999). Die Wirkung von Ang II nach intravenöser (iv) und icv Gabe auf die ITF wurde in vielen Untersuchungen dargestellt. Man vermutet, dass Ang II nach iv Injektion AT1-Rezeptoren im SFO und OVLT stimuliert. In diesen Bereichen des Gehirns, in denen die BHS fehlt, war dementsprechend die ITF-Expression erhöht (McKinley et al. 1992). Nach icv Gabe von Ang II konnte in anderen zentralen Regionen wie dem Nucleus praeopticus medianus (MnPO), SON und PVN c-Fos und c-Jun verstärkt nachgewiesen werden (McKinley et al. 1995; Lebrun et al. 1995). Auch endokrine Prozesse werden durch Ang II beeinflusst. So wird die Sekretion verschiedener hypothalamischer und hypophysärer Hormone (AVP, Oxytocin, *Corticotropin releasing hormon*) angeregt (Lang et al. 1982; Saavedra et al. 2004). Studien belegen ausserdem Wechselwirkungen mit Neurotransmittern, wie Noradrenalin, Dopamin und Acetylcholin (Saavedra et al. 1992). Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass eine hohe Aktivität des zerebralen RAS für die Auslösung und Aufrechterhaltung eines Hypertonus entscheidend ist (Raizada et al. 1993; Phillips et al. 1997; Nakamura et al. 1999).

1.2. Natriuretisches-Peptid-System

Das NPS spielt neben dem RAS eine wichtige Rolle bei der Blutdruck- und Volumenregulation. Seine Haupteffektorpeptide sind das atriale natriuretische Peptid (ANP), das Brain natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). Die vielfältigen physiologischen Wirkungen werden über die 2 natriuretischen Peptidrezeptoren A und B (NPR-A Rezeptor und NPR-B Rezeptor), an der Oberfläche der Zielzellen vermittelt. Das Schlüsselenzym im Abbau der NP ist die NEP. In geringem Umfang werden sie auch durch einen membrangebundenen Rezeptor, den natriuretischen Peptid-Clearance-Rezeptor, aus dem Kreislauf eliminiert. Pathophysiologisch wird die Stimulation des NPS bei Hypertonie und Herzinsuffizienz als kompensatorischer Mechanismus angesehen. Durch die Senkung von Vor- und Nachlast in Verbindung mit einer Hemmung des RAS und Sympathikus können NP der neuroendokrinen Wirkung bei Herzinsuffizienz entgegenwirken. Therapieversuche mit BNP konnten den therapeutischen Nutzen dieses Prinzips bei dekompensierter Herzinsuffizienz demonstrieren (Mills et al. 1999). BNP wird diagnostisch als Marker von Erkrankungen eingesetzt, die mit einer gestörten links- und rechtsventrikulären Funktion einhergehen (Silver et al. 2004).

ANP

ANP wird vorwiegend in den Herzvorhöfen produziert, dort in Granula gespeichert und bei erhöhter Vorhofspannung freigesetzt (Stein und Levin 1998). Daneben können

verschiedene Hormone und Neurotransmitter, wie Endothelin, AVP und Katecholamine die Sekretion von ANP direkt stimulieren. Das menschliche ANP Präkursor-Peptid-Gen (Nppa) kodiert für ein 151 Aminosäuren langes Preprohormon, das proteolytisch in das aus 126 Aminosäuren bestehende pro-ANP umgewandelt wird. In dieser Form wird es in den Vorhofmyozyten gespeichert. Pro-ANP wird in 2 Fragmente gespalten, zum einen das pro-ANP 1-98 und zum anderen das 27 Aminosäuren lange Carboxy-Fragment ANP 99-126, das die biologisch aktive Form darstellt. Sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen lassen sich diese Fragmente im Blutplasma nachweisen. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt (Stein und Levin 1998) konnten erhöhte Plasmaspiegel beobachtet werden. ANP bindet vor allem an den NPR-A-Rezeptor, der seine c-GMP-abhängige Signalkaskade aktiviert.

BNP

Menschliches BNP wird zunächst als 132 Aminosäuren langes Prepropeptid synthetisiert und dann durch Endoproteasen in das Prekursorprotein pro-BNP 1-108 (108 Aminosäuren) verwandelt. Die biologisch wirksame Form von BNP ist ein aus dem pro-BNP abgespaltenes Fragment mit 32 Aminosäuren. BNP wird vorwiegend im Ventrikelmyokard produziert. Die Freisetzung erfolgt nach ventrikulärer Druck- und Volumenbelastung. Erhöhte Plasmaspiegel können bei Patienten mit ventrikulärer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Maisel et al. 2007). Wie ANP übt BNP seine Wirkung vorwiegend über den NPR-A Rezeptor aus.

CNP

Aus einem 103 Aminosäuren langen Propeptid werden die beiden CNP-Fragmente CNP-22 und CNP-53 produziert. Das kürzere CNP-22 stellt die biologisch aktive und quantitativ vorherrschende Form dar. CNP ist im menschlichen Organismus weit verbreitet, die höchsten Konzentrationen konnten in ZNS und in den Gefäßendothelien nachgewiesen werden. Sowohl im Plasma als auch im Herzen kommt CNP nur in geringen Konzentrationen vor. Als Reaktion auf Scherbelastung des Endothels wird CNP freigesetzt (Chen et al. 1998). CNP bindet im Gegensatz zu ANP und BNP an den NPR-B Rezeptor.

Neutrale Endopeptidase

Das Enzym NEP ist eine Metalloendopeptidase und enthält in seinem aktiven Zentrum Zink. Als membrangebundenes, extrazelluläres Enzym konnte es in hohen Konzentrationen in der Niere, im ZNS, in der Gefäßwand und in Leukozyten nachgewiesen

werden (Molinaro et al. 2002). Die NEP beeinflusst auf vielfältige Weise die Funktion kardiovaskulär wirksamer Hormone wie z.B. Bradykinin, NP, Adrenomedullin und das Ang 1-7.

Physiologische Wirkungen der Natriuretischen Peptide

Im Rahmen der Blutdruck- und Volumenregulation spielen ANP und BNP eine wichtige Rolle. Diese beiden Peptide bewirken eine Blutdrucksenkung insbesondere durch die Auslösung einer Natriurese und Diurese in der Niere und einer Hemmung des RAS. Neben der vermehrten Flüssigkeitsausscheidung bewirken die NP, besonders ANP eine Umverteilung von intravasaler Flüssigkeit in extravasale Kompartimente (Wijeyaratne et al. 1993). Durch Verminderung der sympathikotonen Wirkung am peripheren Nervensystem führen die NP zu einer Vasorelaxation. Daneben kann ANP die Bindung von Endothelin, einem starken Vasokonstriktor, vermindern. Die durch NP bedingte Stimulation der Natriurese und Diurese ist auf Wirkungen auf die renale Durchblutung und auf direkte tubuläre Effekte zurückzuführen (Marin-Grez et al. 1986). Gleichzeitig werden die Plasmarenin- und Aldosteronkonzentrationen reduziert und die Ang II stimulierte Aldosteronsekretion gehemmt (Wijeyaratne et al. 1993). CNP hat keine direkten natriuretischen oder diuretischen Effekte, kann allerdings indirekt über Inhibition der Aldosteronausschüttung an der Niere wirksam werden.

Zentrale Effekte

Über verschiedene zentrale Mechanismen tragen NP zur Volumen- und Elektrolytregulation, sowie Blutdruckregulation bei. Obwohl ANP und BNP die BHS nicht passieren können, erreichen sie Bereiche im ZNS außerhalb der BHS wie z.B. SFO, Eminentia mediana und Area postrema. Wie in der Peripherie, binden sie im Gehirn an den NPR-A Rezeptor, der vor allem in der Umgebung des 3. Ventrikels zu finden ist. Alle 3 natriuretischen Peptide können im Gehirn produziert werden. Endothelin, AVP und Norepinephrin, aber nicht Ang II, stimulieren die Freisetzung von ANP aus hypothalamischen Neuronen. Die zentralen Wirkungen von ANP, wie Hemmung des Salzappetits (Blackburn et al. 1995) und Durstgefühls, sowie die Inhibition der AVP-Sekretion, verstärken und komplementieren die Wirkungen in der Peripherie. Die Effekte auf den Sympathikotonus sind nicht eindeutig. Im Hirnstamm können NP den Sympathikotonus hemmen (Steele et al. 1991), allerdings ist eine indirekte Sympathikusaktivierung über vermindert abgebaute Substanz P auch vorstellbar (Unger et al. 1985). Speziell CNP scheint im ZNS eine wichtige Rolle zu spielen. Der NPR-B Rezeptor ist im Gegensatz zum NPR-A Rezeptor zentral in den meisten Gehirnregionen

vorhanden, besonders häufig im Hypothalamus und in den rostralen Hirnregionen, wo die Sekretion von AVP inhibiert wird. Paradoxerweise scheint CNP hier den Sympathikotonus zu stimulieren. Die Arbeitsgruppe um Levin (1991) konnte nachweisen, dass CNP antiproliferative Effekte auf die Astroglia hat.

1.3. Omapatrilat

OMA (BMS 186716) gehört zu einer neuen Klasse von Antihypertensiva, den sogenannten VPI. Es ist ein Mercaptoacyl-Derivat eines bizyklischen Thiazepinon-Dipeptid-Surrogats ($C_{19}H_{24}N_2O_4S_2$) mit einem Molekulargewicht von 408,5. OMA hat eine orale Bioverfügbarkeit von 30%. Aufgrund seines lipophilen Charakters wird es zu ca. 80% an Plasmaeiweiß gebunden. OMA wird in der Leber metabolisiert und renal eliminiert. Die effektive Halbwertszeit von OMA liegt bei 14-19 Stunden (Rouleau et al. 2000). Es hemmt gleichzeitig und mit ähnlicher Potenz die NEP und das ACE. Die Inhibition des RAS und die gleichzeitige Potenzierung des NPS bewirken eine Abnahme der Vasokonstriktion und eine Verstärkung der Vasodilatation. Diese Reduktion des Gefäßtonus führt zu einer effektiven Blutdrucksenkung. Die hämodynamischen Effekte der kombinierten ACE- und NEP-Hemmung sind wesentlich ausgeprägter als diejenigen, die durch die Hemmung der einzelnen Enzyme zu erzielen sind (Fournie-Zaluski et al. 1996).

OMA weist im Gegensatz zu ACE-Hemmstoffen eine antihypertensive Wirkung in Tiermodellen mit niedrigem, normalem und hohem Renin auf. Dies bedeutet, dass die Blutdruck senkende Wirkung von OMA unabhängig vom Status des RAS auftritt. Bei SHR führt es zu einer stark ausgeprägten und anhaltenden Blutdrucksenkung. Die organoprotektiven Eigenschaften von OMA sind in mehreren experimentellen Studien vergleichend mit ACE-Hemmern untersucht worden. Bei salzsensitiven Dahl-Ratten ist die endothelabhängige Relaxation von Aorta und Mesenterialgefäßen bei OMA behandelten Tieren ausgeprägter als in der Gruppe, die mit Captopril behandelt wurde (D'Uscio et al., 2001). In Tiermodellen an kardiomyopathischen Hamstern einer Herzinsuffizienz zeigte OMA in Bezug auf Verbesserung der Herzleistung, des ventrikulären *remodeling* und der Verlängerung der Überlebenszeit eine höhere Wirksamkeit als ACE-Hemmstoffe (Trippodo et al. 1998). Die Blutdruck senkende Wirkung von 40 mg OMA pro Tag war in einer Therapiestudie bei salzsensitiven Hypertonikern der Gabe von 20 mg Lisinopril pro Tag überlegen (Campese et al. 2001). Eine weitere Hypertoniestudie (OCTAVE) bestätigte die hohe therapeutische Effizienz von OMA. Die OCTAVE-Studie verglich die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Vasopeptidase-Inhibitors OMA mit dem ACE-Hemmer Enalapril. Hinsichtlich nephroprotektiver Effekte wurde für die Therapie mit OMA im Vergleich zu Enalapril über Vorteile berichtet (Taal et al. 2001). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz der

NYHA-Klassen II–IV zeigte sich in der IMPRESS-Studie (Rouleau et al. 2000) nur ein tendenzieller Vorteil von OMA gegenüber Lisinopril bezüglich des kombinierten Endpunkts aus Tod und kardialer Dekompensation. Unter OMA war eine Verschlechterung der Niereninsuffizienz seltener zu beobachten und auch die klinische Verschlechterung der Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) war weniger progredient. Die OVERTURE-Studie (Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events) untersuchte die Wirkung beider Substanzen im Vergleich an 5.770 herzinsuffizienten Patienten im Stadium NYHA II bis IV. Der primäre Endpunkt, das kombinierte Risiko von Tod oder Krankenhauseinweisung aufgrund von Herzinsuffizienz, wurde mit etwa gleicher Häufigkeit erreicht. Allerdings trat bei OMA-behandelten Patienten das bereits bei ACE-Hemmstoffen bekannte Angioödem deutlich häufiger auf (2,17 % OMA versus 0,68 % Enalapril). Trotz der hervorragenden Blutdruck senkenden Wirkung und der Kardioprotektion hat das „Cardiovascular und Renal Drug Advisory Committee“ der FDA im Juli 2002 OMA die Zulassung für die Behandlung von Patienten nicht erteilt. Gleichwohl bleibt OMA die Referenzsubstanz für die Weiterentwicklung von neuen Vasopeptidase-Inhibitoren. Die Kombination eines NEP-Inhibitors und ATII-Blockers (LCZ696 oder Valsartan-Candoxatril) bewirkt eine effektive Blutdrucksenkung ohne das vermehrte Auftreten von Angioödem (Hedge et al. 2011).

1.4. Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn besitzt durch die Existenz der BHS und Blut-Liquor-Schranke (BLS) ein vom übrigen Organismus abgetrenntes und gut kontrolliertes Milieu. Die BHS stellt eine Barriere zwischen dem Blut und dem Gehirnparenchym dar und die BLS grenzt das Blut vom Liquor cerebrospinalis (LC) ab. Die BHS trennt das Blutmilieu in den Lumina der Blutgefäße von dem Milieu des Interzellularraums des Gehirns und schützt das Gehirngewebe vor Substanzen, die mit der neuronalen Aktivität und Neurotransmission interferieren können. Die BHS und BLS sind nicht nur anatomische Barrieren, sondern sie stellen ein dynamisches Gewebe dar, welches eine Reihe von Enzymen, Transportern und Rezeptoren exprimieren (Redzic et al. 2011; Zheng und Monnot 2012).

Der Schrankeneffekt der BHS hat seine morphologische Ursache in den *tight junctions* der Gefäßendothelzellen der Hirnkapillaren. An der Außenseite der Gehirnkapillaren befinden sich drei anatomische Strukturen (Zellschichten): die Basalmembran, die Perizyten, welche ungefähr 30 % der Endotheloberfläche umranden und letztlich die Astrozyten, welche über 90 % der Endothel- und Perizytenoberfläche bedecken (Persidsky et al. 2006; Engelhardt und Sorokin 2009; Zheng und Monnot 2012). Die Permeabilität von Molekülen durch die BHS hängt von deren physikochemischen Eigenschaften vor allem der Fettlöslichkeit und

der Molekulargröße ab. Je lipophiler und kleiner ein Molekül ist, umso leichter kann es die BHS überwinden. Des Weiteren gibt es für einige Moleküle wie z.B. Aminosäuren aktive auswärts oder einwärts gerichtete Transportsysteme. Die BHS ist unter physiologischen Zuständen impermeabel für Plasmaproteine.

Circumventrikuläre Organe

Die CVOs liegen in der Medianebene des Gehirns. Zu den CVOs gehören die Neurohypophyse mit Eminentia mediana, das OVLT, das SFO, das Corpus pineale, das Subkommisuralorgan, die Area postrema sowie die PC der Ventrikel. Ein besonderes Strukturmerkmal dieser Organe sind die spezialisierten Tanycyten. Die Gefäße der CVOs weisen ein fenestriertes (gefenstertes) Endothel auf. Es wird deshalb postuliert, dass in den CVOs keine BHS vorhanden ist, d.h. hier kann ein Austausch von Substanzen in beide Richtungen erfolgen: Neurohormone können an das Blut abgegeben werden und Stoffe, die sonst von der BHS zurückgehalten werden, können aus dem Blut in den perivaskulären Raum eintreten. Daher werden sie auch als neurohämale Region bezeichnet. Die in diesem Bereich gefensterten Kapillaren werden von einem weiten perivaskulären Bindgewebsraum umgeben, in dem auch neuroendokrine Axone endigen. Das OVLT besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Teilen, aus einem ventrikulären (Liquormilieu) und einem hämalen Teil (Blutmilieu). Die beiden Teile des OVLT sind mit fenestrierten Kapillaren ausgestattet und durch „*tight junctions*“ der langgestreckten Tanycyten wird das Liquormilieu des Ventrikels vom Milieu des Interzellularraums abgegrenzt. Ähnlich aufgebaut ist auch das SFO (Krisch et al. 1978 und 1987). Das OVLT und das SFO sind von großer Bedeutung für die Generierung der kardiovaskulären Antworten ausgelöst durch die icv Applikation von Ang I/II.

Blut-Liquor-Schranke

Die BLS in den PC bildet eine effektive Barriere zwischen Blutmilieu und dem Liquormilieu der Liquorräume. Sie besitzt Transportsysteme für bestimmte Makromoleküle. Die PC sind ein Bestandteil des Daches des III. und IV. Ventrikels und der Wand der beiden Seitenventrikel und bestehen aus drei Zellstrukturen: 1) aus der dem Liquor zugekehrten apikalen Epithelzellen (*Lamina epithelialis*), 2) der Lamina epithelialis außen anliegende Bindegewebe der *Pia mater* und 3) der inneren Endothelzellen der Kapillaren, die vielfältige knäuelartige Zotten bilden (Leonhardt 1990). Da die Endothelzellen gefenstert und durchlässig sind, ist eine BHS in diesen Strukturen nicht ausgebildet. Vielmehr sind die „*tight junctions*“ der choroidalen Epithelzellen für die Barrierefunktion der BLS entscheidend (Zheng und Monnot 2012). Die Zusammensetzung vom Plasma und LC ist

sehr ähnlich, mit Ausnahme des Proteingehalts, der im Liquor sehr niedrig ist. Man vermutet, dass der LC in den PC nicht filtriert sondern aktiv sezerniert wird. Die BLS bildet eine effektive Barriere zwischen Blutmilieu und dem Liquormilieu der Liquorräume (Speake et al. 2001).

Ependym der Hirnventrikel

Die Hirnventrikel werden in den größten Bereichen von kinozilienreichen Ependymzellen ausgekleidet. Der Liquor des Interzellularraums kommuniziert über „*gap junctions*“ zwischen den Ependymzellen mit dem Ventrikelliquor. Durch die „*gap junctions*“ ist die Einschränkung der Diffusion von Substanzen zwischen dem Gehirnparenchym und dem Liquor nur gering (Johanson et al. 2011).

Liquor cerebrospinalis und seine Zirkulation

Der LC (insgesamt 120-160 ml bei Menschen) wird hauptsächlich in PC aktiv in die Ventrikel sezerniert, zum Teil tragen auch die Gehirnkapillaren zur Produktion des LC bei (Leonhardt 1990; Speake et al. 2001). Gemäß den klassischen Vorstellungen fließt der LC durch das ventrikuläre System und durch drei Öffnungen im Dach des IV. Ventrikels (Aperturæ laterales und Apertura mediana) in den Subarachnoidalraum. Aus diesem Raum kann der LC mittels der Arachnoidealzotten (Pacchionische Granulationen), welche teils in die Schädelvenen, teils in die Sinus venosi hineinragen, schnell abfließen. Andererseits kann LC auch durch den endoneuralen Raum der Hirnnerven oder über Interzellularspalten der perikapillären Gliafortsätze das ventrikuläre System verlassen (Leonhardt 1990). Es hat sich gezeigt, dass der Fluss des LC durch das Gehirn pulsatil ist und ein ständiger Austausch zwischen Blut, LC und der interstitiellen Flüssigkeit stattfindet. Auch das Konzept des Abflusses des LC ausschließlich über den Subarachnoidalraum hat sich geändert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Drainage vom Großteil des LC über das Lymphsystem des Rückenmarks und den perineuralen subarachnoidalen Raum der Hirnnerven erfolgt. Fast 50 % des LC wird über das extrakranielle Lymphsystem absorbiert. Die Zirkulation des Liquors um die Blutgefäße, die aus dem subarachnoidalen Raum in den perivaskulären Virchow-Robinschen Raum eintreten, stellt ein wichtiges Drainagesystem dar (Murtha et al. 2014; Brinker et al. 2014). Die ständige Sekretion und Resorption von Liquor trägt außerdem zur Steuerung des inneren Milieus im ZNS bei. Insbesondere hydrophile Moleküle, die in den Liquor gelangen, werden von der Gehirnoberfläche rasch forttransportiert und in die Blutzirkulation rückresorbiert. Die dauernde Neubildung und Resorption von Liquor führt zu einem Verdünnungs- und Auswascheffekt, dem sogenannten *sink effect*. Die Kenntnisse über die Sekretion und die Drainage des LC sind

für die korrekte Interpretation unserer Ergebnisse über die zentralen Effekte von OMA unentbehrlich.

1.5. Fragestellung

OMA hat sich in tierexperimentellen Studien hinsichtlich Blutdrucksenkung und organoprotektiver Effekte an Herz, Nieren und Gefäßen als hocheffizient und teilweise im Vergleich zu ACE-Hemmstoffen als überlegen erwiesen. Neben der günstigen Beeinflussung des peripheren RAS und NPS ist bisher noch nicht bekannt, ob OMA auch im Gehirn wirksam werden kann. In der Genese diverser Erkrankungen spielt nicht nur das periphere, hormonelle RAS und NPS sondern auch die eigenständig im Gehirn existierenden, neurohumoralen Systeme eine wichtige Rolle. Von diesem Wissen ausgehend liegt die Vorstellung nahe nach Medikamenten zu suchen, die sowohl peripher als auch zentral in die Regulation eingreifen. In dieser Arbeit wird deshalb die Penetration von OMA durch die BHS nach seiner systemischen Gabe (po oder iv) untersucht. Das Ausmaß der Hemmung von ACE durch OMA wurde mittels der Analyse des Blutdruckanstiegs nach iv und icv Injektion von Ang I untersucht. ACE, lokalisiert an der Zellmembran der Endothelzellen, wandelt das iv-injizierte Ang I sofort zu Ang II um, welches dann über die Aktivierung von AT1-Rezeptoren eine Vasokonstriktion hervorruft. Die sofortige Umwandlung von icv-appliziertem Ang I zu Ang II erfolgt über ACE, das in den CVOs (insbesondere im SFO und OVLT) lokalisiert ist. Die Stimulation der AT1-Rezeptoren direkt in diesen ventrikelnahen Gehirnregionen aktiviert die weitere Signalkaskade. Äquimolare Dosen von Ang I und Ang II, appliziert iv oder icv, lösen die gleichen Blutdruckanstiege aus.

In dieser tierexperimentellen Arbeit an Ratten wurde im ersten Teil OMA icv verabreicht und die kardiovaskuläre Antwort auf Ang I (icv und iv injiziert) untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde OMA po und iv verabreicht und die kardiovaskuläre Antwort auf Ang I (iv und icv verabreicht) untersucht. Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Welchen Einfluss hat icv-appliziertes OMA auf den durch Ang I icv- oder iv-induzierten Blutdruckanstieg?
- 2) Welchen Einfluss hat po-appliziertes OMA auf den durch Ang I iv- oder icv-induzierten Blutdruckanstieg?
- 3) Welchen Einfluss hat iv-appliziertes OMA auf den durch Ang I iv- oder icv-induzierten Blutdruckanstieg?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Es wurden männliche, 300-320 g schwere Wistar- Ratten (Charles- River, Sulzfeld) eingesetzt (insgesamt 255). Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur (24 °C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% in freihängenden Macrolonkäfigen gehalten. Wasser und Futter standen ihnen immer zur Verfügung. Der Tag/ Nacht- Rhythmus wurde durch automatische Beleuchtung des Tierstalls zwischen 6 und 18 Uhr geregelt. Die Experimente wurden von der zuständigen Behörde in Schleswig-Holstein genehmigt.

2.2. Pharmaka und Chemikalien

- OMA (Bristol-Myers-Squibb, Princeton, New Jersey, USA)
- Ang I (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Choralhydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Heparin (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ansatz von Lösungen

Ang I (für iv Injektion) wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Stammlösung (500 nmol/l) wurde bei –20 °C aufbewahrt. Ang I wurde iv als Bolus von 50 pmol in 100 µl/kg KG injiziert. Ang I (für icv Injektion) wurde ebenso in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Icv wurde Ang I in der Dosis 100 pmol/1 µl/ Ratte appliziert. Isotone Kochsalzlösung wurde anstelle von künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit für alle icv Injektionen verwendet, da in früheren Experimenten gezeigt wurde, dass Ang I in beiden Flüssigkeiten eine identische Wirkung hat.

OMA ([4S-[4(R*),7,10a]]-octahydro-4-[(2-mercapto-1-oxo-3-phenylpropyl)amino]-5-oxo-7H-pyrido[2,1-b] [1,3]-thiazepine-7-carboxylic acid) ist kaum wasserlöslich (0,04 mg/ml bei Raumtemperatur). Die Löslichkeit von OMA in wässriger Lösung steigt durch Anheben des pH-Wertes in den alkalischen Bereich. OMA-Stammlösung wurde vor jedem Versuch frisch vorbereitet. Die Stammlösung wurde in Wasser (für po Gabe) oder isotoner Kochsalzlösung (für iv Injektion) hergestellt und mit 2 M NaOH titriert, bis OMA gelöst war. Der pH-Wert lag bei 8-8,2. Diese Stammlösung wurde entsprechend der verschiedenen Dosen (0,5 µmol/kg KG – 100 µmol/kg KG) verdünnt. OMA für die icv Gabe wurde in isotoner Kochsalzlösung

gelöst und ebenso mit NaOH titriert. Der pH-Wert lag bei 8-8,2. In der Dosierung von 30 nmol und 100 nmol wurde OMA in einem Volumen von 3 µl, in der Dosierung von 10 nmol in einem Volumen von 2 µl und in der niedrigsten Dosierung von 3 nmol in einem Volumen von 1 µl injiziert.

Als Vehikellösung für iv und icv Gabe wurde isotone Kochsalzlösung verwendet. Bei oraler Gabe wurde Wasser genutzt. Die Vehikellösungen wurden mit NaOH titriert bis ein pH-Wert von 8,0 erreicht war.

Zur Herstellung einer 4 % Chloralhydratlösung wurden 4 g Chloralhydrat in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

2.3. Geräte und sonstige Materialien

- Stereotaktisches Gerät (Kopf, Tujunga, Kalifornien, USA)
- Microliter- Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)
- Blutdruckmessgerät:
 - elektromechanischer Druckaufnehmer (Smith Industries Medical System Company, PVB Medizintechnik GmbH Kirchseeon, Deutschland)
 - Integrationseinheit (Gold Brush Pressure Computer und Gold Brush 2400 Recorder, Gould INC, Cleveland, USA)
- Polypropylenschlauch (PP) der Stärke 10, 20 und 50 (Portex, Hythe, Kent, UK)
- Zahnzement (Svedia Dental, Enköping, Schweden)

2.4. Herstellung und Implantation von Kathetern

Arterielle und venöse Katheter

Ein arterieller Femoraliskatheter bestand aus einem Stück Polypropylenschlauch der Stärke 10 (PP10-Schlauch) und einem Stück der Stärke 50 (PP50-Schlauch). Die im Durchmesser unterschiedlichen Teilstücke wurden über einen Führungsdraht ineinander geschoben und mit Heißluft verschweißt. An der Schweißstelle bildete sich eine kleine Auftreibung. Das PP10-Teilstück wurde auf 3 cm, das PP50-Teilstück auf etwa 25 cm gekürzt. Als venöser Katheter wurde ein 28 cm langer PP50-Schlauch verwendet, der an einem Ende (3 cm Entfernung) über Heißluft zu einer Auftreibung zusammen geschoben wurde.

Operationstechnik

Die Ratten wurden mit 4% Chloralhydrat (400 mg/kg KG intraperitoneal) narkotisiert und im rechten Leistenbereich und Nackenbereich rasiert. Nach Fixierung in Rückenlage wurde

die rechte Leistenregion mit einem 1,5 cm langen Schnitt parallel zum Leistenband eröffnet. Durch zunächst stumpfe Präparation wurde der Strang aus Nervus femoralis und Vasa femoralis freigelegt. Mittels zweier spitzer Pinzetten wurden die A. femoralis und V. femoralis 2 cm einzeln dargestellt. Die Arterie wurde distal mit einem Baumwollfaden abgebunden, proximal wurde eine Fadenschlinge um das Gefäß gelegt und die Arterie damit aufgespannt. Mit einer Irisschere wurde das Gefäß möglichst nah an der distalen Ligatur angeschnitten und durch eine Spreizpinzette offen gehalten. Der mit einer Heparin-Kochsalzlösung gefüllte Katheter konnte nun mit einer stumpfen Pinzette eingeführt und 3 cm bis zur Auftreibung vorgeschoben werden. Der Katheter wurde anschließend durch Ligaturen der proximalen Gefäßhaltefäden und der distalen Fäden fixiert. Mit einer Heparin-Kochsalzlösung wurde der Katheter gespült und am distalen Ende zugeschweißt. In gleicher Weise erfolgte die Implantation des venösen Femoraliskatheters. Die Nackenhaut wurde durch einen 0,5 cm langen Schnitt geöffnet. Mittels einer Stricknadel wurden beide Katheter unter der Haut durchgezogen und durch den Hautschnitt ausgeleitet. Die beiden Katheter wurden jeweils einzeln auf Höhe des Nackenschnitts mit einem 1 cm breiten Klebeband umwickelt. Auf dieses Klebeband wurden zwei Baumwollfäden geknotet, mit welchen der Nackenschnitt zugenäht wurde und die Katheter gleichzeitig fixiert wurden. Die freien Katheterenden wurden noch einmal auf eine Länge von 3,5 bis 4 cm außerhalb der Ratte gekürzt. Die Wunde im Leistenbereich wurde mit einer fortlaufenden Intrakutannaht geschlossen.

Intracerebroventrikulärer Katheter

Ein etwa 4 cm langer PP20-Schlauch mit Führungsdraht wurde über Heißluft gehalten und so zusammen geschoben, dass in der Mitte eine kleine Auftreibung entstand. Ein Ende wurde auf genau 5 mm, das andere auf 1 cm gekürzt.

Operationstechnik

Die mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG intraperitoneal) narkotisierten Ratten wurden auf dem Kopf rasiert. Die Tiere wurden durch Ohrstifte rechts und links im Stereotaxiegerät fixiert. Mit einer Hautschere wurde ein runder Hautlappen von ca. 1 cm Durchmesser vom Schädeldach entfernt. Die Wunde wurde mit einem in 10 %ige Wasserstoffperoxidlösung getauchten Wattestäbchen solange vorsichtig betupft und gesäubert bis die Schädelnähte deutlich hervortraten. Die Koordinaten (Paxinos und Watson 1982) für die Implantation der icv Kanüle in den linken lateralen Hirnventrikel wurden mit Hilfe des Stereotaxiegeräts wie folgt eingestellt: vom Bregma ausgehend (anterior-posterior) 0,6 mm, von der Sutura media ausgehend (latero-medial) 1,3 mm, von der Schädeloberfläche ausgehend (dorso-ventral,

Tiefe) 5 mm. Mit einem Bohrer (0,8 mm) wurde der Schädelknochen an der sich daraus ergebenden Stelle eröffnet und mit einem zweiten Bohrer (1,2 mm) erweitert, so dass der icv Katheter durch das Loch vorgeschoben werden konnte. Die Kanüle wurde danach mit Zahnzement fixiert.

2.5. Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz

Die Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter erfolgte am wachen Tier. Die Injektionen begannen 1 Stunde nach Adaptation an die andere Umgebung und nach Stabilisierung von Blutdruck und Herzfrequenz. Die Messapparatur bestand aus einem elektromechanischen Druckaufnehmer und einer Integrationseinheit, welche die HF synchron aus dem gemessenen Pulsdruck errechnete. Der arterielle Katheter wurde mittels eines 50 cm langen PP50-Schlauches an einen elektromechanischen Druckaufnehmer angeschlossen. Mittels einer speziellen Software wurden die Messungen auf einen Personal Computer aufgezeichnet und später ausgewertet. Es wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP in mmHg) und die Herzfrequenz (HR in bpm) dokumentiert.

2.6. Applikation der Substanzen

Für die icv Injektion der Substanzen wurde ein Injektionssystem bestehend aus einer 25 µl Hamilton-Spritze, einer 27-gauge Kanüle und einem PP20-Verbindungsschlauch hergestellt. Dieses Injektionssystem wurde mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung aufgefüllt. Im Anschluss wurde 0,5 µl Luft, dann die zu injizierende Substanz (Ang I in 1 µl Volumen, OMA entsprechend der Dosis in 1, 2 oder 3 µl Volumen, siehe oben) und zuletzt wiederum 0,5 µl Luft aufgezogen. Das Injektionssystem wurde mit der icv-platzierten Kanüle der Versuchsratte verbunden. Nach erfolgter Injektion der Substanz wurde mit 3 µl isotoner Kochsalzlösung gespült.

Die iv Injektion der Substanzen (OMA und VEH) erfolgte mit einer 1 ml Spritze über einen PP50-Verbindungsschlauch. Nach Injektion der Substanz wurde mit isotoner NaCl gespült. Die orale Applikation von Substanzen erfolgte mit Hilfe von Schlundsonden direkt in den Magen (Gavage).

2.7. Statistische Analyse

Alle Werte werden angegeben als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler der Mittelwerte). Um die Effekte von OMA (icv, po oder iv verabreicht) in den verschiedenen Dosierungen auf

den Blutdruckanstieg (Δ MAP) (nach Gabe von Ang I iv und icv) über die Zeit zu vergleichen, wurden die Messwerte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen analysiert. Die Area under curve (AUC)-Daten wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test für paarweise Vergleiche, analysiert. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ als signifikant akzeptiert.

3. Versuchsprotokolle und Ergebnisse

Allgemeines Versuchsprotokoll

Für die Dauer der Experimente waren die Ratten in Einzelkäfigen untergebracht, in denen sie sich frei bewegen konnten. Während der Messungen hatten sie keinen Zugang zu Wasser und Futter. Am 1. Tag wurden den Versuchstieren die icv Kanülen, am 3. Tag die arteriellen und venösen Katheter implantiert. Mittels des Trinktests am 5. Tag konnte die korrekte Lage der icv Kanüle funktionell überprüft werden: 100 pmol Ang I wurde icv verabreicht und das Trinkverhalten der Ratte beobachtet. Bei korrekt platzierter icv-Kanüle begannen die Ratten kurz nach Applikation 8-10 ml Wasser zu trinken. Nur die Tiere, die mehr als 8 ml Wasser getrunken haben, wurden in den weiteren Versuch eingeschlossen. Die Ermittlung von Kontrollwerten erfolgte später am 5. Versuchstag. Hierzu wurde Ang I ohne Vorbehandlung iv und icv appliziert und die Blutdruckreaktionen aufgezeichnet (dargestellt bei Zeitpunkt K in den nachfolgenden Abbildungen).

Am Tag danach erhielt eine Ratte entweder Vehikel oder OMA (icv, po, iv) in verschiedenen Dosierungen. Diese Applikation erfolgte bei icv und iv Gabe unter Blutdruck- und Herzfrequenzkontrolle. Nach dieser Vorbehandlung wurde in Zeitabständen von 0,5; 1; 2; 4; 8 und 24 Stunden jeweils Ang I iv in einer Dosierung von 50 pmol/kg KG oder icv in einer Dosierung von 100 pmol injiziert, auch unter Aufzeichnung von Blutdruck und Herzfrequenz. Es ist nachgewiesen, dass die kardiovaskuläre Antwort auf eine zweite icv Injektion deutlich abgeschwächt ist, wenn der Zeitabstand zwischen 2 aufeinanderfolgenden icv Injektionen von Ang I weniger als 0,5 Stunden beträgt. In einem separaten Versuch wurde daher die icv Gabe von Ang I 0,5 Stunden nach iv Gabe von Vehikel oder OMA untersucht.

Ermittlung der Kontrollwerte

Der MAP lag bei den Ratten zwischen 90 bis 103 mmHg, die HR zwischen 270 bis 350 bpm.

Iv-appliziertes Ang I (50 pmol/kg KG) steigerte nach seiner Umwandlung zu Ang II den mittleren arteriellen Blutdruck (Δ MAP) um 30 bis 35 mmHg. Der Blutdruckanstieg erfolgte wenige Sekunden nach der Applikation und erreichte schnell seinen höchsten Wert. Nach ca. 2 bis 3 Minuten war der Ausgangsblutdruckwert wieder erreicht (Originalregistrierung 1 im Anhang). Deshalb sind die Ergebnisse als Δ MAP dargestellt. Nach iv Gabe von Ang I konnte bei den meisten Tieren ein leichter, kurzanhaltender Abfall der HR beobachtet werden, bei anderen Tieren waren Schwankungen der HR klein und variabel.

Nach enzymatischer Umwandlung zu Ang II steigerte icv-appliziertes Ang I den mittleren

arteriellen Blutdruck (Δ MAP) um 20 bis 25 mmHg. Der Blutdruckanstieg erfolgte ebenfalls wenige Sekunden nach Applikation und erreichte innerhalb von 1-2 Minuten seinen höchsten Wert, danach bildete er sich nur langsam zurück. Der Ausgangsblutdruckwert war bei fast allen Tieren nach 20 Minuten wieder erreicht (Originalregistrierung 2 im Anhang). Daher sind die Blutdruckveränderungen durch icv-Ang I in den nachfolgenden Abbildungen als Δ MAP und als Area under curve (AUC) angegeben. Die AUC, also die Fläche unterhalb der Blutdruckkurve nach icv-Ang I-Injektion, repräsentiert die Summe aller MAP-Veränderungen, integriert in einem Zeitintervall. Die Bestimmung der AUC erfolgte wie beschrieben in einer Arbeit von Culman et al. (1997). Nach icv Gabe von Ang I konnte bei manchen Tieren ein leichter, nicht signifikanter Abfall oder Anstieg der HR beobachtet werden.

3.1. Einfluss von intracerebroventrikulär appliziertem Omapatrilat auf den Ang I (intracerebroventrikulär oder intravenös) -induzierten Blutdruckanstieg

Versuchsprotokoll I

Tag 1: Implantation der icv Kanüle

Tag 3: Implantation des arteriellen und venösen Femoralkatheters

Tag 5: Trinkversuch und Ermittlung der Kontrollwerte

Tag 6: Versuchsdurchführung:

OMA in Dosierungen von 3; 10; 30 und 100 nmol oder Vehikel wurde den Ratten (n = 6-8 pro Gruppe) icv verabreicht. Diese Injektion erfolgte langsam in einem Zeitraum von 1 bis 1,5 Minuten. Nach dieser Vorbehandlung wurde in Zeitabständen von 0,25; 1; 4 und 24 Stunden jeweils Ang I iv oder icv injiziert.

Einfluss von icv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruck und die Herzfrequenz

Bei icv Applikation von OMA in der höchsten Dosierung von 100 nmol kam es zu signifikanten Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegen. Darüber hinaus waren die Tiere kurz nach Applikation unruhig, drehten sich um die Achse (*barrel rotation*), liefen im Kreis, bei einigen Tieren konnten Krampfanfälle beobachtet werden. Die Versuche in dieser Dosierung wurden daher nicht fortgeführt. Alle niedrigeren Dosierungen von OMA wurden von den Tieren gut toleriert, unmittelbar nach icv Applikation konnten keine signifikanten Veränderungen des MAP und HR registriert werden (Tabelle 1). Der MAP und die HR blieben bei allen Gruppen über den Zeitraum von 24 h unverändert.

Tabelle 1:

Basalwerte des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP in mmHg) und der Herzfrequenz (HR in bpm) und maximale Anstiege von Blutdruck (Δ MAP in mmHg) und Herzfrequenz (Δ HR in bpm) nach intracerebroventrikulärer (icv) Injektion von Vehikel oder verschiedenen Dosierungen von Omapatrilat (OMA).

ICV Injektion	Vehikel	OMA	OMA	OMA	OMA
Dosis		3 nmol	10 nmol	30 nmol	100 nmol
(n)	7	6	6	6	8
Basaler MAP	100 ± 3	104 ± 4	94 ± 3	100 ± 6	96 ± 3
Δ MAP	2 ± 1	1 ± 2	4 ± 1	7 ± 2	27 ± 2***
Basale HR	287 ± 15	332 ± 13	299 ± 8	308 ± 17	268 ± 16
Δ HR	10 ± 3	8 ± 12	15 ± 9	8 ± 14	77 ± 26*

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm S.E.M. Icv Injektion von 100 nmol OMA verursachte einen unmittelbaren Anstieg von MAP und HR. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe und zu allen Gruppen, denen eine niedrigere Dosis von OMA injiziert wurde, berechnet mittels einfaktorieller ANOVA, gefolgt von post-hoc Bonferroni-Test.

Einfluss von icv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch icv Ang I

Eine Vorbehandlung mit icv-appliziertem OMA reduzierte den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg. In allen Dosierungen konnte 15 Minuten nach Behandlung eine Hemmung registriert werden. Eine Stunde nach Gabe von OMA konnte nur bei den Dosierungen 10 und 30 nmol eine signifikante Hemmung beobachtet werden, aber nicht mehr zu späteren Zeitpunkten. Nach 4 und 24 Stunden war keine signifikante Inhibition mehr zu erkennen (Abbildung 1 A und B).

Einfluss von icv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch iv Ang I

Icv-injiziertes OMA hemmt bereits 15 Minuten nach seiner Injektion dosisabhängig den Ang I-iv induzierten Blutdruckanstieg. In den höheren Dosierungen 10 und 30 nmol reduzierte icv-appliziertes OMA den Ang I-iv induzierten Blutdruckanstieg noch nach 4 Stunden signifikant, nicht aber nach 24 Stunden (Abbildung 1 C).

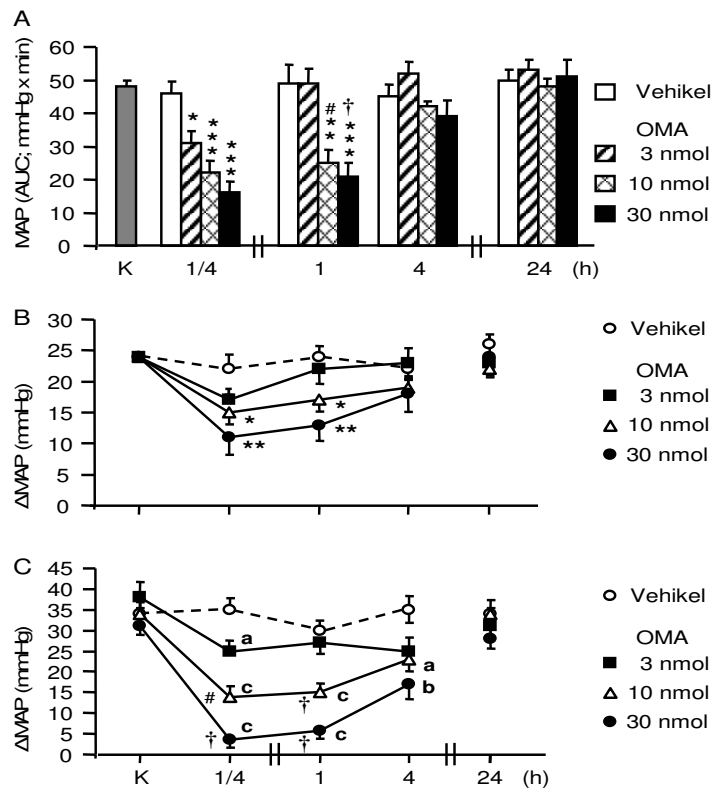


Abbildung 1:

Einfluss von intracerebroventrikulär (icv)-appliziertem Omapatrilat (OMA) auf den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg nach icv (A und B) oder iv Injektion (C). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Bei Zeitpunkt K wurde der Ang I-induzierte Blutdruckanstieg vor Gabe von OMA oder Vehikel dargestellt.

A und B: Eine Gruppe wurde mit Vehikel (icv) behandelt, die anderen Gruppen mit verschiedenen Dosen von OMA (icv). Ang I wurde dann zu gegebenen Zeitpunkten (nach 15 min; 1; 4 und 24 Stunden) icv appliziert. Dargestellt wird der Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes als (A) Fläche unterhalb der Blutdruckkurve (AUC in mmHg x min.) oder als (B) maximaler Blutdruckanstieg (Δ MAP in mmHg). A: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$, statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe zu den angegebenen Zeitpunkten; # $P < 0,05$ und † $P < 0,001$ statistische Vergleiche zur Gruppe der Tiere, behandelt mit 3 nmol OMA icv, mittels einfaktorieller ANOVA gefolgt von post-hoc Bonferroni-Test. B: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe mittels zweifaktorieller ANOVA.

C: Eine Gruppe wurde mit Vehikel (icv) behandelt, die anderen Gruppen mit verschiedenen Dosen von OMA (icv). Ang I wurde dann zu gegebenen Zeitpunkten (nach 15 min; 1; 4 und 24 Stunden) iv appliziert. Dargestellt ist der maximale Blutdruckanstieg (Δ MAP in mmHg). ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$ und ^c $P < 0,001$, statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe; # $P < 0,05$ und † $P < 0,001$ statistische Vergleiche zur Gruppe der Tiere, behandelt mit 3 nmol OMA icv, mittels zweifaktorieller ANOVA.

3.2. Einfluss von oral appliziertem Omapatrilat auf den Ang I (intravenös oder intracerebroventrikulär) -induzierten Blutdruckanstieg

Versuchsprotokoll II

Tag 1: Implantation der icv Kanüle

Tag 3: Implantation des arteriellen und venösen Femoralkatheters

Tag 5: Trinkversuch und Ermittlung der Kontrollwerte

Tag 6: Versuchsdurchführung:

Bei der oralen Applikation von OMA (n = 7-8) wurden den Ratten Dosen von 5; 25 und 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ oder Vehikel (n = 7) mit Hilfe von Schlundsonden direkt in den Magen appliziert (Gavage). Nach oraler Gabe wird OMA rasch resorbiert und kann nach wenigen Minuten systemisch wirksam werden (Iyer et al. 2003). Die Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter erfolgte erst 1 Stunde nach der Gavage, weil die Tiere unmittelbar nach der Gavage gestresst waren. Nach dieser Vorbehandlung wurde in Zeitabständen von 1; 2; 4; 8 und 24 Stunden jeweils Ang I iv oder icv injiziert.

Einfluss von oral appliziertem Omapatrilat auf den MAP und HR

Eine leichte, nicht signifikante Reduktion des MAP konnte über den gesamten Messzeitraum bei den beiden höheren Dosierungen beobachtet werden. In der niedrigeren Dosierung konnten keine Veränderungen des MAP beobachtet werden. Die HR blieb nach po Behandlung mit OMA unverändert.

Einfluss von oral appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch iv Ang I

Eine Behandlung mit po-appliziertem OMA (5, 25 und 100 $\mu\text{mol/kg KG}$) reduzierte den Ang I-iv induzierten Blutdruckanstieg dosisabhängig. Eine vollständige Hemmung des Ang I-iv induzierten Blutdruckanstiegs konnte in allen Dosierungen von OMA bis 4 Stunden nach po Behandlung beobachtet werden. Mit allen Dosierungen konnte auch noch nach 24 Stunden eine signifikante Hemmung des Ang I-iv induzierten Blutdruckanstiegs erreicht werden. In der niedrigsten Dosierung von 5 $\mu\text{mol/kg KG}$ war die Hemmung weniger ausgeprägt als bei den hohen Dosierungen (Abbildung 2 A).

Einfluss von oral appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch icv Ang I

Eine Behandlung mit po-appliziertem OMA in den verschiedenen Dosierungen (5, 25 und 100 $\mu\text{mol/kg KG}$) zeigte keinen Effekt auf den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg. Selbst unter einer Dosierung von OMA von 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ konnte keine signifikante Hemmung des Ang I-icv induzierten Blutdruckanstiegs erzielt werden (Abbildung 2 B und C).

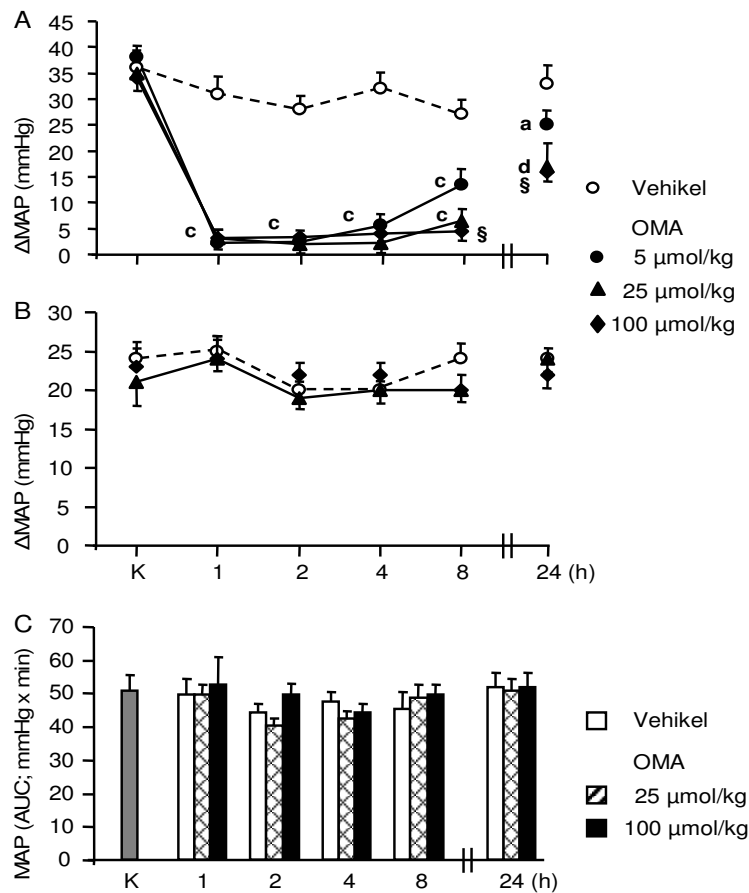


Abbildung 2:

Einfluss einer oralen Behandlung (po) mit Omapatrilat (OMA) in verschiedenen Dosierungen auf den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg nach intravenöser (iv) (A) oder intracerebroventrikulärer (icv) Injektion (B und C). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Dargestellt wird der maximale Blutdruckanstieg (Δ MAP in mmHg) (A und B) oder der Blutdruckanstieg als Fläche unterhalb der Blutdruckkurve (AUC in mmHg x min.) (C). Bei Zeitpunkt K wurde der Ang I-induzierte Blutdruckanstieg vor Gabe von OMA oder Vehikel dargestellt.

A: Eine Gruppe der Tiere wurde mit Vehikel (po) behandelt, die anderen Gruppen mit verschiedenen Dosen von OMA (po). Ang I wurde dann zu gegebenen Zeitpunkten (nach 1; 2; 4; 8 und 24 Stunden) iv appliziert. ^c P < 0,001, signifikante Reduktion des Ang I induzierten Blutdruckanstiegs in allen drei Dosierungen von OMA nach 1; 2; 4 und 8 Stunden. ^a P < 0,05 und ^d P < 0,001, statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe 24 Stunden nach Behandlung mit OMA; [§] P < 0,05 statistische Vergleiche zur Gruppe der Tiere, die zu dem gegebenen Zeitpunkt mit OMA in einer Dosierung von 5 μ mol/kg KG behandelt wurden (zweifaktorieller ANOVA).

B und C: Oral-appliziertes OMA hatte in keiner Dosierung Einfluss auf den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg.

3.3. Einfluss von intravenös appliziertem Omapatrilat auf den Ang I (intravenös oder intracerebroventrikulär) -induzierten Blutdruckanstieg

Versuchsprotokoll III

Tag 1: Implantation der icv Kanüle

Tag 3: Implantation des arteriellen und venösen Femoralkatheters

Tag 5: Trinkversuch und Ermittlung der Kontrollwerte

Tag 6: Versuchsdurchführung:

Am Versuchstag wurde eine Gruppe von Ratten mit Vehikel (n=7), andere Gruppen von Ratten mit OMA (n=6-8) in verschiedenen Dosierungen (0,5; 1; 5; 25 und 100 $\mu\text{mol/kg KG}$) iv behandelt. Nach dieser Vorbehandlung wurde in Zeitabständen von 0,5; 1; 2; 4; 8 und 24 Stunden jeweils Ang I iv oder icv injiziert. In der höchsten Dosierung von OMA 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ wurden die Messungen nur nach 8 und 24 Stunden durchgeführt.

Einfluss von iv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruck und die Herzfrequenz

Die iv Gabe von OMA in den verschiedenen Dosierungen hatte keine unmittelbaren Auswirkungen auf den basalen Blutdruck. Ein kurzandauernder Anstieg der HR wurde bei der iv Gabe beobachtet (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Basalwerte des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP in mmHg) und der Herzfrequenz (HR in bpm) und maximale Anstiege von Blutdruck (Δ MAP in mmHg) und Herzfrequenz (Δ HR in bpm) nach intravenöser (iv) Injektion von Vehikel oder verschiedenen Dosierungen von Omapatrilat (OMA).

	VEH	OMA 0,5 μ mol/kg	OMA 1 mol/kg	OMA 5 μ mol/kg	OMA 25 μ mol/kg	OMA 100 μ mol/kg
MAP (mmHg)	92,1 \pm 2,5	98,3 \pm 1,8	93,3 \pm 4,4	96,4 \pm 3,2	92,9 \pm 2,5	91,8 \pm 2,2
HR (bpm)	293 \pm 7,0	284 \pm 15,4	296 \pm 14,5	289 \pm 14,9	325 \pm 13,7	309 \pm 14,5
Δ MAP (mmHg)	+2,8 \pm 2,3	+4,4 \pm 1,1	+4,7 \pm 1,8	+3,8 \pm 2,8	+4,1 \pm 1,4	7,4 \pm 0,4
Δ HR (bpm)	+64 \pm 22,3	+70 \pm 16,9	+70 \pm 15,3	+52 \pm 10,1	+43 \pm 9,2	25 \pm 6,4

Dargestellt sind die basalen mittleren arteriellen Blutdruckwerte (MAP) und Herzfrequenzen (HR) vor iv Gabe von Omapatrilat (OMA) oder Vehikel (VEH), sowie die Veränderung des MAP (Δ MAP) und der HR (Δ HR) unmittelbar nach iv Gabe von Omapatrilat oder Vehikel. Die Werte stellen den höchsten Anstieg von MAP und HR innerhalb von 2 Minuten nach der Vehikel- oder Omapatrilatinjektion dar.

Um die Effekte von OMA auf Blutdruck und Herzfrequenz zu ermitteln, wurde nach iv Gabe von OMA (100 μ mol/kg KG) der MAP, systolischer und diastolischer Blutdruck sowie die HR für 120 min aufgezeichnet (Tabelle 3 und Originalregistrierung 3 im Anhang). In dieser Dosierung hatte OMA keinen Einfluss auf den Blutdruck und Herzfrequenz in Ruhe über 120 Minuten.

Tabelle 3:

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), systolischer- (SBP) und diastolischer (DBP) Blutdruck und Herzfrequenz (HR) im zeitlichen Verlauf nach intravenöser Applikation von Vehikel (Veh)(n = 7) oder Omapatrilat (OMA) (100 µg/kg KG) (n = 8).

Zeit (min)		0	5	30	60	90	120
nach iv Injektion		basal					
MAP (mmHg)	Vehikel	91 ± 4	90 ± 3	87 ± 3	88 ± 3	88 ± 3	88 ± 4
	OMA	91 ± 2	93 ± 3	92 ± 4	86 ± 3	91 ± 3	90 ± 4
SBP (mmHg)	Vehikel	121 ± 5	124 ± 4	116 ± 3	120 ± 5	122 ± 2	120 ± 6
	OMA	115 ± 2	121 ± 3	115 ± 4	116 ± 3	116 ± 2	119 ± 3
DBP mmHg	Vehikel	81 ± 4	84 ± 4	80 ± 4	81 ± 3	79 ± 2	79 ± 4
	OMA	79 ± 2	85 ± 3	80 ± 4	77 ± 3	78 ± 3	82 ± 4
HR bpm	Vehikel	313 ± 14	339 ± 12	330 ± 18	332 ± 20	320 ± 13	315 ± 16
	OMA	310 ± 14	334 ± 15	346 ± 11	342 ± 11	345 ± 13	329 ± 10

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± S.E.M. Es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den gemessenen Parametern (MAP, SBP, DBP and HR) zwischen der Vehikel- und Omapatrilatgruppe (zweifaktorielle ANOVA)

Einfluss von iv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch iv Ang I

Nach iv Vorbehandlung mit OMA wurde Ang I iv injiziert. Iv-appliziertes OMA reduzierte den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg dosisabhängig. Mit allen Dosierungen konnte bis zu 2 Stunden eine komplette Hemmung erreicht werden und auch nach 4 und 8 Stunden war der Ang I-induzierte Blutdruckanstieg signifikant reduziert. OMA in den Dosierungen 25 und 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ zeigte auch noch nach 24 Stunden eine signifikante Verminderung des Ang I-induzierten Blutdruckanstiegs. 24 Stunden nach der einmaligen Behandlung mit Dosierungen von 0,5; 1 und 5; $\mu\text{mol/kg KG}$ OMA war keine Hemmung des Blutdruckanstiegs nach Ang I zu beobachten. In der Dosierung von OMA 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ wurde die Ang I-induzierte Blutdruckantwort nur nach 8 und 24 Stunden untersucht, da bereits in der Dosierung von 25 $\mu\text{mol/kg}$ in den ersten 8 Stunden eine komplette Hemmung gezeigt werden konnte (Abbildung 3 A).

Einfluss von iv-appliziertem Omapatrilat auf den Blutdruckanstieg induziert durch icv Ang I

Eine Behandlung mit iv-appliziertem OMA in den verschiedenen Dosierungen zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Effekt auf den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg. Es wurden nur die Effekte der höchsten Dosen von OMA dargestellt, die eine langzeitige komplette Hemmung der Effekte von iv-injiziertem Ang I bewirkten. Selbst unter einer Dosierung von 100 $\mu\text{mol/kg KG}$ OMA konnte keine signifikante Hemmung des Ang I-icv induzierten Blutdruckanstiegs erzielt werden (Abbildung 3 B und C).

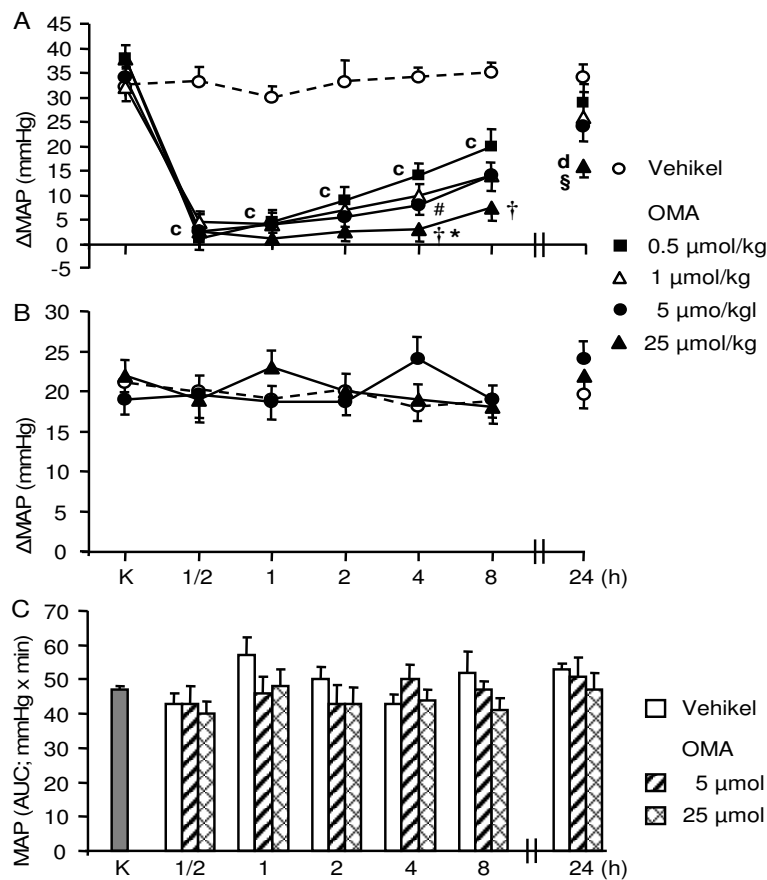


Abbildung 3:

Einfluss von intravenös (iv)-appliziertem Omapatrilat (OMA) auf den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg nach iv (A) oder intracerebroventrikulärer (icv) Injektion (B und C). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Dargestellt wird der maximale Blutdruckanstieg (Δ MAP in mmHg) (A und B) oder der Blutdruckanstieg als Fläche unterhalb der Blutdruckkurve (AUC in mmHg x min.) (C). Bei Zeitpunkt K wurde der Ang I-induzierte Blutdruckanstieg vor Gabe von OMA oder Vehikel dargestellt

A: Eine Gruppe wurde mit Vehikel (iv) behandelt, die anderen Gruppen mit verschiedenen Dosen von OMA (iv). Ang I wurde dann zu gegebenen Zeitpunkten (nach 1/2; 1; 2; 4; 8 und 24 Stunden) iv appliziert. ^c P < 0,001, signifikante Reduktion des Ang I-iv induzierten Blutdruckanstiegs in allen vier Dosierungen von OMA nach 1/2; 1; 2; 4 und 8 Stunden; [#] P < 0,05 und [†] P < 0,001 statistische Vergleiche zur OMA-Gruppe mit einer Dosierung von 0,5 μmol/kg KG; [‡] P < 0,05 statistische Vergleiche zur OMA-Gruppe mit einer Dosierung von 5 μmol/kg KG; ^d P < 0,001 statistische Vergleiche zur Vehikelgruppe nach 24 Stunden; [§] P < 0,05 statistische Vergleiche zur OMA-Gruppe mit einer Dosierung von 5 μmol/kg KG 24 Stunden nach Behandlung (zweifaktorielle ANOVA).

B und C: Iv-appliziertes OMA hatte in keiner Dosierung Einfluss auf den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg.

4. Diskussion

Zum Verständnis der Penetrationsfähigkeiten von Medikamenten durch die BHS und deren funktionelle Wirksamkeit im Gehirn haben sich Studien an Nagern, wie der Ratte, sehr verdient gemacht. Die Hauptvorteile liegen in der großen Ähnlichkeit der Anatomie und Physiologie der BHS mit Menschen. Es gibt mehrere Modelle an Nagern, die sich bei der Erforschung der Penetrationseigenschaften von ACE-Hemmstoffen bewährt haben, zugrunde liegende Mechanismen sind die Ang I-induzierte Blutdruck- und Trinkantwort, sowie die Messung der ACE-Aktivität im Gehirn. In dieser Arbeit wurde ein Modell angewandt, bei dem die Wirkung von OMA auf den Blutdruckanstieg, ausgelöst durch die iv und icv Applikation von Ang I, untersucht wurde. Ang I selbst hat keine vasokonstriktorisches Effekte. Nach iv Applikation von Ang I wird es sofort zu Ang II umgewandelt und induziert einen Anstieg des Blutdruckes. Die Anstiege des Blutdruckes durch äquimolare Dosen von Ang I und Ang II sind identisch, weil das an Endothelzellen vorhandene ACE Ang I sofort in Ang II umwandelt.

In dieser Arbeit wurde zum einen untersucht, ob OMA nach icv Applikation in der Lage ist, ACE in den CVOs und periventriculären Strukturen zu hemmen, zum anderen wurde untersucht, ob OMA nach systemischer Gabe in der Lage ist die BHS zu penetrieren. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind: OMA gelangt nach icv Gabe rasch in den systemischen Kreislauf und hemmt den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg peripher effektiver als zentral; und peripher verabreichtes OMA gelangt weder in die Hirnventrikel noch in das Hirngewebe. Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Arbeit am akuten Rattenmodell sind nicht übertragbar auf die klinische Realität, sondern dienen lediglich der Grundlagenforschung. Das Ziel dieser Arbeit war es nicht klinisch relevante Bedingungen herzustellen. Die Behandlung von Ratten po und iv mit OMA und die nachfolgenden Aufzeichnungen von Blutdruckanstiegen durch Ang I diente lediglich dazu, eine Dosis zu finden, die die peripheren Wirkungen effektiv zu hemmen vermag. Die Dosen, die eine effektive Blockade des Ang I-induzierten Blutdruckanstieges bewirkten, wurden dann verwendet, um zu testen ob iv oder po appliziertes OMA die BHS passiert.

Eine icv Vorbehandlung mit OMA führt zu einer dosisabhängigen Hemmung der Blutdruckantwort auf zentral (icv) appliziertes Ang I. Wird Ang I in die Hirnventrikel injiziert, wirkt es nach Konversion zu Ang II durch membranständiges ACE, hauptsächlich in den CVOs, blutdrucksteigernd. In den CVOs konnten hohe Aktivitäten von ACE nachgewiesen werden (Saavedra und Chevillard 1982). Die kardiovaskuläre Reaktion wird durch Freisetzung von AVP aus der Neurohypophyse und Hemmung des Barorezeptorreflexes vermittelt (Haack und Möhring 1978; Hogarty et al. 1992). Die Signale, die zu einer

Aktivierung von PVN- und SON-Neuronen führen, werden durch die Stimulation von AT1-Rezeptoren in den CVOs, im SFO, OVLT sowie neuronalen Strukturen in der Lamina terminalis, einem Streifen von periventrikulärem Gewebe, das an die Vorderwand des 3. Ventrikels angrenzt (AV3V), ausgelöst (Chai et al. 1987, Mendelsohn et al. 1984). Ein Netzwerk aus Fasern, die Ang II auch als Neurotransmitter enthalten, verbindet die Neuronen der CVOs direkt oder indirekt über eine synaptische Verschaltung im MnPO mit Neuronen im PVN und SON (Honda et al. 1990; Oldfield et al. 1991, Ferguson et al. 2009). Der PVN des Hypothalamus mit seinen zahlreichen Projektionen zur Neurohypophyse (Freisetzung von AVP), Medulla oblongata und Rückenmark (Aktivierung des Sympathikus) spielt eine wichtige Rolle bei der zentralen Blutdruckantwort (Urzedo-Rodrigues et al. 2011). Zu den frühen Zeitpunkten nach icv Injektion von OMA erfolgt die Verminderung des Blutdruckanstiegs am wahrscheinlichsten durch eine direkte Hemmung von ACE in den CVOs, daraus resultierend einer verminderten Umwandlung von Ang I zu Ang II und über mehrer Schritte zu einer verminderten Freisetzung von AVP. Die Aktivierung vom RAS im Gehirn nach einer icv Gabe von Ang I erhöht den Sympathikotonus nicht. Dies wurde eindeutig von Unger und Mitarbeitern (Unger et al. 1985) bewiesen. Die akuten, maximalen Blutdruckanstiege nach icv Gabe von Ang I und II sind mit einer Senkung der Herzfrequenz und dem Herzminutenvolumen, sowie mit einer Reduktion der Aktivität des N. splanchnicus und N. suprarenalis und einem Abfall des Plasmaspiegels von Noradrenalin und Adrenalin verbunden. In den späteren Phasen konnte bei einigen Tieren ein Sympathikusanstieg beobachtet werden (Unger et al. 1985). Unsere Daten stimmen mit diesen Ergebnissen überein. Auch wir haben nach icv Gabe von Ang I einen starken Blutdruckanstieg beobachtet, der mit variablen Veränderungen der Herzfrequenz (in den meisten Tieren mit einer nicht signifikanten Abnahme der Herzfrequenz) einherging.

Der Austritt von Substanzen aus dem LC in das umgebende Hirngewebe ist im Bereich der über „gap junctions“ verfügenden Ependymzellen möglich (Johanson et al. 2011; Zheng und Monot 2012). An dieser Stelle wird die Diffusion von Substanzen durch fehlende strukturelle Barrieren nur sehr wenig eingeschränkt. Vorausgesetzt OMA würde nach icv Injektion effektiv aus dem Ventrikelsystem in das anliegende Hirngewebe diffundieren, dann würde es ACE vor allem in ventrikelnahen Strukturen wie dem PVN und MnPO hemmen. Die kurz andauernde und unvollständige Verminderung der kardiovaskulären Antwort auf icv-Ang I deutet darauf hin, dass die Hemmung des ACE in den CVOs durch OMA nicht sehr effektiv und nur kurz andauernd war. Darüber hinaus lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass OMA aus den Ventrikeln nicht in das Gehirnparenchym diffundiert.

Wie schon erwähnt, erfolgt die Übermittlung der Signale, die nach der Stimulation von AT1-Rezeptoren im SFO und OVLT zur Aktivierung der vasopressinergen Neurone im PVN und

SON führen, über neuronale Bahnen. Diese Bahnen, die direkt oder indirekt, über eine Umschaltung im MnPo, von den oben genannten CVOs den PVN und SON innervieren, bestehen zum größten Teil aus angiotensinergen Neuronen (Honda et al. 1990; Oldfield et al. 1991). Die Aktivierung eines Neurons führt zur Freisetzung des entsprechenden Neurotransmitters aus den Nervenendigungen und gleichzeitig zur Erhöhung seiner Synthese. In den ersten Phasen nach icv Behandlung mit OMA wird die Übertragung der Signale durch schon vorhandenes und gespeichertes Ang II aus den Nervenendigungen erfolgen. In späteren Phasen nach icv Applikation von OMA würde eine effektive Hemmung des ACE in ventrikelnahen Gebieten (wie MnPO und PVN) jedoch die Synthese von Ang II in den Nervenendigungen einschränken oder verhindern und dadurch die Ang II-vermittelte Neurotransmission vermindern. Folglich würde erst zu späteren Zeitpunkten nach icv Behandlung mit OMA eine Verminderung des Blutdruckanstiegs zu beobachten sein. In dieser Arbeit konnte zu späteren Zeitpunkten (4 und 24 Stunden nach icv Injektion von OMA) keine Hemmung des icv-Ang I induzierten Blutdruckanstiegs beobachtet werden. Daher nehmen wir an, dass OMA nach einmaliger icv Injektion rasch aus den Hirnventrikeln in die periphere Blutzirkulation ausgewaschen wird (Murtha et al. 2014). Die in dieser Studie nachgewiesene Hemmung des durch icv-Ang I induzierten Blutdruckanstiegs 15 min und 1 Stunde nach icv Applikation von OMA ist vereinbar mit dieser Annahme. Hervorzuheben ist, dass icv-appliziertes OMA die Blutdruckantwort peripher effektiver und länger hemmt als zentral.

Die Hemmung der Blutdruckantwort auf iv-Ang I ist auf eine Auswaschung von OMA von den Gehirnventrikeln in die periphere Blutzirkulation zurückzuführen. Ähnliche Befunde finden sich in früheren Arbeiten mit ACE-Hemmstoffen (Takata & Hutchinson 1983). Die Hemmung der Blutdruckantworten auf iv-Ang I deutet auf eine Blockade der ACE-Aktivität auf der Membran der Endothelzellen des peripheren Gefäßsystems hin. Diese periphere Hemmung konnte in der höchsten Dosierung (30 nmol) noch nach 4 Stunden beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von Gohlke et al. (1989) nach icv Applikation von ACE-Hemmstoffen (Ramipril, Captopril). Während icv-appliziertes Captopril die Blutdruckantwort auf zentrales Ang I nach 24 Stunden noch nahezu vollständig hemmte, zeigte Ramipril zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Hemmung mehr. Allerdings wurde die periphere Hemmung nur eine Stunde nach icv Injektion der ACE-Inhibitoren beobachtet. Dies mag zum einen an der unterschiedlichen Kinetik der icv-applizierten ACE-Hemmstoffe und OMA, zum anderen an der unterschiedlichen Potenz, das ACE zu hemmen, liegen.

Im weiteren Teil dieser Studie wurde die Penetration von OMA durch die BHS nach systemischer Gabe untersucht. Wie zu erwarten war, führte eine akute orale oder

intravenöse Vorbehandlung der Ratten mit OMA zu einer effektiven dosisabhängigen Hemmung des Blutdruckanstiegs induziert durch iv-Ang I. Indem OMA die Konversion von Ang I zu Ang II inhibiert, wird der vasokonstriktive Effekt an glatten Muskelzellen wirkungsvoll reduziert. Die Wirkung setzt schnell ein, ist dosisabhängig und lang anhaltend. Auch nach 8 Stunden und in höchster Dosierung sogar nach 24 Stunden konnte OMA den Blutdruckanstieg durch iv-Ang I hemmen. Die lange Wirksamkeit deutet auf eine lang andauernde Blockade des ACE hin. Gleichwertige Effekte auf den Ang I-induzierten Blutdruckanstieg konnten nach iv und po Gabe von OMA beobachtet werden. Jedoch konnten keine Auswirkungen durch peripher appliziertes OMA (iv und po) auf den Ang I-icv induzierten Blutdruckanstieg gezeigt werden. Selbst in den höchsten Dosierungen von OMA 100 µmol/kg KG konnte nach Gabe von Ang I-icv keine Verminderung des MAP-Anstiegs beobachtet werden. Diese Versuchsergebnisse zeigen deutlich, dass systemisch appliziertes OMA nicht in der Lage ist, die zentralen, im Gehirn ausgelösten Effekte von Ang I zu hemmen.

Zentral vermittelte Effekte von nicht BHS-gängigen ACE-Hemmstoffen sind durchaus möglich. Die Ergebnisse der Studien von Sakaguchi et al. (1987) zeigen, dass in den CVOs, wie dem SFO und der OVLT, die BHS nicht vollständig ist und diese Hirnregionen daher auch von hydrophilen ACE-Hemmstoffen erreicht werden können. Das SFO und die OVLT, bekannte Zielorgane sowohl für das zirkulierende als auch im ZNS generierte Ang II, vermitteln dessen zentrale Effekte wie Trinkverhalten, Blutdrucksteigerung und AVP-Ausschüttung. AT1-Rezeptoren im OVLT und in Teilen des SFO sind sowohl von den Hirnventrikeln als auch vom Blut her erreichbar. In den CVOs konnte eine hohe Rezeptordichte für Ang II nachgewiesen werden und ein hoher Gehalt an ACE (Saavedra et al. 1982).

Im SFO und OVLT wird die kardiovaskuläre Antwort nach icv-Ang I Applikation generiert. In diesen beiden Hirnregionen wurden hohe Aktivitäten des ACE und eine hohe Dichte der AT1-Rezeptoren nachgewiesen (Saavedra et al. 1982; Sakaguchi et al. 1987; Obermüller et al. 1991). Unter der Annahme, dass das SFO und OVLT keine vollständige BHS besitzen, sollte systemisch appliziertes OMA ACE in diesen Hirnarealen effektiv hemmen und den Blutdruckanstieg nach icv-Ang I vollständig oder teilweise hemmen.

Interessanterweise haben wir solche Effekte auch nach systemischer Behandlung mit hohen Dosen von OMA nicht feststellen können. Wie in der Einleitung erwähnt, bestehen beide CVOs aus zwei funktionell unterschiedlichen Teilen, dem ventrikulären Teil (Liquormilieu) und dem hämalen Teil (Blutmilieu) (Krisch et al. 1978 und 1987). Das SFO und OVLT besitzen große Mengen an ACE (Saavedra et al. 1982), allerdings wurde die genaue Lokalisation dieses Enzyms innerhalb der Regionen nicht untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass icv-appliziertes Ang I einen sofortigen Blutdruckanstieg bewirkt, kann

abgeleitet werden, dass ACE im ventrikulären Teil lokalisiert ist. Entgegen der Behauptung, dass die CVOs keine vollständige BHS besitzen, kann OMA aus dem hämalen Teil, der für Substanzen im Blut frei zugänglich ist, nicht in den ventrikulären Teil diffundieren und mit dem ACE interagieren. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass systemisch verabreichtes OMA keinen Zugang zu ACE in dem SFO und OVLT hat. Es wäre auch vorstellbar, dass iv oder po-appliziertes OMA über die weniger dichte BLS in die Gehirnventrikel gelangt. Wie schon erwähnt, wird der LC aktiv im PC sezerniert und viele Substanzen, wie z. B. Hormone, erreichen aufgrund dieses Prozesses die Gehirnventrikel. Auf diesem Wege könnte das im Blut zirkulierende OMA während der Liquorproduktion aktiv oder passiv in den PC transportiert werden und folglich die Entstehung von Ang II aus Ang I in CVOs effektiv hemmen. Die Ergebnisse dieser Studie sprechen auch gegen diese Annahme.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen, in denen die Gewebsverteilung von ACE und NEP und die Effekte von OMA (40 mg/kg/d po über 3 Tage) auf ACE und NEP in den verschiedenen Organen untersucht wurde (Kubota et al., 2003). Die ACE- und NEP Inhibition wurde mittels radioaktiv markierter Liganden überprüft. OMA hemmt demnach signifikant ACE in allen Organen zu 70 - 95%, aber nicht im Gehirn (Nucleus caudatus). Für die NEP konnte eine 87%ige Hemmung in der Niere nachgewiesen werden, eine 20 - 40%ige Hemmung in Aorta, Leber, Darm, Lunge, Herzvorhof. Eine Inhibition der NEP im Gehirn (Nucleus caudatus) konnte nicht beobachtet werden. Weitere Studien zu den Penetrationseigenschaften von kombinierten NEP- und ACE-Hemmstoffen liegen nicht vor.

Klinische Bedeutung der gewonnen Daten

Eine Überaktivität des zerebralen RAS spielt auch eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie. ACE-Hemmstoffe zeigen nach systemischer Gabe eine vergleichbare antihypertensive Wirkung trotz unterschiedlicher Penetrationseigenschaften durch die BHS. So war Enalapril nicht in der Lage die BHS auch nach hoher oraler Dosierung zu passieren, während Ramipril nach oraler Applikation und Hoe 288 nach akuter und chronischer po Behandlung in den Liquor penetrierten (Gohlke et al. 1989). Da OMA die BHS nicht penetrieren kann, lassen sich seine antihypertensiven Effekte nach systemischer Gabe vor allem über periphere, vaskuläre Mechanismen erklären. An dieser Stelle ist neben den bereits in der Einleitung genannten Mechanismen auch die blutdrucksenkende Wirkung durch Hemmung des peripheren sympathischen Nervensystems zu nennen. Das NPS ist nicht nur natürlicher Gegenspieler des RAS sondern auch des sympathischen Nervensystem, alle 3 Systeme beeinflussen sich auf vielfältige Weise (Volpe 2014). Unter anderem hemmen ANP und BNP peripher direkt die

sympathische Erregung, zudem interferiert ANP am Barorezeptorreflex und führt so zu einer Abschwächung des Sympathikotonus (Luchner et al. 2004).

Obwohl in der Literatur weniger beachtet als das NPS und RAS, spielt auch die erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems die Entwicklung eines Hypertonus und der Herzinsuffizienz begünstigt (Parati et al. 2012). Omapatrilat interagiert peripher mit diesen 3 wichtigen, neurohumoralen Systemen, verstärkt die physiologisch günstigen Wirkungen und hemmt die ungünstigen.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine Assoziation zwischen dem zentralen RAS und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer Demenz (AD) und Morbus Parkinson besteht (Wright et al. 2013). Zum einen ist Angiotensin in den Astrozyten notwendig für die funktionelle Aufrechterhaltung der BHS, welche bei Patienten mit AD gestört ist (Skoog et al. 1998). Zum anderen ist die Expression von ACE im Hippocampus, frontalen Cortex und Nucleus caudatus bei diesen Patienten erhöht. Die Auswirkung von ACE-Hemmstoffen auf die AD wird kontrovers diskutiert. Im Tiermodell der AD konnte gezeigt werden, dass BHS-gängige ACE-Hemmstoffe den neuronalen Schaden verringern und zu einer Besserung im Verhalten führen (Hirawa et al. 1999; Yamada et al. 2012). Weiterhin sollen ins Gehirn penetrierende ACE-Hemmstoffe die Inzidenz von AD bei älteren hypertensiven Patienten reduzieren. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu anderen Antihypertensiva unter Behandlung mit BHS-gängigen ACE-Hemmstoffen eine Verschlechterung der kognitiven Funktionen bei Patienten mit milder bis moderater AD aufgehalten wird (Ohrui et al. 2004). Der zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht bekannt. Es wird angenommen, dass eine direkte Beeinflussung des RAS eine Rolle spielt. Kontrovers wird auch die Rolle von ACE auf die Ablagerung von β -Amyloid diskutiert. Die Arbeitsgruppe von Hu et al. (2001) konnte zeigen, dass ACE die Aggregation von β -Amyloid in vitro signifikant hemmt und damit einen wichtigen Pathomechanismus, der zu neuronalem Schaden führt, inhibiert. Dieser Effekt auf die Aggregation von β -Amyloid konnte spezifisch durch Praeinkubation mit dem ACE-Hemmer Lisinopril blockiert werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Eckman et al. (2006). Zum einen zeigten sie, dass ACE bei der Regulation von β -Amyloid im Gehirn keine Rolle spielt. Zum anderen kam es unter Behandlung mit ACE-Hemmstoffen zu keinem Anstieg der β -Amyloid Konzentration im Gehirn. Allerdings gibt es zunehmende Hinweise, dass NEP eine kritische Rolle im Katabolismus von Alzheimer β -Amyloid zu haben vermag. Nach oraler und icv Gabe eines NEP-Hemmstoffes kam es zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von β -Amyloid im Gehirn und im Plasma (Eckman et al. 2006). Studien an Ratten ergaben, dass der Abbau der Amyloid β -Peptide durch die NEP

kontrolliert wird (Iwata et al. 2000). Die Gabe eines NEP-Inhibitors über eine osmotische Pumpe in den Hippocampus führte dementsprechend zu einer Ablagerung von Amyloid im Gehirn. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass BHS-gängige NEP-Inhibitoren einen Risikofaktor für die Entwicklung und Progredienz von AD darstellen. Möglicherweise ist somit die Eigenschaft von OMA, die BHS nicht penetrieren zu können, auf den Verlauf der Erkrankung von Vorteil.

Omapatrilat und Schlaganfall

Das RAS und NPS spielen auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von zerebralen Ischämien. Ang II ist in bestimmten Hirnregionen an der Kontrolle des zerebralen Blutflusses, des sympathischen Gefäßtonus und des Barorezeptorreflexes beteiligt (Dampney et al. 1996). Über diese Mechanismen kann die Gehirndurchblutung, welche einen zentralen Punkt in der Pathologie des Schlaganfalles darstellt, reguliert werden. Ein hoher Blutdruck stellt nach wie vor den größten Risikofaktor für einen Schlaganfall dar. Klinische Studien haben den Benefit einer antihypertensiven Therapie für die primäre und sekundäre Schlaganfallprävention belegt. Medikamente, die das RAS hemmen, wie ACE-Hemmstoffe und AT1-Antagonisten, scheinen in diesem Zusammenhang günstige Effekte auszuüben, die über die Blutdrucksenkung hinausgehen. So wurde z. B. nachgewiesen, dass eine Behandlung von SHR mit ACE-Hemmstoffen und AT1-Antagonisten, das Auftreten einer zerebralen Ischämie auch ohne wesentliche Blutdrucksenkung verhindern kann (Blezer et al. 1998). Eine systemische Behandlung mit dem β -Blocker Propranolol im Vergleich zu einem AT1-Antagonisten hatte keine positiven Effekte auf den Schlaganfall bei SHR trotz gleicher Blutdrucksenkung (Nishimura et al. 2000). Man geht davon aus, dass die neuroprotektiven Effekte der ACE-Hemmstoffe und AT1-Antagonisten teilweise auf einer verbesserten Blutflussautoregulation der Hirngefäße beruhen, neben den günstigen peripheren Effekten auf die Gehirngefäße (Nishimura et al. 2000).

Obwohl OMA die BHS nicht zu überwinden vermag, könnte es bei einer Öffnung der BHS ins Gehirngewebe gelangen und die Vorgänge beeinflussen. Beim ischämischen Schlaganfall kommt es infolge der zerebralen Ischämie und der anschließenden Reperfusion zu Veränderungen der Endothelzellen der BHS. Die Öffnung der BHS läuft in zwei Phasen ab. Die erste Phase tritt wenige Minuten nach der Reperfusion ein, die zweite Phase 24-48 Stunden nach dem Beginn der Reperfusion (Rosenberg 2012). Die Freisetzung von proteolytischen Enzymen und Zytokinen ändert massiv die Durchlässigkeit der BHS und führt zur Bildung eines Ödems im Gehirn. Bei diesen Vorgängen kann auch OMA ins ischämische Gehirngewebe penetrieren und die Vorgänge beeinflussen. Der Effekt von OMA auf das Outcome nach einem ischämischen Schlaganfall kann nicht eindeutig vorausgesagt werden, denn ACE und NEP greifen in den Metabolismus von

zahlreichen Peptiden ein, die über ihre Rezeptoren entweder günstige oder schädliche Effekte auslösen. Durch die Hemmung von ACE wird die Synthese von Ang II im ischämischen Gewebe reduziert. Dadurch werden die ungünstigen Effekte, die über die Stimulation von AT1-Rezeptoren ausgelöst werden, verhindert (Groth et al. 2003; Lou et al. 2004). Andererseits werden die AT2-Rezeptoren mit neuroprotektiven und zellregenerativen Vorgängen in Verbindung gebracht. Hierzu gehören z. B. die neuronale Differenzierung, Regeneration und Gewebereparatur. Zahlreiche Experimente belegen den Zusammenhang zwischen AT2-Rezeptoraktivierung und Steuerung von Zellregenerationsvorgängen (Gallinat et al. 1998; Culman et al. 2001; Li et al. 2005). Im Einklang mit dieser Vermutung steht der Befund, dass der AT2-Rezeptor während und nach einem Schlaganfall vermehrt exprimiert wird (Zhu et al. 2000). Eine Hemmung des ACE und Reduktion der Ang II-Synthese im ischämischen Gewebe wird zwar die ungünstigen Effekte, die über die Stimulation von AT1-Rezeptoren ausgelöst werden, verhindern, allerdings werden die, über die AT2-Rezeptoren vermittelten neuroprotektiven Effekte auch vermindert. Die Aktivierung von Signaltransduktionswegen von ANP kann sich im ischämischen neuronalen Gewebe auch neuroprotektiv auswirken. Das ANP wird vermehrt im beschädigten Hirngewebe exprimiert und schützt Neurone gegen die Excitotoxizität und *spreading depression* (Wiggins et al. 2003). Erhöhte ANP Gen-Expression reduziert die Schlaganfall-Mortalität der Salz-sensitiven Dahl-Ratten (Lin et al. 1999). Eine effektive Hemmung von NEP im ischämischen Gewebe würde die neuroprotektiven Effekte von ANP vermindern. ACE-Hemmstoffe greifen auch in das Kallikrein-Kinin-System ein und vermindern im Wesentlichen den Abbau von Bradykinin. Die Blockade des B2-Rezeptors nach Schlaganfall reduziert das Gehirnödem und den neuronalen Zelluntergang und führt insgesamt zu einem verbesserten neurologischen Outcome (Ding-Zhou et al. 2003; Kläsner et al. 2006). Die Wirkungen von OMA auf das Kallikrein-Kinin-System wären ein weiterer Nachteil in Bezug auf die Neuroprotektion.

Durch die Hemmung von ACE/NEP wird zudem auch die Konzentration von Substanz P erhöht. Substanz P, injiziert icv oder in manche hypothalamische Gebiete, induziert eine Aktivierung des Sympathikus charakterisiert durch einen Blutdruck-, Herzfrequenz- und Herzminutenvolumenanstieg, Vasodilatation in der Skelettmuskulatur, erhöhte Aktivität des N. splanchnicus- und suprarenalis und einen Anstieg von Noradrenalin und Adrenalin im Plasma (Unger et al. 1985; Unger et al. 1988). Substanz P verstärkt inflammatorische Vorgänge und die Bildung eines Hirnödems in ischämischen Gebieten. Die neuroprotektiven Wirkungen eines Substanz P-Antagonisten im Rahmen von Hirnischämien konnten gezeigt werden (Turner et al. 2011). Insofern ist das Unvermögen von Omapatrilat, die BHS zu überwinden, im Zusammenhang mit den ungünstigen, zentrale Wirkungen von Substanz als eher vorteilhaft zu werten.

Aufgrund der vielfältigen Effekte von OMA im ischämischen Gehirngewebe ist es nicht überraschend, dass eine eindeutige Aussage über das Outcome nach einem ischämischen Schlaganfall nicht getroffen werden kann. Unsere Versuche haben dies bestätigt. Wir haben feststellen können, dass eine chronische zentrale Vorbehandlung mit OMA keinen wesentlichen Einfluss auf den Ausgang nach einer zerebralen Ischämie hatte. Möglicherweise sind Substanzen wie OMA, die die BHS nicht penetrieren, in diesem Zusammenhang vorteilhaft, weil sie die zahlreichen günstigen Vorgänge nach einem ischämischen Schlaganfall nicht vermindern und die Mechanismen, welche zu größerem Schaden führen, nicht verstärken können.

5. Zusammenfassung

Omapatrilat ist ein kombinierter Inhibitor des Angiotensin-Konversionsenzyms und der Neutralen Endopeptidase. Die Wirkungen von Omapatrilat in peripheren Geweben, z. B. die antihypertensiven und organoprotektiven Effekte an Herz, Niere und Gefäßen, wurden ausführlich beschrieben. Jedoch fehlen in der Literatur Daten über mögliche zentrale Effekte des Hemmstoffes. Die wichtigste Voraussetzung für die Wirkung einer Substanz im Gehirn ist die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In dieser Studie untersuchten wir zum einen die Auswirkung von der zentralen (intracerebroventrikulären) Gabe von Omapatrilat auf die blutdrucksteigernden Effekte von intracerebroventrikulär appliziertem Angiotensin I und, zum zweiten, die Penetration von systemisch verabreichtem Omapatrilat in die Gehirnv ventrikel.

Zentral appliziertes Omapatrilat konnte zwar dosisabhängig, aber nicht vollständig und nicht lang andauernd den Blutdruckanstieg durch intracerebroventrikulär appliziertes Angiotensin I hemmen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Hemmung des Angiotensin-Konversionsenzyms durch Omapatrilat in den circumventrikulären Organen, im Subfornikalorgan und Organum vasculorum Laminae terminalis, wo die kardiovaskuläre Antwort auf intracerebroventrikulär injiziertes Angiotensin I hauptsächlich generiert wird, nicht effektiv und nur kurz andauernd war. Dagegen wurde eine starke, dosisabhängige und lang andauernde Verminderung der peripheren, durch intravenös injiziertes Angiotensin I ausgelösten, kardiovaskulären Antwort, nach intracerebroventrikulärer Injektion von Omapatrilat beobachtet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass intracerebroventrikulär injiziertes Omapatrilat nicht in das Gehirnparenchym diffundiert, sondern sehr rasch aus den Gehirnv ventrikeln ausgewaschen wird.

Systemisch, intravenös appliziertes Omapatrilat hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck und die Herzfrequenz in normotensiven Ratten. Wie erwartet, haben wir in dieser Arbeit zeigen können, dass eine akute, systemische (intravenöse oder per orale) Vorbehandlung mit Omapatrilat den Blutdruckanstieg, durch intravenös injiziertes Angiotensin I, effektiv und lang anhaltend hemmt. Dagegen hat die systemische Vorbehandlung mit Omapatrilat keine Wirkung auf den Blutdruckanstieg, der durch intracerebroventrikulär injiziertes Angiotensin I induziert wird. Obwohl das Subfornikalorgan und Organum vasculorum Laminae terminalis keine vollständige Blut-Hirn-Schranke besitzen, lassen diese Befunde eindeutig darauf schließen, dass systemisch verabreichtes Omapatrilat keinen Zugang zu dem Angiotensin-Konversionsenzym im Subfornikalorgan und Organum vasculorum der Lamina terminalis hat. Darüber hinaus kann ein aktiver oder passiver Transport von systemisch verabreichtem Omapatrilat im Plexus choroideus in die cerebrospinale Flüssigkeit ausgeschlossen werden. Unsere Daten beweisen eindeutig, dass Omapatrilat

nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

In den letzten Jahren wurden neue Angiotensin-Konversionsenzym/Neutrale Endopeptidase -Hemmstoffe, kombinierte Inhibitoren des Angiotensin 1-Rezeptors und der Neutralen Endopeptidase und sogar *triple Inhibitoren*, die gleichzeitig das Angiotensin-Konversionsenzym, die Neutrale Endopeptidase und das Endothelin-Konversionsenzym zu hemmen vermögen, entwickelt. Diese neuen Hemmstoffe werden in präklinischen Studien untersucht (von Lueder et al. 2014). Nach ihrer Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke können diese Inhibitoren den Metabolismus und die Rezeptorbindung von zahlreichen Peptiden beeinflussen und dadurch mit den vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen dieser Peptide im Gehirn interferieren. Eine gründliche Untersuchung der Fähigkeit dieser neuen Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden ist deshalb unerlässlich.

6. Referenzen

Blackburn, R.E., Samson, W.K., Fulton, R.J., Stricker, E.M., Verbalis, J.G. (1995): Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol*; 269: 245-251.

Blezer, E.L., Nicolay, K., Bär, D., Goldschmeding, R., Jansen, G.H., Koomans, H.A., Joles, J.A. (1998): Enalapril prevents imminent and reduces manifest cerebral edema in stroke-prone hypertensive rats. *Stroke*; 29(8): 1671-7.

Blume, A., Herdegen, T., Unger, T. (1999): Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J Mol Med*; 77: 339-357.

Brinker, B., Stopa, E., Morrison, J., Klinge, P. (2014): A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids and Barriers*; 11:10.

Campese, V.M., Lassetter, K.C., Ferrario, C.M. (2001): Omapatrilat versus lisinopril: efficacy and neurohormonal profile in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension*; 38: 1342–1348.

Chai, S.Y., Mendelsohn, F.A., Paxinos, G. (1987): Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. *Neuroscience*; 20(2): 615-627.

Chen, H.H., Burnett, J.C. Jr., (1998): C-Type natriuretic peptide. The endothelial component of the natriuretic peptide system. *Cardiovascular Pharmacology*; 32(suppl 3): 22-28.

Correa, F.M.A., Plunkett, L.M., Saavedra, J.M. (1987): Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry. *Brain Res*; (375): 259-266.

Culman, J, Ritter, S., Ohlendorf, C., Haass, M., Maser-Gluth, C., Spitznagel, H., Unger, T. (1997): A new formalin test allowing simultaneous evaluation of cardiovascular and nociceptive responses. *Can J Physiol Pharmacol*; 75(10-11): 1203-1211.

Culman, J., Baulmann, J., Blume, A., Unger, T. (2001): The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 2(2): 96-102.

Dampney, R.A.L., Hirooka, Y., Potts, P.D., Head, G.A. (1996): Functions of angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; Suppl 3: 105-111.

De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T. (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*; 52(3): 415-472.

Diem, D.T., Frauman A.G., Johnston, C.I., Fabiani, M. E. (2001): Angiotensin receptors: distribution signalling and function. *Clinical Science*; 100: 481-492.

Ding-Zhou, L., Margail, I., Palmier, B., Pruneau, D., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C. (2003): LF16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic braininjury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol*; 139(8): 1539-47.

D'Uscio, L.V., Quaschnig, T., Burnett, J.C. Jr, Lüscher, T.F. (2001): Vasopeptidase inhibition prevents endothelial dysfunction of resistance arteries in salt-sensitive hypertension in comparison with single ACE Inhibition. *Hypertension*; 37(1): 28-33.

Eckman, E.A., Adams, S.K., Troendle, F.J., Stodola, B.A., Kahn, M.A., Fauq, A.H., Xiao, H.D., Bernstein, K.E., Eckman, C.B. (2006): Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*; 281(41):30471-8.

Engelhardt, B., Sorokin, L. (2009): The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*; 31(4): 497-511.

Ferguson, A.V. (2009): Angiotensinergic regulation of autonomic and endocrine outputs: critical roles for the subfornical organes and paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*; 89 (4): 370-376.

Fournie-Zaluski, M.C., Coric, P., Thery, V., Gonzalez, W., Meudal, H., Turcaud, S., Michel, J.B., Roques, B.P. (1996): Design of orally active dual inhibitors of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme with long duration of action. *J Med Chem*; 39(13): 2594-608.

Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T., Herdegen, T. (1998): Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of antiotensin AT₂ and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Mol Brain Res*; 57(1): 111-122.

Gohlke, P., Schölkens, B., Henning, R., Urbach, H., Unger, T. (1989): Inhibition of converting enzyme in brain tissue and cerebrospinal fluid of rats following chronic oral treatment with the converting enzyme inhibitors ramipril and Hoe 288. *J Cardiovasc Pharmacol*; 14 Suppl 4: 32-6.

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

Gwathmey, T.M., Alzayadneh, E.M., Pendergrass, K.D., Chappell, M.C. (2012): Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 302: 518-530.

Haack, D., Möhring, J. (1978): Vasopressin-mediated blood pressure response to intraventricular injection of angiotensin II in the rat. *Pflugers Arch*; 373(2): 167-173.

Healy, D.P., Printz, M.P. (1984): Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I, angiotensinogen, and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. *Hypertension* 6 (Suppl. I): I130-I136.

Hedge, L.G., Yu, C., Renner, T., Thibodeaux, H., Armstrong, S.R., Park, T., Cheruvu, M., Olsufka, R., Sandvik, E.R., Lane, C.E., Budmann, J., Hill, C.M., Klein, U., Hedge, S.S. (2011): Concomitant angiotensin AT₁ receptor antagonism and neprilysin inhibition produces omapatrilat-like antihypertensive effects without promoting tracheal plasma extravasation in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*; 57(4): 495-504.

Hirawa, N., Uehara, Y., Kawabata, Y., Numabe, A., Gomi, T., Ikeda, T., Suzuki, T., Goto, A., Toyo-oka, T., Omata, M. (1999): Long-term inhibition of renin-angiotensin system sustains memory function in aged Dahl rats. *Hypertension*; 34(3): 496-502.

Hogarty, D.C., Speakman, E.A., Puig, V., Phillips, M.I. (1992): The role of angiotensin, AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. *Brain Res*; 586 (2): 289-94.

Höhle, S., Blume, A., Lebrun, C., Culman, J., Unger, T., (1995). Angiotensin receptors in the brain. *Pharmacol Toxicol*; 77: 306-315.

Honda, K., Negoro, H., Dyball, R.E., Higuchi, T., Takano, S. (1990): The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between the supraoptic and other diencephalic nuclei. *J Physiol*; 431: 225-241.

Hu, J., Igarshi, A., Kamata, M., Nakagawa, H. (2001): Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer Amyloid β -Peptide (A β), retards A β aggregation, deposition, fibril formation and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem*; 276(51): 47863-47868.

Imboden, H., Harding, J.W., Hilgenfeldt, U., Celio, M.R., Felix, D. (1987): Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res*; 410: 74-77.

Imboden, H., Harding, J.W., Felix, D. (1989): Hypothalamic angiotensinergic fibre systems terminate in the neurohypophysis. *Neurosci Lett*; 96: 42-46.

Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T. (2000): Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*; 6(7): 718-9.

Iyer, R.A., Malhotra, B., Khan, S., Mitroka, J., Bonacorsi, S. Jr., Waller, S.C., Rinehart, J.K., Kripalani, K. (2003): Comparative biotransformation of radiolabeled [(14)C]omapatrilat and stable-labeled [(13)C(2)]omapatrilat after oral administration to rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*; 31(1):67-75.

Johanson, C.E., Stopa, E.G., McMillan, P.N. (2011): The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. In: the blood-brain and other neural barriers: reviews and protocols, Nag, S. (ed), Methods in Molecular Biology, Vol. 686, Humana Press, Springer Verlag, pp 101-131.

Kläsner, B., Lumenta, D.B., Pruneau, D., Zausinger, S., Plesnila, N. (2006): Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int*; 49 (5): 442-7.

Krisch, B., Leonhardt, H., Buchheim, W. (1978): The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tiss Res*; 195(3): 485-497.

Krisch, B., Leonhardt, H., Oksche, A. (1987): Compartments in the organum vasculosum laminae terminalis of the rat and their delineation against the outer cerebrospinal fluid containing space. *Cell Tissue Res*; 250(2): 331-347.

Kubota, E., Dean, R.G., Hubner, H.A., Casley, D.J., Johnston, C.L., Burrell, L.M. (2003): Differential tissue and enzyme effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in the rat. *Clin Sci (Lond)*; 105(3): 339-45.

Lang, R.E., Rascher, W., Heil, J., Unger, T., Ganten, D. (1982): Angiotensin II stimulates oxytocin release: impaired response in rats with genetic hypothalamic diabetes insipidus. *Eur J Pharmacol*; 83(1-2): 113-117.

Lebrun, C.J., Blume, A., Herdegen, T., Seifert, K., Bravo, R., Unger, T. (1995): Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience*; 65(1): 93-9.

Leonhardt, H. (1990): Nervengewebe und Nervensystem. In: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, pp 234-306.

Levin, E.R., Frank, H.J.L. (1991): Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol*; 261: 453-457.

Li, J., Culman, J., Hörtnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U., Unger, T. (2005): Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*; 19(6): 617-619.

Lin, K.F., Chao, J., Chao, L. (1999): Atrial natriuretic peptide gene delivery reduces stroke-induced mortality rate in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*; 33(1 Pt 2): 219-224.

Lou, M., Blume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., Culman, J. (2004): Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis and inflammatory responses in the rat. *J Cereb Blood Flow*; 24: 536-547.

Luchner, A., Schunkert, H. (2004): Interactions between the sympathetic nervous system and the cardiac natriuretic peptide system. *Cardiovasc Res*; 63: 443-449.

Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, H., Unger, T. (1998): The angiotensin II type 2 (AT2) receptors promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med*; 188: 661-670.

Maisel, A. (2007): Circulating natriuretic peptide levels in acute heart failure. *Rev Cardiovasc Med.*; 8 Suppl 5: 13-21.

Marin-Grez, M., Fleming, J.T., Steinhausen, M. (1986): Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*; 324: 473-476.

McKinley, M.J., Badoer, E., Oldfield, B.J. (1992): Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res*; 594: 295-300.

McKinley, M.J., Badoer, E., Viva, L., Oldfield, B.J. (1995): Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res Bull*; 33: 131-137.

Mendelsohn, F.A., Quirion, R., Saavedra, J.M., Aguilera, G., Catt, K.J. (1984): Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 81(5): 1575-1579.

Mills, R.M., Lejemtel, T.H., Horton, D.P. (1999): Sustained hemodynamic effects of an infusion of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) in heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *N Study gr. J Am Coll Cardiol*; 34: 155-162.

Molinaro, G., Rouleau, J.L., Adam, A. (2002): Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*; 2(2): 131-41.

Murtha, L.A., Yang, Q., Parsons, M.W., Levi, C.R., Beard, D.J., Spratt, N.J., McLeod, D.D. (2014): Cerebrospinal fluid is drained primarily via the spinal canal and olfactory route in young and aged spontaneously hypertensive rats. *Fluid barriers*; 11:12.

Nakamura, S., Moriguchi, A., Morishita, R. (1999): Activation of brain angiotensin system by in vivo human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats. *Hypertension*; 34: 302-308.

Nishimura, Y., Ito, T., Saavedra, J.M., (2000): Angiotensin AT1 blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*; 31: 2478-2486.

Obermüller, N., Unger, T., Culman, J., Gohlke, P., de Gasparo, M., Bottari, S.P. (1991): Distribution of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain nuclei. *Neurosci Lett*; 132: 11-15.

Ohruji, T., Tomita, N., Sato-Nakagawa, T., Matsui, T., Maruyama, M., Niwa, K., Arai, H., Sasaki, H. (2004): Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression. *Neurology*; 63(7): 1324-5.

Oldfield, B.J., Hards, D.K., McKinley, M.J. (1991): Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers. *Brain Res*; 558(1): 13-19.

Parati, G., Esler, M., (2012): The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* ; 33: 1058-1066.

Paxinos, G., Watson, C. (1982): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., Kanmogne, G.D. (2006): Blood-brain barrier: structural components and functions under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 1(3): 223-236.

Phillips, M.I. (1997): Functions of angiotensin in the central nervous system. *Ann Rev Physiol*; 49: 413-435.

Pickel, V.M., Chan, J., Ganten, D. (1986): Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ. *J Neurosci*; 6: 2457-2469.

Raizada, M.K., Lu, D., Tang, W., Kurian, P., Sumners, C. (1993): Increased angiotensin II type-1 receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology*; 132(4): 1715-1722.

Redzic, Z. (2011): Molecular biology of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS*; 8:3.

Rosenberg, G.A. (2012): Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*; 32(7): 1139-1151.

Rouleau, J.L., Pfeffer, M.A., Stewart, D.J. (2000): Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet*; 356: 615-620.

Saavedra, J.M., Chevillard, C. (1982): ACE is present in the subfornical organ and other circumventricular organs of the rat. *Neurosci Lett.*; 29(2): 123-7.

Saavedra, J.M. (1992): Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*; 13(2): 329-380.

Saavedra, J.M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Jezova, M., Zhou, J. (2004): Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann N Y Acad Sci*; 1018: 76-84.

Sakaguchi, K., Chai, S.Y., Jackson, B., Johnston, C.I., Mendelsohn, F.A. (1987): Blockade of angiotensin converting enzyme in circumventricular organs of the brain after oral lisinopril administration demonstrated by quantitative in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 14(3): 155-8.

Silver, M.A., Maisel, A., Yancy, C.W., McCullough, P.A., Burnett, J.C. Jr, Francis, G.S., Mehra, M.R., Peacock, W.F. 4th, Fonarow, G., Gibler, W.B., Morrow, D.A., Hollander, J. (2004): BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Congest Heart Fail*; 10(5 Suppl 3):1-30.

Skoog, I., Wallin, A., Fredman, P., Hesse, C., Aevarsson, O., Karlsson, I., Gottfries, C.G., Blennow, K. (1998): A population study on blood-brain barrier function in 85-year-olds: relation to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology*; 50(4): 966-71.

Song, K., Allen, A.M., Paxinos, G., Mendelsohn, F.A.O. (1992): Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol*; 316: 467-484.

- Speake, T., Whitwell, C., Kajita, H., Majid, A., Brown, P.D. (2001): Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech*; 52(1): 49-59.
- Steele, M.K., Gardner, D.G., Xie, P.L., Schultz, H.D. (1991): Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *Am J Physiol*; 260(6 Pt 2): R1145-51.
- Stein, B.C., Levin, R.I. (1998): Natriuretic peptides. Physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J*; 135: 914-923.
- Strittmacher, S.M., Lo, M.M.S., Javitch, J.A., Snyder, S.H. (1984): Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with (3H) captopril: Localization of a striatonigral pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*; 81: 1599-1603.
- Sumners, C., Myers, L.M., Kalberg, C.J., Raizada, M.K. (1990): Physiological and pharmacological comparisons of angiotensin II receptors in neuronal and astrocyte glial culture. *Prog Neurobiol*; 34(5): 355-385.
- Taal, M.W., Nenov, V.D., Wong, W., Satyal, S.R., Sakharova, O., Choi, J.H., Troy, J.L., Brenner, B.M. (2001): Vasopeptidase inhibition affords greater renoprotection than angiotensin-converting enzyme inhibition alone. *J Am Soc Nephrol*; 12(10): 2051-9.
- Takata, Y., Hutchinson, J.S. (1983): Leakage of angiotensin converting enzyme inhibitors from the cerebral ventricles into the peripheral circulation in conscious, spontaneously hypertensive rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 5(3): 139-42.
- Tiyerili, V., Mueller, C.F., Becher, U.M., Czech, T., van Eickels, M., Daiber, A., Nickenig, G., Wassmann, S. (2012): Stimulation of the AT2 receptor reduced atherogenesis in ApoE(-/-)/AT1A(-/-) double knock out mice. *J Mol Cell Cardiol*; 52(3): 630-637.
- Trippodo, N.C., Fox, M., Monticello, T.M., Panchal, B.C., Asaad, M.M. (1998): Simultaneous inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme by omapatrilat increased survival in heart failure hamsters greater than ACE inhibition. *Circulation*; 98: I-781.

Turner, R.J., Helps, S.C., Thornton, E., Vink, R. (2011): A substance P antagonist improves outcome when administered 4 h after onset of ischaemic stroke. *Brain Res*; 1393: 84-90.

Unger, T., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D., Lang, R.E (1985): Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. Implications for cardiovascular adaptation to behavioral responses. *Circ Res*; 56(4): 563-575.

Unger, T., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H., Veelken, R. (1988): Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res*; 63(4): 812-820.

Unger, T. (1999): The angiotensin type 2 receptor: variation on an enigmatic theme. *J Hypertension*; 17: 1775-1786.

Urzedo-Rodrigues, L.S., Depieri, T., Cherobino, A.J., Lopes, O.U., Menani, J.V., Colombari, D. (2011): Hypothalamic disconnection caudal to paraventricular nucleus affects cardiovascular and drinking responses to central angiotensin II and carbachol. *Brain Research*; 1388: 100-108.

Volpe, M (2014): Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International Journal of Cardiology*; 176: 630-639.

Von Lueder, T.G., Atar, D., Krum, H. (2014): Current role of neprilysin inhibitors in hypertension and heart failure. *Pharmacol Ther*; 144(1): 41-49.

Wiggins, A.K., Shen, P.J., Gundlach, A.L. (2003): Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience*; 118 (3): 715-726.

Wijeyaratne, C.N., Moul, P.J.A. (1993): The effect of (alpha) human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab*; 76: 343-347.

Wright, J.W., Kawas, H.K., Harding, J.L. (2013): A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Front. Endocrinol*; 4: 158.

Wu, C.Y., Zha, H., Xia, Q.Q., Yuan, Y., Liang, X.Y., Li, J.H., Guo, Z.Y., Li, J.J. (2013): Expression of angiotensin II and its receptors in activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in the adult rats. *Mol Cell Biochem*; 382(1-2): 47-58.

Yamada, K., Horita, T., Takayama, M., Takahashi, S., Takaba, S., Nagata, Y. (2011): Effect of centrally active angiotensin converting enzyme inhibitor, perindopril, on cognitive performance in chronic cerebral hypo-perfusion rats. *Brain Res*; 1421: 110-120.

Zheng, W., Monnot, A.D. (2012): Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*; 133(2): 177-188.

Zhu, Y.Z., Chimon, G.N., Zhu, Y.C., Lu, Q., Li, B., Hu, H.Z., Yap, E.H., Lee, H.S., Wong, P.T. (2000): Expression of angiotensin II AT2 receptor in the acute phase of stroke in rats. *Neuroreport*; 11(6): 1191-4.

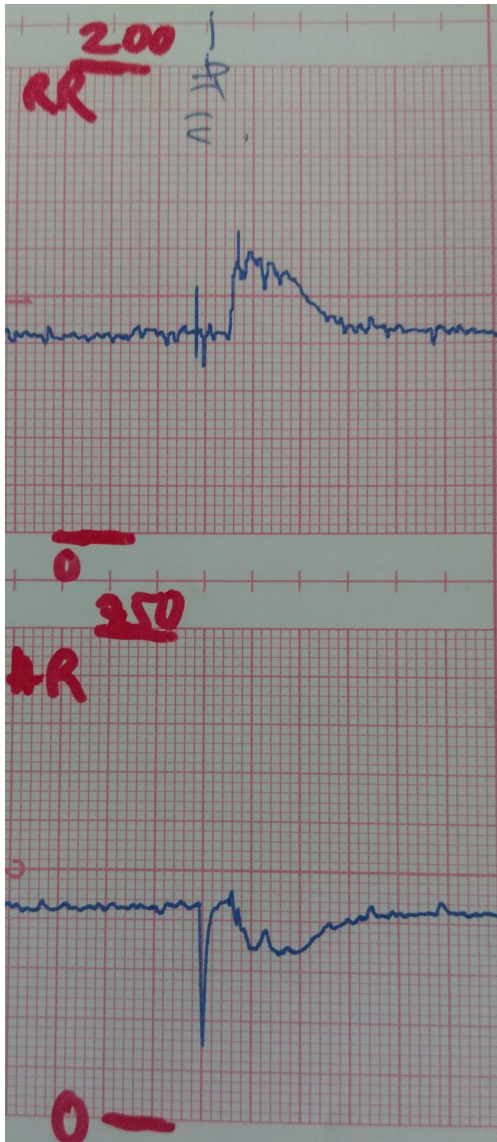
Zhuo, J.L., Li, X.C. (2011): New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*; 32: 1551-1565.

7. Abkürzungsverzeichnis

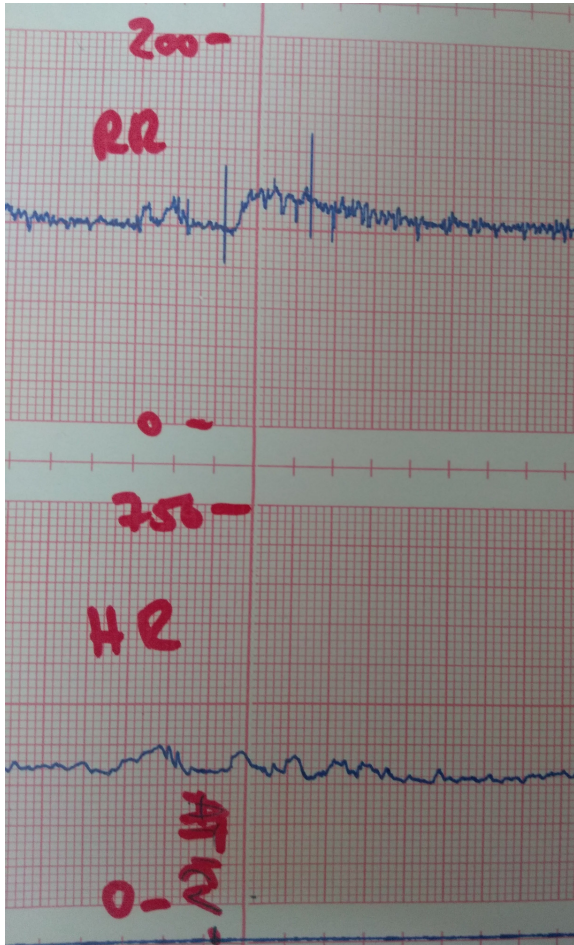
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
AD	Alzheimer Demenz
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AVP	Vasopressin
AT1-Rezeptor	Angiotensin Typ 1-Rezeptor
AT2-Rezeptor	Angiotensin Typ 2-Rezeptor
AUC	Area under curve
BNP	Brain natriuretisches Peptid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
bpm	Herzschläge pro Minute
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CVOs	Circumventrikuläre Organe
HR	Herzfrequenz
icv	intracerebroventrikulär
ITF	Induzierbare Transkriptionsfaktoren
iv	intravenös
KG	Körpergewicht
LC	Liquor cerebrospinalis
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MnPO	Nucleus praeopticus medianus
NEP	Neutrale Endopeptidase
NP	Natriuretische Peptide
NPR-A Rezeptor	Natriuretischer Peptidrezeptor A
NPR-B Rezeptor	Natriuretischer Peptidrezeptor B
NPS	Natriuretisches-Peptid-System
NTS	Nucleus tractus solitarii
OMA	Omapatrilat
OVLT	Organum vasculorum Laminae terminalis
PC	Plexus choroideus
po	per oral
PVN	Nucleus paraventricularis
RAS	Renin-Angiotensin-System

SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SFO	Subfornikalorgan
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SON	Nucleus supraopticus
VPI	Vasopeptidase-Inhibitoren
ZNS	Zentrales Nervensystem

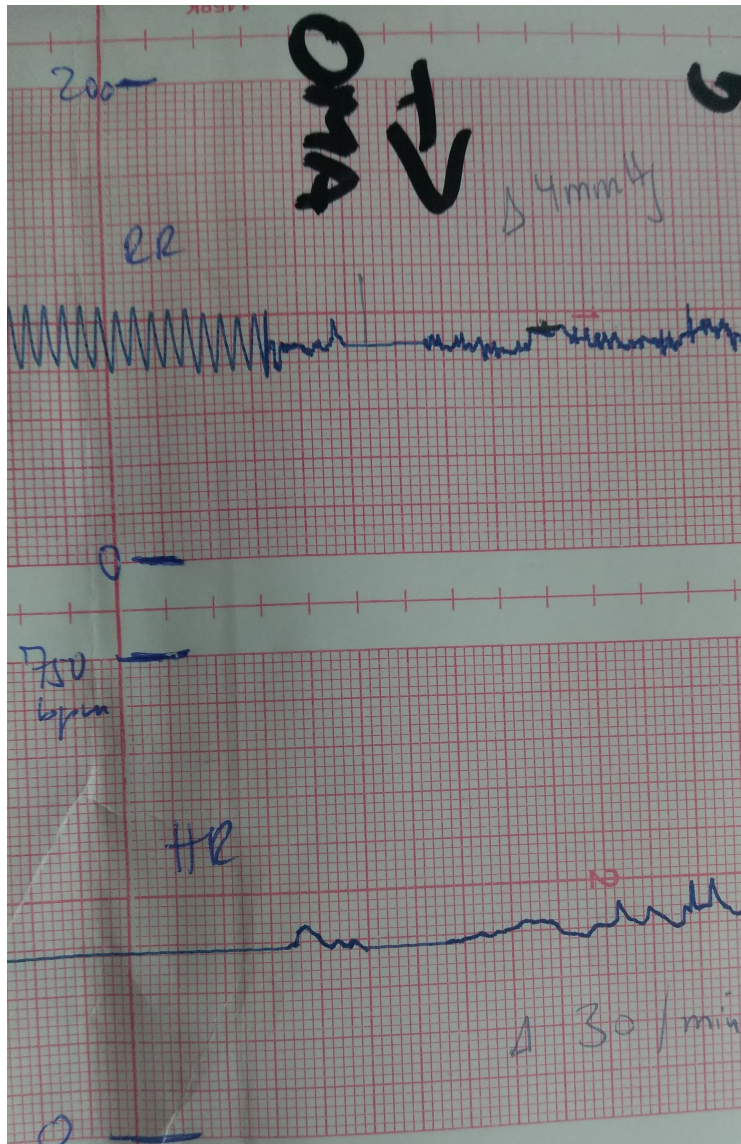
8. Originalregistrierung



Originalregistrierung 1: Dargestellt sind die Reaktionen des mittleren arteriellen Blutdrucks (oben im Bild) und der Herzfrequenz (unten im Bild) nach intravenöser Gabe von Angiotensin I ohne Vorbehandlung von Omapatrilat oder Vehikel im zeitlichen Verlauf.



Originalregistrierung 2: Dargestellt sind die Reaktionen des mittleren arteriellen Blutdrucks (oben im Bild) und der Herzfrequenz (unten im Bild) nach intracerebroventrikulärer Gabe von Angiotensin I ohne Vorbehandlung von Omapatrilat oder Vehikel im zeitlichen Verlauf.



Originalregistrierung 3: Dargestellt sind die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte, sowie mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz vor Gabe von Omapatrilat und die Reaktionen des mittleren arteriellen Blutdrucks (oben im Bild) und der Herzfrequenz (unten im Bild) unmittelbar bei intravenöser Gabe von Omapatrilat (100 $\mu\text{mol/kg KG}$) im zeitlichen Verlauf.

9. Danksagung

Diese Studie wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung unterstützt haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei OA PD Dr. Dr. Juraj Culman für die engagierte und geduldige Betreuung und wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Über die lange Zeit war er mein Hauptansprechpartner und stand mir stets mit seiner fachlichen und wissenschaftlichen Kompetenz zur Seite.

Für die Hilfe bei der statistischen Analyse bedanke ich mich bei Dr. Jürgen Hedderich aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik.

Mein Dank gilt den Kollegen und Kolleginnen im Labor, insbesondere Herrn Jan Brdon, Dr. Jihong Xu, Dr. Yi Zhao und Dr. Wolf Groth für die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen und die angenehme, kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Prof. Dr. Peter Gohlke möchte ich für die vielen fachlichen Ratschläge danken.

Frau Micheline Neubert und Frau Jutta Finger danke ich für die Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und meinem Ehemann, der mir stets gelassen zur Seite steht.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Wenke Schmedt auf der Günne
Geboren am 21.09.1976 in Osnabrück
Verheiratet, 3 Kinder, evangelisch

Beruflicher Werdegang

<i>seit 1/2013</i>	<i>Fachärztin für Allgemeinmedizin</i>
Assistenzärztin	
<i>5/2009 – 8/2015</i>	Praxis Dr. P. Jessen/ I. Grimm, Kiel (mit Unterbrechung durch 2 Elternzeiten)
<i>08/2008 -4/2009</i>	MVZ Chirurgie am Ostufer, Kiel
<i>08/2005 -07/2007</i>	Medizinische Klinik, Westküstenklinikum Heide, Prof. Keck
<i>08/2003 - 02/2005</i>	Medizinische Klinik m. S. Nephrologie und Intensivmedizin, Charité-Campus Virchow-Klinikum, Prof. Frei
Praktisches Jahr	
<i>10/2002 – 02/2003</i>	Innere Abteilung der CAU Kiel, Prof. Fölsch
<i>05/2002 – 09/2002</i>	Neurologische Klinik der CAU Kiel, Prof. Deuschl Neurologische Abteilung, Ipswich Hospital, Lehrkrankenhaus der Universität Cambridge, England
<i>02/2002 – 05/2002</i>	Allgemeine Chirurgie / Thoraxchirurgie der CAU Kiel, Prof. Kremer; Herzchirurgie der CAU Kiel, Prof. Cremer
Studium	
<i>10/1995 – 04/2003</i>	Medizinstudium an der CAU Kiel
<i>4/2003</i>	Approbation als Ärztin
Famulaturen	
<i>09/2000 – 10/2000</i>	Institut für Pharmakologie der CAU Kiel
<i>03/1999 – 04/1999</i>	Anästhesie Abteilung und Innere Abteilung, Western Isles Hospital, Stornoway, Schottland
<i>09/1999 – 10/1999</i>	Neurologische Abteilung, Westf. Klinik für Psychiatrie und Neurologie Lengerich
<i>03/1998 – 04/1998</i>	Innere Abteilung, Evangelisches Krankenhaus Lengerich
Schulbildung	
<i>06/1995</i>	Abitur, Hannah-Arendt-Gymnasium Lengerich

11. Veröffentlichungen

Schmedt auf der Günne, W., Zhao, Y., Hedderich, J., Gohlke, P., Culman, J. (2015):
Omapatrilat: penetration across the blood-brain barrier and effects on ischaemic stroke in
rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; DOI 10.1007/s00210-015-1126-1.