

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

BEDEUTUNG DES TRANSPORTERPROTEINS MRP2
FÜR DIE PENETRATION VON
AT₁-REZEPTORANTAGONISTEN DURCH DIE
BLUT-HIRN-SCHRANKE

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

TONI ALEXANDER JACOB

aus Werneck

Kiel 2015

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Gohlke

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Andreas Binder

Tag der mündlichen Prüfung:

05.12.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

28.08.2017

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

In Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Renin-Angiotensin-System	1
1.1.1	Periphere Wirkung	1
1.1.2	Wirkung im zentralen Nervensystem	2
1.2	AT ₁ -Rezeptorantagonisten	2
1.3	AT ₁ -Rezeptorantagonisten in der Schlaganfallforschung	4
1.4	Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke	5
1.5	Fragestellung	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Tiere und Tierhaltung	8
2.2	Herstellung der Lösungen	8
2.2.1	Verwendung und Bezug der Medikamente und Lösungen	8
2.2.2	Ansatz der Lösungen	9
2.3	Operative Verfahren	11
2.3.1	Narkose der Tiere	11
2.3.2	Herstellung und Implantation einer intracerebroventrikulären Kanüle	11
2.3.2.1	Herstellung einer intracerebroventrikulären Kanüle	12
2.3.2.2	Implantation der intracerebroventrikulären Kanüle	12
2.3.3	Anlage eines intravenösen Katheters	13
2.4	Herstellung der Applikationssysteme und Applikationstechniken	16
2.4.1	Intracerebroventrikuläre Applikation	16
2.4.2	Intravenöse Applikation	16
2.5	Messverfahren	17
2.6	Versuchsdurchführung	17
2.6.1	Zeitlicher Ablauf	17
2.6.2	Gruppeneinteilung	19
2.7	Statistik	19
2.8	Schwierigkeiten der Methode	20
2.8.1	Narkose mit Ketamin und Medetomidin	20
2.8.2	Postoperative Sterblichkeit	20

3 Ergebnisse	22
3.1 Basale Trinkantwort und Kontrollgruppe	22
3.2 Kombination von Candesartan und Probenecid	23
3.3 Kombination von Irbesartan und Probenecid	24
3.4 Kombination von Losartan und Probenecid	25
3.5 Kombination von Telmisartan und Probenecid	25
3.5.1 Telmisartan 1mg/kgKG	26
3.5.2 Telmisartan 3mg/kgKG	27
4 Diskussion	28
4.1 Transportervermittelte Effekte	28
4.2 Substanzspezifische Fettlöslichkeit	30
4.3 Interaktion zwischen AT ₁ -Rezeptorantagonisten und AT ₁ -Rezeptoren	32
4.3.1 Daten aus der Literatur zur Affinität und 'Überwindbarkeit'	32
4.3.2 Inbezugsetzung der Ergebnisse zu den Daten aus der Literatur	35
4.4 Klinische Relevanz des Forschungsgebiets	36
4.5 MRP2 und Probenecid	38
4.6 Schlussfolgerung der Diskussion	39
5 Zusammenfassung	41
6 Literaturverzeichnis	43
7 Danksagung	52
8 Publikationen	53
9 Lebenslauf	54

Abkürzungsverzeichnis

ANG	Angiotensin
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 1
AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 2
BHS	Blut-Hirn-Schranke
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MRP	Multidrug-Resistance-Protein
Pgp	P-Glykoprotein
RAS	Renin-Angiotensin-System
s.c.	subkutan
SCAST	Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein Hormonsystem, zu dessen Aufgaben die Regulation des Wasser-Elektrolythaushalts und des Blutdrucks gehören.

Im juxtaglomerulären Apparat der Niere wird Renin synthetisiert und ins Blut sezerniert. Dort spaltet es von Angiotensinogen, einem Produkt der Leber, ein Peptid ab. Von dem so entstandenen, weitgehend unwirksamen Prohormon Angiotensin (ANG) I, trennt das Angiotensin-Konversions-Enzym zwei weitere Aminosäuren ab. Auf diese Weise entsteht das wirksame Peptidhormon ANG II (Übersicht bei De Gasparo et al., 2000; Übersicht bei Paul et al., 2006). Seine Bildung ist überwiegend von der Renin-Freisetzung und der davon bestimmten Reninaktivität im Plasma abhängig. Volumenmangel und die damit verbundene Abnahme des Perfusionsdrucks in den Vasa afferentia der Glomerula, niedrige Natriumspiegel im Plasma, eine hohe Natriumkonzentration im distalen Tubulus und der Sympathikus, direkt über β_1 -Rezeptoren, stimulieren die Renin-Freisetzung. Gehemmt wird sie unter anderem durch ANG II im Sinne eines negativen Feedbacks (Li et al., 2002).

ANG II wirkt über die Bindung an einen Rezeptor an der Zelloberfläche und die hierdurch in Gang gesetzte Signalkaskade. Es werden mit dem AT₁- und dem AT₂-Rezeptor zwei Subtypen unterschieden: Diese sind unterschiedlich im Gewebe verteilt. Beide Rezeptorsubtypen werden unter anderem in Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Nebenniere, Pankreas, Endothelzellen und Reproduktionstrakt adulter Organismen exprimiert, wenn auch das Verhältnis von AT₁- zu AT₂-Rezeptoren von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Zusätzlich wird der AT₂-Rezeptor in bestimmten fetalen Geweben gefunden (De Gasparo et al., 2000).

1.1.1 Periphere Wirkung

Die beiden Rezeptorsubtypen sind nicht nur unterschiedlich verteilt, sie variieren auch in ihren Funktionen.

Bei der Regulation des Wasser-Elektrolythaushalts, sowie des Blutdrucks, spielen in erster Linie die AT₁-Rezeptor-vermittelten Effekte eine Rolle (Unger et al., 1996). Zum einen erhöht sich der periphere Widerstand, und somit der Blutdruck, durch Vasokonstriktion. Zum anderen

bewirkt ANG II in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Aldosteron. Dieses wiederum erhöht in der Niere, über einen gesteigerten Einbau von Natriumkanälen und -transportern, die Wasserrückresorption, was zu einer Zunahme des Blutvolumens führt.

Weiterhin haben AT₁-Rezeptor-vermittelte Effekte Einfluss auf Wachstumsfaktoren, Thrombogenität, kardiales Remodeling nach einem Herzinfarkt, Arteriosklerose und Atherosklerose (De Gasparo et al., 2000; Ju H. et al., 1997; Paul et al., 2006; Schmidt-Ott et al., 2000; Wolf, 2000).

Den AT₂-Rezeptoren wird eine Bedeutung bei Entwicklungs-, Wachstums- und Differenzierungsprozessen fetaler Gewebe beigemessen (Grady et al., 1991). Die Stimulation von AT₂-Rezeptoren wirkt antiproliferativ und hemmt in den Gefäßen die Bildung einer Neointima (De Gasparo et al., 2000; Heeneman et al., 2007).

1.1.2 Wirkung im zentralen Nervensystem

Auch im ZNS ist das RAS von Bedeutung. Es ist unter anderem bei der zentralen Regulation des Wasser-Elektrolythaushalts und des Blutdrucks beteiligt. ANG II löst nicht nur Durst aus und erhöht den Blutdruck, sondern interagiert auch mit anderen Neurotransmittern und ist für die Ausschüttung verschiedener Hypophysenhormone, v.a. von Arginin-Vasopressin, verantwortlich (De Gasparo et al., 2000; Saavedra, 1992). Außerdem hat ANG II Auswirkungen auf kognitive Funktionen (Guimond und Gallo-Payet, 2012).

Im Experiment wird das zentrale RAS über die intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von ANG II stimuliert.

1.2 AT₁-Rezeptorantagonisten

In der Behandlung von Bluthochdruck oder auch Herzinsuffizienz kommen AT₁-Rezeptorantagonisten immer häufiger zum Einsatz. Wichtige Vertreter dieser Substanzklasse sind Candesartan, Telmisartan, Irbesartan und Losartan. Bei EXP 3174 handelt es sich um einen Metaboliten von Losartan, der in der Leber durch Carboxylierung entsteht. Sowohl Losartan, als auch EXP 3174, zu dem etwa 10% der Ausgangssubstanz metabolisiert werden, sind aktiv (De Gasparo et al., 2000). Alle AT₁-Rezeptorantagonisten weisen eine mindestens 1000-mal höhere Spezifität zum AT₁-Rezeptor als zum AT₂-Rezeptor auf (Michel et al., 2013).

Es handelt sich bei allen AT₁-Rezeptorantagonisten um kompetitive Hemmstoffe, dennoch unterscheidet man zusätzlich eine 'überwindbare' und eine 'nicht-überwindbare' Hemmung (Van Liefde und Vauquelin, 2009). Eine alleinige, parallele Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von ANG II durch AT₁-Rezeptorantagonisten, wie Losartan, wird als 'überwindbare' Hemmung bezeichnet. Die 'nicht-überwindbare' Hemmung wird u. a. auf eine lange Bindungsdauer und hohe Affinität zum AT₁-Rezeptor durch AT₁-Rezeptorantagonisten, wie Candesartan, zurückgeführt und ist durch eine alleinige Verminderung des Wirkungsmaximums gekennzeichnet. Zu den Hemmstoffen, die als 'nicht-überwindbar' gelten, zählen Candesartan und Telmisartan. Die Wirkung von Losartan wird als 'überwindbar' beschrieben. Bei Irbesartan und EXP 3174 handelt es sich um Mischformen (Maillard et al., 2002; Vanderheyden et al., 1999).

Des Weiteren unterscheiden sich die Substanzen stark in ihrer Fettlöslichkeit: Telmisartan, Irbesartan und Losartan zeichnen sich im Vergleich zu EXP 3174 und Candesartan durch eine höhere Fettlöslichkeit aus (Gohlke et al., 2001; Morsing et al., 1999).

Die AT₁-Rezeptorantagonisten wirken nicht nur peripher im Blutkreislauf, sondern hemmen auch die zentralen AT₁-Rezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass Candesartan nach intravenöser (i.v.) Applikation die AT₁-Rezeptoren im ZNS effektiv blockiert (Gohlke et al., 2002a). Analoge Ergebnisse wurden auch nach oraler Gabe von Candesartan erzielt (Gohlke et al., 2002b). Bei beiden Applikationsformen hielt die Blockade der zentralen AT₁-Rezeptoren je nach Dosierung bis zu 24h an. Die Dosis von Candesartan lag bei 10-20% der entsprechenden Dosis von Irbesartan und Losartan.

Auch Brolund (2008) konnte zeigen, dass Candesartan in geringer Dosis, in diesem Fall subkutan (s.c.) appliziert, die zentralen AT₁-Rezeptoren effektiv blockiert. So nahm hier die Trinkmenge, als Parameter für die Blockade der AT₁-Rezeptoren im ZNS, nach der Gabe von Candesartan stärker ab als nach der Gabe von Losartan beziehungsweise Irbesartan. Hinzu kommt, dass Candesartan zehnmal niedriger dosiert wurde als die beiden anderen AT₁-Rezeptorantagonisten.

Alles in allem scheint Candesartan in seiner zentralen Wirkung den anderen AT₁-Rezeptorantagonisten überlegen zu sein.

1.3 AT₁-Rezeptorantagonisten in der Schlaganfallforschung

Studien zufolge verringern AT₁-Rezeptorantagonisten das Infarktvolume und verbessern das neurologische Outcome (Culman et al., 2002). Dies wurde zunächst an Ratten untersucht, bei denen durch einen Verschluss der mittleren zerebralen Arterie ein Schlaganfall hervorgerufen wurde.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass Candesartan in einer niedrigen, den Blutdruck nicht senkenden, Dosierung das Infarktvolume signifikant reduziert, wenn es zeitnah, das bedeutet unmittelbar (Fu et al., 2011) beziehungsweise 3h (Brdon et al., 2007; Spaether, 2009), nach einem Schlaganfall appliziert wurde. Zusätzlich wurde unter diesen Applikationsbedingungen eine Verbesserung des neurologischen Outcome beobachtet. Hierbei wurde Candesartan systemisch appliziert (Brdon et al., 2007; Fu et al., 2011; Spaether, 2009). Analoge Ergebnisse existieren auch für Irbesartan, welches allerdings i.c.v. appliziert wurde (Lou et al., 2004). Nach s.c. Gabe hingegen hatte Irbesartan keinen Einfluss auf Infarktvolume und neurologisches Outcome (Spaether, 2009).

Wurde die Behandlung mit Candesartan erst 24h nach dem Schlaganfall begonnen, ließ sich keine Verbesserung des neurologischen Outcomes mehr feststellen (Brdon et al., 2007). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Engelhorn et al. (2004), die zeigen konnten, dass eine Behandlung mit Candesartan i.v. das neurologische Outcome signifikant verbesserte, auch wenn die Behandlung erst 24h nach dem Infarkt begonnen wurde. Zudem konnten eine Verbesserung des zerebralen Blutflusses sowie eine Abnahme der Größe des Infarktvolume beobachtet werden. Einen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck hatte Candesartan in dieser Dosis nicht. Auch in einer etwas höheren Dosierung von Candesartan, die den durch den Schlaganfall erhöhten Blutdruck wieder normalisierte, ließen sich noch positive Auswirkungen beobachten: Während sich das neurologische Outcome verbesserte, waren Infarktgröße und Ödemvolume signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Fagan et al., 2006). Diese positiven Effekte wies Candesartan jedoch nicht mehr auf, sobald die Dosierung so hoch gewählt wurde, dass der Blutdruck unter den Ausgangswert der Messungen vor dem Schlaganfall gesenkt wurde (Kozak et al., 2008).

Auch auf Patienten, die akut einen Schlaganfall erlitten haben, hat eine zeitnahe Gabe von Candesartan positive, von der Blutdrucksenkung unabhängige Auswirkungen. Dies spiegelt sich in einer verringerten Anzahl von beobachteten zerebro- und kardiovaskulären Ereignissen, sowie in einer Abnahme der Gesamtmortalität wider (Schrader et al., 2003).

Erwünscht ist bei dieser Patientengruppe die AT₁-Rezeptorantagonisten-vermittelte Wirkung im ZNS, während die, ebenfalls AT₁-Rezeptorantagonisten-vermittelte, systemische Blutdrucksenkung in den ersten Tagen nach einem Schlaganfall therapeutisch nicht gewollt ist. Es wird sogar ein etwas erhöhter Blutdruck benötigt, um die Durchblutung der Penumbra aufrechtzuerhalten, da hier die Autoregulation des Blutdrucks beeinträchtigt ist und somit die Durchblutung der Penumbra vom mittleren arteriellen Druck abhängt. Ein zu niedriger Blutdruck in der Akutphase kann sogar dazu führen, dass die Infarktgröße zunimmt (Eames et al., 2002). Außerdem könnte eine frühe Blutdrucksenkung bei Schlaganfallpatienten im Akutstadium mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergehen (Wang et al., 2014). Daher soll in den ersten Tagen nach dem Schlaganfall laut aktueller Leitlinie der Blutdruck im leicht hypertensiven Bereich gehalten werden (Veltkamp, 2012).

1.4 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke

Eine der Aufgaben der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und der Blut-Liquor-Schranke ist es, das sensible ZNS vor äußeren Einflüssen zu schützen und das interne Milieu aufrechtzuerhalten. Dafür sind Blutgefäße und Interstitium des Gehirns konsequent voneinander getrennt. Hierbei sind vor allem die nicht-fenestrierten Endothelzellen, welche mit tight-junctions untereinander verbundenen sind, von funktioneller Bedeutung (Hawkins und Davis, 2005). Die gleiche Funktion übernehmen die tight-junctions auch im Plexus choroideus (Schroten et al., 2012).

Trotz dieser Schutzfunktion muss die BHS auch den Stoffaustausch zwischen Blut und ZNS zulassen, damit das Gehirn mit ausreichend Nährstoffen, wie Glukose, Sauerstoff und Aminosäuren, versorgt werden kann. Es existieren mehrere Möglichkeiten, die BHS zu überwinden: Kleine lipophile Moleküle und Gase können durch passive Diffusion in das Gehirn gelangen. Kleine polare Moleküle, wie Glukose, Aminosäuren, organische An- und Kationen, sowie Nucleoside, können die BHS mittels Transportern überwinden; hierzu werden unter anderem der Glukose-Transporter 1, der Monocarboxylat-Transporter 1 und der L-Typ Aminosäure-Transporter 1 gezählt. Große Substanzen, wie Proteine und Peptide, nutzen ebenfalls Transporter (Wong et al., 2013).

Die Penetrationsfähigkeit einer Substanz ins ZNS ist in erster Linie von ihrer Fettlöslichkeit abhängig. Mehrere Studien zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, als Index für Fettlöslichkeit, und der Penetrationsfähigkeit (Übersicht bei Saunders et al., 1999). Bis zu einer molekularen Masse von 700Da erhöht sich mit

zunehmender Fettlöslichkeit die Permeabilität (Levin, 1980; Pardridge, 1993). Bei Substanzen geringer Fettlöslichkeit hängt die Permeabilität von der Größe, sprich Masse der jeweiligen Moleküle ab. Ab einer Masse von 5000Da können diese nicht mehr mittels Diffusion ins Gehirn gelangen; sie sind auf Transporter angewiesen (Saunders et al., 1999).

Um den passiven Transport zu regulieren, befördern Effluxpumpen viele unerwünschte Moleküle wieder zurück in den Blutkreislauf (Wong et al., 2013). Zu diesen auswärtsgerichteten Transportern gehören unter anderem das P-Glykoprotein (Pgp), sowie das Multidrug-Resistance-Protein (MRP) 2 (Abbott et al., 2010; Saunders et al., 1999; Wong et al., 2013).

MRP2 gehört der Familie der ATP-binding-cassette Transporter an und ist aus mehreren Transmembranproteinen zusammengesetzt. Es wird hauptsächlich in Leber, Niere und Darm (Borst et al., 2000), aber auch an der BHS exprimiert. Dort ist MRP2 an der basolateralen, luminalen Seite der Endothelzellen lokalisiert. Unter Verbrauch von ATP ist es in der Lage, bestimmte Substanzen aus der Zelle herauszupumpen (Girardin, 2006; Lautier et al., 1996). Dieser Transporter lässt sich durch das Urikosurikum Probenecid hemmen (Bakos et al., 2000; Potschka et al., 2003).

In Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe führte Prof. Fricker In-vitro-Versuche durch und konnte zeigen, dass Telmisartan ein Substrat von MRP2 ist. Candesartan, Irbesartan und Losartan wurden diesbezüglich ebenfalls untersucht, konnten jedoch nicht als Substrat von MRP2 identifiziert werden (G. Fricker, unveröffentlichte Befunde).

Im Experiment wird MRP2 über die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Probenecid gehemmt.

1.5 Fragestellung

Auf Ratten, bei denen ein Schlaganfall hervorgerufen wurde, hat die zeitnahe Gabe von niedrig dosiertem, systemisch appliziertem Candesartan eine positive, im ZNS lokalisierte Wirkung. Dies äußert sich in einer Reduzierung des Schlaganfallvolumens und in einer Verbesserung des neurologischen Outcomes (Brdon et al., 2007; Culman et al., 2002; Fu et al., 2011). Wie bereits am Beispiel von Irbesartan beschrieben, wirkt dieser AT₁-Rezeptorantagonist nur dann im ZNS, wenn er i.c.v., nicht jedoch, wenn er systemisch appliziert wird (Lou et al., 2004; Spaether, 2009). Erst in einer sehr hohen Dosis von 30mg/kgKG wirkt Irbesartan, genauso wie Losartan, auch bei systemischer Applikation zentral (Brolund, 2008). In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass systemisch appliziertes Candesartan die zentralen AT₁-Rezeptoren in einer Dosis von 3mg/kgKG effektiver blockiert als Irbesartan und Losartan in der Dosis von

30mg/kgKG. Auch weitere Studien zeigen eine effektive, lang anhaltende Blockade zentraler AT₁-Rezeptoren durch systemisch appliziertes, niedrig dosiertes Candesartan (Gohlke et al., 2002a, b).

Eine Erklärungsmöglichkeit für die, im Vergleich zu anderen AT₁-Rezeptorantagonisten, gute zentrale Wirksamkeit von niedrig dosiertem, systemisch appliziertem Candesartan könnte in der Existenz von Transportern an der BHS bestehen, die die anderen AT₁-Rezeptorantagonisten wieder zurück aus dem ZNS in den Blutkreislauf bringen. In-vitro wurde bereits der AT₁-Rezeptorantagonist Telmisartan als Substrat von MRP2 identifiziert (G. Fricker, unveröffentlichte Befunde).

Warum wirken die AT₁-Rezeptorantagonisten Irbesartan und Losartan in geringer Dosierung nach systemischer Gabe nicht zentral, während gerade Candesartan genau dies vermag? Besteht ein möglicher Grund dafür darin, dass manche AT₁-Rezeptorantagonisten aktiv aus dem ZNS gepumpt werden?

Zu diesem Zweck wird der an der BHS lokalisierte Transporter MRP2 betrachtet. Es soll untersucht werden, ob, und wenn ja wie und wie stark, eine Hemmung von MRP2 durch Probenecid den Transport von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beeinflusst.

Erkenntnisse auf diesem Gebiet wären für Schlaganfallpatienten von Nutzen. Diese könnten von den positiven, im ZNS stattfindenden Effekten systemisch applizierter AT₁-Rezeptorantagonisten profitieren, ohne von den Konsequenzen ihrer systemischen Wirkung beeinträchtigt zu werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Bei den verwendeten Tieren handelte sich um männliche Wistar Ratten aus der tierstalleigenen Zucht und von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Um konstante, gewichtsunabhängige Ergebnisse zu erzielen, wurden nur Tiere zwischen 300g und 400g verwendet. Diese wurden bis zum Beginn des Versuches zu jeweils 3 bis 4 Tieren in 100 x 30cm großen Käfigen, ab der Operation separiert in 20 x 26cm großen Käfigen gehalten. Auf diese Weise wurden die Ratten daran gehindert, die Implantate der anderen Tiere zu beschädigen.

Für ein konstantes Raumklima im Tierstall wurden folgende Werte zu Grunde gelegt:

- Temperatur: 20-24°C
- Lichtdauer: 12h (von 6-18 Uhr)
- relative Luftfeuchte: 55 ± 10%

Die Ratten bekamen Futter mittlerer Energiedichte und ausgewogener Nährstoffkonzentration (ssniff® R/M-H) sowie Trinkwasser zur ad-libitum-Aufnahme. Die Tierversuche wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume unter den Aktenzeichen V 312-72241.121-22 (23-2/10) und V 311-72241.121-22 (38-3/12) genehmigt.

2.2 Herstellung der Lösungen

2.2.1 Verwendung und Bezug der Medikamente und Lösungen

Die folgende Tabelle gibt sowohl Auskunft über den Verwendungszweck, als auch den Bezug der jeweiligen Substanzen.

Tabelle 1: Verwendung und Bezug der Medikamente und Lösungen

Medikament	Verwendung	Bezug
Chloralhydrat	Narkotikum	Ferak Berlin GmbH (Berlin, Deutschland)

Medikament	Verwendung	Bezug
Angiotensin II	AT ₁ -Rezeptoragonist	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Candesartan	AT ₁ -Rezeptorantagonist	AstraZeneca GmbH (Mölnal, Schweden)
Telmisartan	AT ₁ -Rezeptorantagonist	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim, Deutschland)
Irbesartan	AT ₁ -Rezeptorantagonist	Sanofi-Aventis (Paris, Frank- reich)
Losartan	AT ₁ -Rezeptorantagonist	MSD Sharp & Dohme GmbH (Haar, Deutschland)
Probenecid	MRP2-Hemmstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Heparin	Gerinnungshemmung	Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Spülflüssigkeit	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid 3%	Blutstillung	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.2.2 Ansatz der Lösungen

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

Angiotensin II: Der Peptidgehalt des verwendeten ANG II betrug 86%. Daher wurde 1mg ANG II in 0,86ml destilliertem Wasser gelöst. Von der so entstandenen Stammlösung der Konzentration 1mg/ml wurden je 10µl in mehrere Eppendorfgefäße pipettiert. Diese wurden vorher mit 0,1%iger Rinderalbuminlösung beschichtet, um eine Bindung zwischen ANG II und der Gefäßwand zu verhindern. Die mit ANG II befüllten Gefäße wurden bei -21°C im Gefrierschrank gelagert. Zur Injektion wurden 90µl isotone Kochsalzlösung zu dem aufgetauten ANG II hinzugegeben, sodass sich eine Konzentration von 100ng/µl ergab.

AT₁-Rezeptorantagonisten: Die AT₁-Rezeptorantagonisten wurden so dosiert, dass die ANG II-induzierte Trinkantwort etwa halbiert wurde. Es sollten sowohl weitere Abnahmen als auch andererseits Zunahmen der Trinkmenge messbar sein können. Denn zu diesem Zeitpunkt des Experiments war noch nicht absehbar, inwiefern die Interaktion mit Probenecid die Trinkantwort verändern würde.

Candesartan: Für eine Dosierung von 0,33mg/kgKG wurden 4mg Candesartan in 1ml 0,05n Natriumcarbonat-Lösung gelöst und 29ml 0,9%ige Kochsalzlösung zugegeben.

Telmisartan: Telmisartan wurde aufgrund der In-vitro-Ergebnisse, und der demzufolge erwarteten Interaktion mit Probenecid als MRP2-Hemmsstoff, in zwei verschiedenen Dosierungen appliziert, um einen möglichen Effekt auch in vivo messen zu können.

Die erste Dosierung betrug 1mg/kgKG. Hierfür wurden 40mg Telmisartan in 4ml 0,5mol/l Natronlauge gelöst, mit 0,5mol/l Salzsäure auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt und mit 0,5mol/l Natronlauge auf 10ml aufgefüllt. Um eine Konzentration von 0,4mg/ml zu erhalten, wurde im Verhältnis 1 zu 10 mit 0,5mol/l Natronlauge verdünnt.

Für die zweite Dosierung von 3mg/kgKG wurden 120mg Telmisartan in 4ml 0,5mol/l Natronlauge gelöst. Ansonsten wurde analog zur ersten Dosierung verfahren.

Irbesartan: Es wurde eine Dosierung von 30mg/kgKG verwendet. Zu diesem Zweck wurden 90mg Irbesartan in 7,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst. Durch das Hinzufügen eines Tropfens Natronlauge wurde die Lösung klar.

Losartan: Losartan wurde mit 10mg/kgKG dosiert. Dafür wurden 4mg Losartan in 1ml 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst.

Probenecid: Die Dosierung betrug 90mg/kgKG. Dafür wurden 36mg Probenecid in 1ml 2,15% Natriumcarbonat-Lösung gelöst.

Heparin: Eine 5ml-Ampulle Heparin, entsprechend 25.000 internationale Einheiten, wurde in 1l 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst.

2.3 Operative Verfahren

2.3.1 Narkose der Tiere

Vor der Operation wurden die Versuchstiere narkotisiert, indem eine 4%ige Chloralhydratlösung in einer Dosierung von 1ml/100gKG i.p. injiziert wurde. Hierzu wurden eine 5ml Spritze und eine 23G-Einmalkanüle (0,6 x 30mm) benutzt. Die Tiere wurden nach etwa 10 Min. bewusstlos. Da dieser Zustand für etwa eineinhalb Stunden anhielt, konnten die beiden im Folgenden beschriebenen Eingriffe während einer Narkose erfolgen.

2.3.2 Herstellung und Implantation einer intracerebroventrikulären Kanüle

Zur Implantation einer i.c.v.-Kanüle wurden nachstehende Materialien benötigt:

1. Rasierapparat
2. Stereotaktischer Apparat (Firma David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA)
3. Pinzette
4. Schere
5. Stieltupfer
6. Einmaltücher
7. 3%iges Wasserstoffperoxid
8. Sterilium®
9. 1ml Spritze
10. 5ml Spritze
11. Handbohrer (1,2mm Durchmesser)
12. zwei verzinkte Messingschrauben (3mm Länge, 1mm Gewindedurchmesser)
13. Uhrmacherschraubenzieher
14. 20G-Einmalkanüle (0,9 x 40mm)
15. 27G-Einmalkanüle (0,4 x 19mm)
16. 24G-Einmalkanüle (0,55 x 25mm)
17. Autopolymerisierender Kunststoff, bestehend aus Pulver und Flüssigkeit, TRIM (Bosworth Company, Skokie, Illinois, USA)
18. Gummitiegel

19. Filzstift
20. Skalpellklinge
21. Nadelhalter
22. Polyäthylenschlauch, Portex® Fine Bore Polythene Tubing (Innendurchmesser 0,38mm, Außendurchmesser 1,09mm) (Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent, Großbritannien)

2.3.2.1 Herstellung einer intracerebroventrikulären Kanüle

Zunächst wurde ein etwa 3-4cm langes Stück Polyäthylenschlauch abgeschnitten und auf die 27G-Einmalkanüle aufgefädelt. Im Luftstrom einer Heißluftdüse wurde der sich über der Mitte der Kanüle befindende Teil des Schlauches erhitzt, sodass er sich hier zu einer knotenartigen Verdickung zusammenschieben ließ. Durch die eingeführte Kanüle blieb die Durchgängigkeit des Schlauchlumens gewährleistet. Der Schlauch wurde so gekürzt, dass auf einer Seite der Verdickung 5mm verblieben und er eine Gesamtlänge von 20mm aufwies.

Der Schliff der 24G-Einmalkanüle wurde abgebrochen. Mit dieser nun stumpfen Einmalkanüle wurde der Schlauch am langen Ende geweitet, um das Verbinden mit dem Applikationssystem später, während des Versuchs, zu erleichtern. Die so entstandene i.c.v.-Kanüle wurde anschließend desinfiziert, um ein Einbringen von Keimen in das Gehirn der Ratten zu verhindern.

2.3.2.2 Implantation der intracerebroventrikulären Kanüle

Nachdem die Ratte narkotisiert worden war (vgl. 2.3.1), wurde das Fell über dem Kopf rasiert und die Ratte im stereotaktischen Apparat fixiert. Mit dem verstellbaren Klemmbügel wurde die Höhe so eingestellt, dass sich der Kopf in der Waagerechten befand.

Die Kopfhaut samt Galea aponeurotica wurde mittig zwischen Augen und Ohren angehoben und abgeschnitten, sodass eine runde Aussparung entstand. Die Blutstillung erfolgte durch das Aufbringen von Wasserstoffperoxid, welches mit einem Stieltupfer verrieben wurde. Überstehendes Bindegewebe wurde entfernt. Durch weiteres Reiben mit einem Stieltupfer wurden die Sutura coronalis und sagittalis sowie deren Schnittpunkt (Bregma) sichtbar. Dieser wurde als Ursprung eines imaginären Koordinatensystems benutzt, um den exakten Punkt zur Implantation der Kanüle zu finden.

Tabelle 2: Koordinaten zur Implantation einer i.c.v.-Kanüle (Paxinos und Watson, 1986)

Posterior (mm)	Lateral (mm)	Tiefe (mm)
0,6	1,3	5,0

In den feinjustierbaren Greifarm des stereotaktischen Apparats wurde eine 20G-Einmalkanüle eingeklemmt und auf das Bregma eingestellt. Von dort aus wurde die Kanüle mittels der Feinmechanik 1,3mm nach lateral und 0,6mm nach posterior versetzt. An dieser Stelle wurde mit der eingespannten Einmalkanüle durch Schädelknochen und harte Gehirnhaut gebohrt. Mit dem Handbohrer wurde das Loch aufgeweitet und die i.c.v.-Kanüle wurde mit der kurzen Seite voran eingeführt. Hierbei sorgte die knotige Verdickung dafür, dass sich das Ende der Kanüle nicht im Hirnparenchym befand, sondern in der Mitte des Seitenventrikels zu liegen kam.

Mit der 20G-Einmalkanüle wurden zwei weitere Löcher für die Schrauben gebohrt. Diese wurden so in der Schädeldecke verankert, dass sie die Kalotte nicht durchdrangen und das Gehirn nicht schädigten.

Um der i.c.v.-Kanüle sicheren Halt zu geben, wurde aus autopolymerisierendem Kunststoff eine Haube gegossen, die Kanüle, Schrauben und Knochen miteinander verband. Diese Haube diente gleichzeitig als Wundverschluss. Die zwei Komponenten des Kunststoffgemischs wurden in einem Gummitiegel zu einer leicht zähflüssigen Masse vermengt und in die Wunde gegossen. War diese vollständig gefüllt, wurde der Kunststoff glattgestrichen. Sobald der Kunststoff trocken war, konnte die Ratte auf der Haube nummeriert werden.

Die Operation dauerte in etwa 10-15 Min.. Die postoperative Erholungsphase endete nach fünf Tagen.

2.3.3 Anlage eines intravenösen Katheters

Zur Anlage eines i.v.-Katheters wurden folgende Materialien benötigt:

1. Rasierapparat
2. Operationsmikroskop M3Z (Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz)
3. Pinzette
4. spitze Pinzette
5. Spreizpinzette
6. Schere

7. Präparationsschere
8. Mikroschere
9. Feuerzeug
10. Polyäthylenschlauch, Portex® Fine Bore Polythene Tubing (Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,96mm) (Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent, Großbritannien)
11. Filzstift
12. Heparin
13. 5ml Spritze
14. 23G-Einmalkanüle (0,6 x 30mm)
15. stumpfe Nadel (etwa 20cm lang) mit einem großlumigen (mind. 2mm Innendurchmesser) ebenso langen Schlauch an deren Ende befestigt (institutseigene Konstruktion)
16. Klebeband
17. Fäden (2x ca. 10cm lang zum Abbinden der Vene, 2x ca. 15cm lang für die Hautnähte)
18. Nadelhalter
19. ledige, gebogene Nadel
20. Gefäßklemme
21. Betaisadona
22. Styroporunterlage

Ein etwa 20cm langes Stück des Polyäthylenschlauchs wurde blasenfrei mit Heparin gefüllt. Die hierfür benötigte Spritze blieb weiterhin mit dem Schlauch verbunden. An der anderen Seite erhielt der Schlauch nach 3cm eine farbige Markierung.

Der narkotisierten Ratte (vgl. 2.3.1) wurden Nacken und Leiste rasiert. Um ein sicheres Liegen auf dem Rücken zu gewährleisten, wurden Beine und Schwanz mit Klebeband auf einer Styroporunterlage fixiert. Die Leiste wurde longitudinal ca. 2cm eingeschnitten. Überstehendes Fett- und Bindegewebe wurde entfernt, bis, von innen nach außen, Femoralvene, -arterie und -nerv sichtbar wurden.

Zwecks detaillierter Darstellung der anatomischen Verhältnisse erfolgten die nachfolgenden Schritte unter operationsmikroskopischer Sicht.

Nachdem der Gefäß-Nervenstrang durch weiteres Präparieren dargestellt worden war, wurde die Vene über eine Länge von etwa 2 bis 3cm separiert. Mit einem Faden wurde die Vene distal mit einem einfachen Knoten abgebunden. Proximal wurde die Vene angeschlungen und mit einem Knoten versehen. Der Knoten wurde hier jedoch nicht zugezogen, sodass eine Schlaufe

um die Vene entstand. Der distale Faden wurde mit Klebeband straff an der Unterlage fixiert, der proximale mit einer Gefäßklemme festgehalten. Diese wurde so abgelegt, dass die Vene leicht gespannt war.

Mit der Mikroschere wurde die Vene im distalen Drittel quer eingeschnitten. Die so entstandene Öffnung wurde mit einer Spreizpinzette aufgeweitet, sodass der Schlauch bis zur 3cm-Markierung in das Gefäß hineingeschoben werden konnte. Um den Schlauch im Gefäß zu fixieren, wurde der proximale Knoten zugezogen und mit einem weiteren Knoten gesichert. Auch der distale Faden wurde um den Schlauch herumgelegt und festgeknotet. Um das korrekte Einliegen des Femoralkatheters zu überprüfen, wurde 1ml Heparinlösung injiziert. Trat nirgends Flüssigkeit aus, konnte die Spritze diskonnektiert werden. Das Ende des Schlauchs wurde zugeschweißt.

Der Femoralkatheter wurde in den Nacken gelegt, da die Ratte so nicht in der Lage war, den Katheter selbstständig zu entfernen. Um diesen in den Nacken führen zu können, wurde die Haut dort für 1cm eingeschnitten. Mit der stumpfen Nadel, an deren Ende ein großlumiger Schlauch befestigt war, wurde subkutan eine Verbindung von der Leiste zum Nacken geschaffen. Der Katheter wurde in den Schlauch vorgeschoben und die Nadel vorsichtig gezogen, bis der Katheter durch die Öffnung im Nacken trat. Um späteren Bewegungen der Ratte standhalten zu können, durfte der Katheter nicht unter Spannung stehen. Er wurde auf Höhe der Durchtrittsstelle fest mit Klebeband umwickelt. Dieses wurde mit einem Faden mehrfach umschlungen und so mit der Haut vernäht, dass der Katheter fixiert war und zugleich die Wundränder adaptierten. Das nuchal austretende Katheterende wurde auf eine Länge von etwa 6cm gekürzt und zugeschweißt.

Abschließend wurde die Leiste mit einer fortlaufenden Naht verschlossen und Betaisadona zur Wundversorgung aufgetragen.

Die Dauer der Operation betrug etwa 30 Min.. Eine postoperative Erholungsphase von einem Tag war ausreichend.

2.4 Herstellung der Applikationssysteme und Applikationstechniken

2.4.1 Intracerebroventrikuläre Applikation

Zur Herstellung eines i.c.v.-Applikationssystems wurden folgende Materialien benötigt:

1. 25µl Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)
2. 1ml Spritze
3. 23G-Einmalkanüle (0,6 x 30mm)
4. 24G-Einmalkanüle (0,55 x 25mm)
5. Polyäthylenschlauch, Portex® Fine Bore Polythene Tubing (Innendurchmesser 0,38mm, Außendurchmesser 1,09mm) (Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent, Großbritannien) ca. 40cm
6. Nadelhalter
7. isotone Kochsalzlösung
8. ANG II (vgl. 2.2)
9. Pinzette

Aus der 25µl Spritze, dem Polyäthylenschlauch und der 24G-Einmalkanüle, der Schliff und Aufsatz abgebrochen worden war, wurde ein Injektionssystem angefertigt. Mit Kochsalzlösung wurde dies luftblasenfrei befüllt. Dann wurden der Reihenfolge nach 6µl Kochsalzlösung, 0,5µl Luft, 1µl ANG II, 0,5µl Luft und zuletzt 1µl Kochsalzlösung aufgezogen. Die i.c.v.-Kanüle der Ratte und das Injektionssystem wurden miteinander verbunden. Binnen ca. 10 Sek. wurden ANG II, Luft und Kochsalzlösung gleichmäßig in den Seitenventrikel injiziert. Anhand des Vorkommens der Luftblasen wurde der Erfolg der Injektion sichtbar.

2.4.2 Intravenöse Applikation

Zur Herstellung eines i.v.-Applikationssystems wurden folgende Materialien benötigt:

1. 1ml Spritze
2. zwei 23G-Einmalkanülen (0,6 x 30mm)

3. Polyäthylenschlauch, Portex® Fine Bore Polythene Tubing (Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,96mm) (Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent, Großbritannien) ca. 40cm
4. Nadelhalter
5. Schere
6. Feuerzeug

Die beiden Kanülen, der Polyäthylenschlauch und die Spritze wurden zu einem Injektionssystem, ähnlich dem zur i.c.v.-Injektion, zusammengesetzt. Mit der zu verabreichenden Substanz wurden Spritze und Schlauch in entsprechender Menge luftblasenfrei befüllt. Am i.v.-Katheter der Ratte wurden die obersten Millimeter abgeschnitten und mit dem Injektionssystem verbunden. Nachdem das Medikament injiziert worden war, wurde die Verbindung zwischen den Schläuchen wieder gelöst und der Katheter mit dem Feuerzeug verschweißt.

2.5 Messverfahren

Zur Bestimmung der Trinkmenge wurden kleine Becher mit Leitungswasser befüllt und gewogen. Diese wurden nach der i.c.v.-Injektion von 100ng ANG II im Käfig platziert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Becher nicht von den Ratten umgeworfen werden konnten. Nach 20 Min. wurden die Trinkgefäße wieder entnommen und erneut gewogen. Aus der Gewichts-differenz der Becher vor und nach dem Trinkversuch ergab sich die aufgenommene Trinkmenge.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Zeitlicher Ablauf

Den Tieren wurden während einer einzigen Narkose sowohl eine i.c.v.-Kanüle als auch ein i.v.-Katheter implantiert. Während der darauffolgenden 5-tägigen postoperativen Erholungsphase wurde der i.v.-Katheter einmalig am dritten Tag postoperativ mit Heparin angespült. So wurde einem möglichen Verschluss durch gerinnendes Blut vorgebeugt.

Die basale Trinkmenge wurde am ersten Versuchstag, erhoben (vgl. 2.5). Tranken die Tiere mehr als 6ml Wasser, wurde die Kanülenposition als korrekt angesehen. Bei einer geringeren Trinkmenge wurde der Test wiederholt. Tranken die Tiere hierbei erneut weniger als 6ml Wasser, wurden sie vom Versuch ausgeschlossen. Ebenso wurden Tiere ausgeschlossen, die basal mehr als 20ml aufnahmen.

Am zweiten Versuchstag wurde die Trinkantwort nach Gabe der AT₁-Rezeptorantagonisten bestimmt. Eine halbe Stunde nach i.v.-Applikation des AT₁-Rezeptorantagonisten oder des entsprechenden Vehikels wurde das erste Mal die Trinkantwort gemessen; nach weiteren dreieinhalb Stunden das zweite Mal.

Die Tage 3 und 4 dienten als Auswaschphase für die am zweiten Versuchstag applizierten Medikamente.

Am fünften Tag erfolgte eine Stunde vor der Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten eine i.p.-Injektion des MRP2-Hemmstoffs Probenecid. Ansonsten wurde wie am zweiten Versuchstag verfahren.

Das nachstehende Versuchsprotokoll fasst den Ablauf zusammen.

Versuchsprotokoll

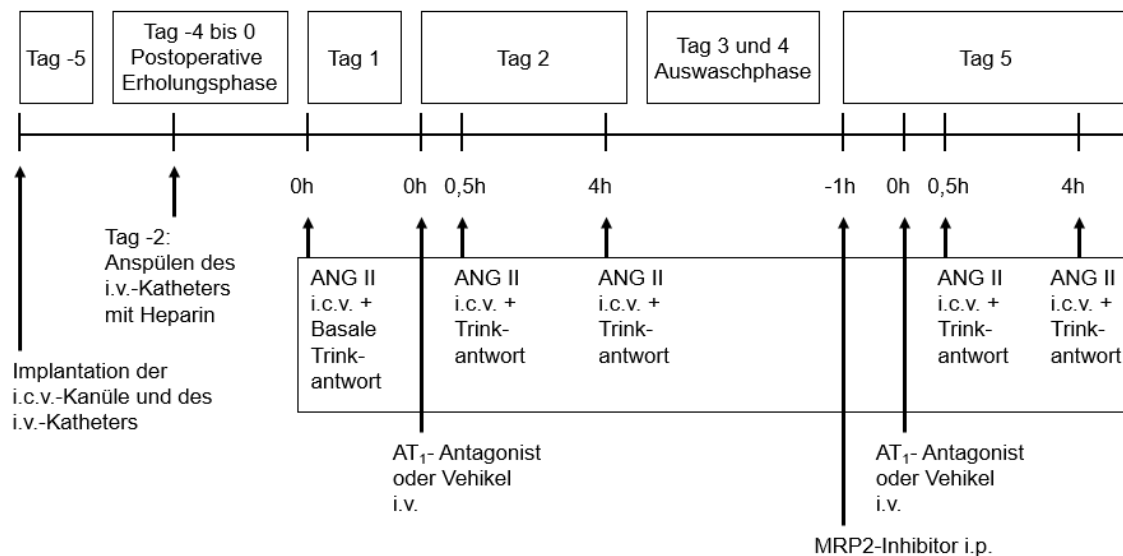


Abb. 1: Versuchsprotokoll

2.6.2 Gruppeneinteilung

Da vier AT₁-Rezeptorantagonisten appliziert wurden, davon Telmisartan in zwei unterschiedlichen Dosierungen, wurden insgesamt fünf Gruppen zu je 6-13 Ratten gebildet. Um auszuschließen, dass das jeweilige Lösungsmittel Einfluss auf die Trinkmenge hat, wurde für Candesartan und Telmisartan eine Kontrollgruppe gebildet. Bei Irbesartan und Losartan konnte auf die Bildung einer eigenen Kontrollgruppe verzichtet werden, da diese AT₁-Rezeptorantagonisten in isotoner Kochsalzlösung gelöst wurden. (vgl. 2.2.2).

Die Versuchsbedingungen und –abläufe waren für alle Gruppen identisch. Alle Tiere wurden gemäß dem obenstehenden Versuchsprotokoll behandelt.

Die nachstehende Tabelle gibt Aufschluss über die jeweilige Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung

Gruppe Behandlung	Anzahl der Tiere in der Experimentalgruppe	Anzahl der Tiere in der Kontrollgruppe
Candesartan (0,33mg/kgKG) und Probenecid (90mg/kgKG)	9	17
Telmisartan (1,0mg/kgKG) und Probenecid (90mg/kgKG)	13	
Telmisartan (3,0mg/kgKG) und Probenecid (90mg/kgKG)	9	
Irbesartan (30mg/kgKG) und Probenecid (90mg/kgKG)	6	
Losartan (10mg/kgKG) und Probenecid (90mg/kgKG)	6	

2.7 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte abgebildet. Die Effekte der AT₁-Rezeptorantagonisten, allein und in Kombination mit Probenecid, auf die Trinkmenge wurden durch Varianzanalyse wiederholter Messungen (analysis of variance), auf die ein post-

hoc test (Turkey) folgte, unter Zuhilfenahme der SYSTAT Software (Ludbrook, 1994) ausgewertet. Das Signifikanzniveau wird mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.8 Schwierigkeiten der Methode

2.8.1 Narkose mit Ketamin und Medetomidin

Es wurden 10%iges Ketamin in einer Dosierung von 60mg/kgKG und Medetomidin in einer Dosierung von 0,5mg/kgKG zeitgleich aus einer Mischspritze i.p. appliziert. Als Nachdosierung wurde ein Drittel der Initialdosis gegeben. Die zu erwartende Wirkdauer sollte drei Stunden betragen.

Die Wirkung hielt jedoch kaum eine halbe Stunde an, was entschieden zu kurz war, um eine Operation durchzuführen. Bei höherer Dosis oder erneuter Injektion starben die meisten Ratten. Die Mehrzahl der Ratten, bei denen die Wirkung dennoch für eine Operation anhielt, starb bei der zweiten Narkose. Ähnliche Probleme bestanden in einer anderen Arbeitsgruppe.

Außerdem verstärkt Medetomidin die Diurese (Burton et al., 1998) und wirkt somit auf den Wasserhaushalt der Tiere. Es war folglich nicht ausgeschlossen, dass durch diese Art der Narkose die in den Versuchen zu bestimmende Trinkmenge beeinflusst werden könnte. Dies war ein weiterer Grund, das Narkosemittel zu wechseln.

In Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten erfolgte der Wechsel zu Chloralhydrat, unter dessen Verwendung als Narkotikum keines dieser Probleme auftrat. Durch die narkosebedingten Schwierigkeiten kam es zu einer Verzögerung von etwa zwei Monaten.

2.8.2 Postoperative Sterblichkeit

Zu Beginn der Versuche zeigten postoperativ nahezu alle Tiere mindestens eins der folgenden Symptome, wenn auch zu verschiedenen Zeitpunkten: Die Augen der Tiere waren gerötet, eitrig oder verklebt. Ihr Fell wurde durch nachlassendes Putzverhalten ungepflegt, einige Ratten zitterten ohne sichtbare Ursache. Mehrere Tiere begruben sich unter Streu und Papier oder lagen teilnahmslos im Käfig. Manche bekamen Krampfanfälle, während andere morgens ohne ersichtlichen Grund tot im Käfig lagen.

Selten überlebte ein Tier die gesamte Versuchsdauer. Falls doch, wurden extrem vom Erwartungswert abweichende Trinkmengen gemessen. So tranken die Tiere teilweise 0ml, obwohl eine anschließend durchgeführte Obduktion die korrekte Lage der i.c.v.-Kanüle im Seitenventrikel bestätigte. Andere Ratten nahmen hingegen über 25ml Wasser zu sich.

Die so entstandenen Ausfallraten betragen nahezu 100%. Alle in diesem Zeitraum aufgezeichneten Ergebnisse wurden verworfen.

Klinisch zeigte sich das Bild einer Hirnhautentzündung. Dies bestätigte sich in mehreren Untersuchungen, die im Rahmen einer ausführlichen Fehlersuche durchgeführt wurden. Bei einer Untersuchung des Instituts für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurde eine hochgradige, eitrige Leptomeningitis und Enzephalitis nachgewiesen. Ursächlich war eine Kontamination des einliegenden Fremdmaterials durch *Escherichia coli*. Eine von Charles River Research Animal Diagnostic Services (MA, USA) durchgeführte Untersuchung bestätigte das Ergebnis. Daraufhin wurde sämtliches Operationsbesteck und alle verwendeten Materialien, inklusive Schrauben und Schläuche, ausgetauscht oder, falls dies nicht möglich war, gründlich desinfiziert. Jedes Medikament wurde neu angesetzt. Daraufhin sanken die Ausfallraten schlagartig auf wenige Prozent.

Die Methode erneut zu etablieren führte zu einer Verzögerung von etwa sechs Monaten.

3 Ergebnisse

3.1 Basale Trinkantwort und Kontrollgruppe

Die i.c.v.-Injektion von 100ng ANG II führte bei den Tieren zu einer Trinkantwort (vgl. 2.5). Innerhalb der jeweiligen Gruppen war die basale Trinkmenge mit etwa 12 bis 15ml ähnlich stark ausgeprägt (Abb. 2-7).

Die Gabe der Vehikel für Candesartan und Telmisartan i.v. zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Trinkantwort, weder eine halbe Stunde, noch vier Stunden nach Applikation des jeweiligen Vehikels. Ebenso wenig veränderte die zusätzliche Gabe von 90mg/kgKG Probenecid i.p., eine Stunde vor Applikation der Vehikel, die Trinkmenge signifikant (Abb. 2).

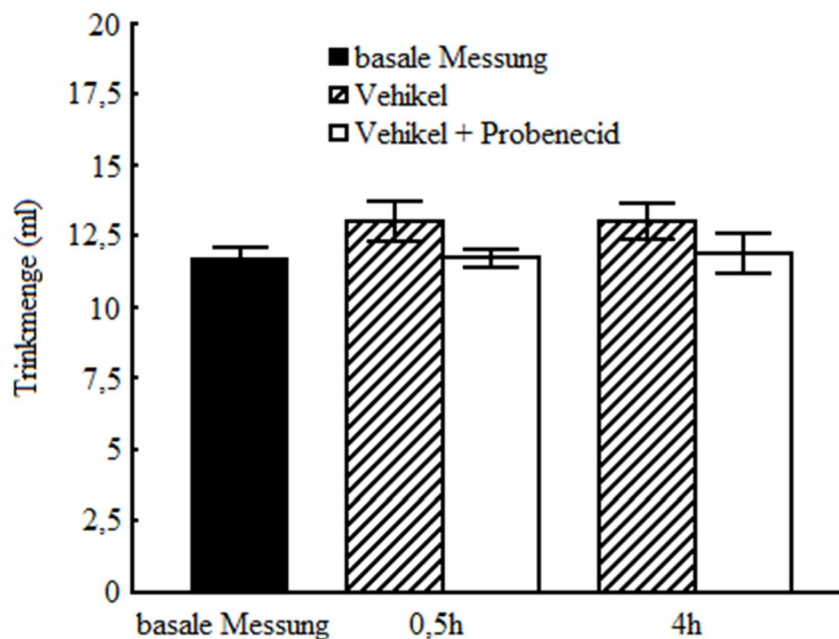


Abb. 2: Einfluss von i.v. appliziertem Vehikel bzw. Kombination aus Vehikel und Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation der Vehikel) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

3.2 Kombination von Candesartan und Probenecid

Die alleinige Gabe von 0,33mg/kgKG Candesartan i.v. bewirkte sowohl nach einer halben Stunde als auch nach vier Stunden eine signifikante Hemmung der Trinkantwort gegenüber der basalen Messung. Nach der zusätzlichen Applikation von 90mg/kgKG Probenecid i.p. ließ sich nach einer halben Stunde keine signifikante Veränderung der Trinkmenge mehr, verglichen mit der basalen Messung, feststellen. Erst nach vier Stunden wurde der Einfluss auf die Trinkantwort signifikant. Vergleicht man außerdem die Werte für Candesartan mit denen der Kombination aus Candesartan und Probenecid, lässt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied feststellen (Abb. 3).

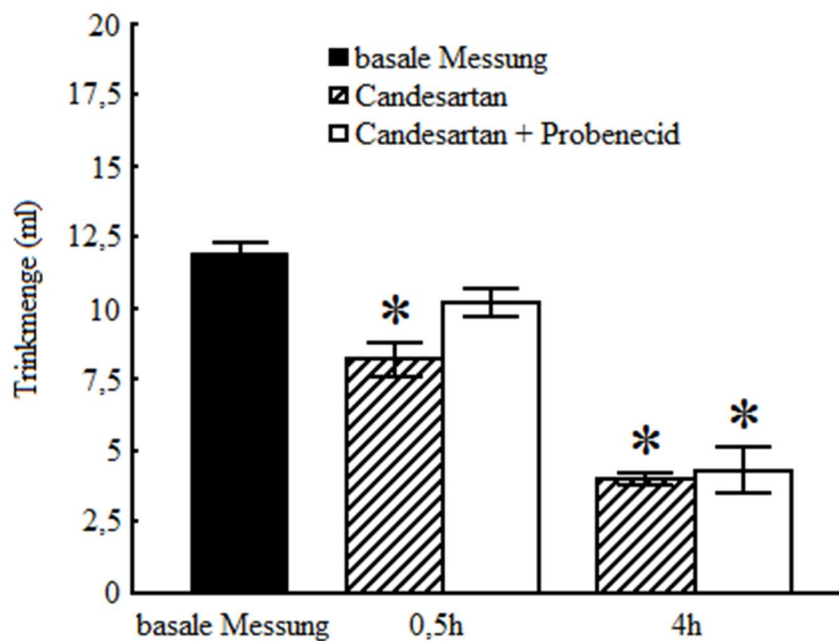


Abb. 3: Einfluss von i.v. appliziertem Candesartan (0,33mg/kgKG) allein und in Kombination mit Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation von Candesartan) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

* $p < 0,05$ vs. basal

3.3 Kombination von Irbesartan und Probenecid

Gegenüber der basalen Messung hemmte Irbesartan i.v. in einer Dosierung von 30mg/kgKG die Trinkantwort nach einer halben Stunde signifikant. Nach vier Stunden ließ dieser Effekt nach und die Trinkmenge stieg auf einen Wert an, der sich nicht signifikant von der basalen Messung unterschied. Die Kombination aus Irbesartan und Probenecid führte zu Ergebnissen, ähnlich denen für die alleinige Gabe von Irbesartan. Vergleicht man die Werte für Irbesartan mit denen der Kombination aus Irbesartan und Probenecid, lässt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied feststellen (Abb. 4).

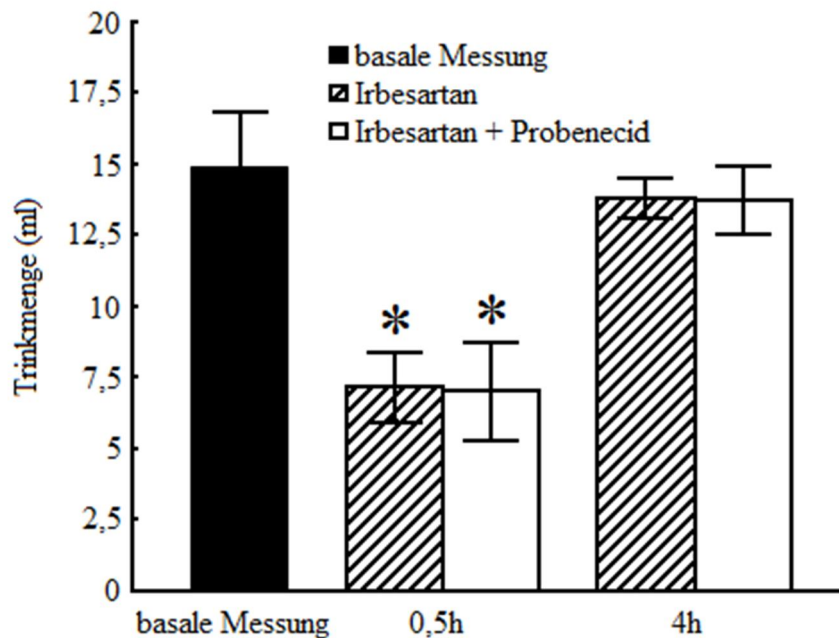


Abb. 4: Einfluss von i.v. appliziertem Irbesartan (30mg/kgKG) allein und in Kombination mit Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation von Irbesartan) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

* $p < 0,05$ vs. basal

3.4 Kombination von Losartan und Probenecid

Die alleinige Gabe von 10mg/kgKG Losartan i.v. zeigte sowohl nach einer halben Stunde, als auch nach vier Stunden eine signifikante Hemmung der Trinkantwort gegenüber der basalen Messung. Analoge Werte wurden für die Kombination von Losartan und Probenecid bestimmt. Die zusätzliche Applikation von Probenecid hatte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Trinkantwort, verglichen mit der alleinigen Gabe von Losartan (Abb. 5).

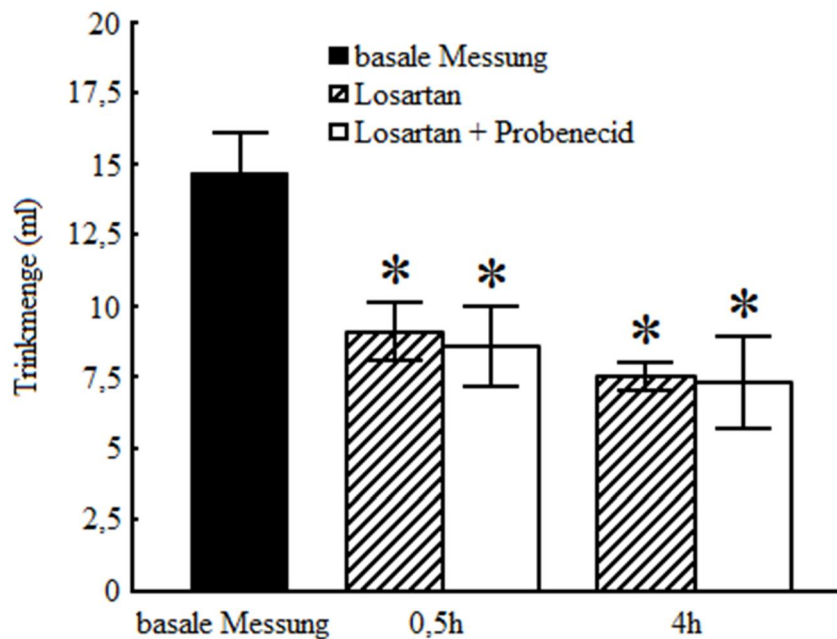


Abb. 5: Einfluss von i.v. appliziertem Losartan (10mg/kgKG) allein und in Kombination mit Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation von Losartan) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

* $p < 0,05$ vs. Basal

3.5 Kombination von Telmisartan und Probenecid

Telmisartan wurde aufgrund der bereits erwähnten In-vitro-Ergebnisse, und der demzufolge erwarteten Veränderung der Trinkantwort durch die zusätzliche Gabe von Probenecid, in zwei verschiedenen Dosierungen appliziert. Da die zusätzliche Applikation von Probenecid nur in Verbindung mit der Gabe von Telmisartan in der Dosierung von 1mg/kgKG einen signifikanten Einfluss auf die Trinkmenge hatte und Telmisartan die Trinkantwort in der Dosierung von

3mg/kgKG stärker und länger als in der Dosierung von 1mg/kgKG hemmte, werden die Ergebnisse für die unterschiedlichen Dosierungen von Telmisartan getrennt voneinander betrachtet.

3.5.1 Telmisartan 1mg/kgKG

Während die alleinige Applikation von 1mg/kgKG Telmisartan i.v. nach einer halben Stunde eine signifikante Hemmung der Trinkantwort gegenüber der basalen Messung bewirkte, ließ sich nach vier Stunden kein signifikanter Unterschied mehr feststellen. Bei der zusätzlichen Applikation von Probenecid nahm die Trinkmenge nach einer halben Stunde, im Vergleich zur basalen Messung, nicht signifikant ab. Die Trinkmenge nahm jedoch, verglichen mit dem Messwert zum gleichen Zeitpunkt bei alleiniger Gabe von Telmisartan, signifikant zu. Auf die Trinkmenge nach vier Stunden hatten weder die alleinige Gabe von Telmisartan, noch die zusätzliche Applikation von Probenecid einen signifikanten Einfluss. Auch konnte zwischen diesen beiden Trinkmengen kein signifikanter Unterschied mehr gemessen werden (Abb. 6).

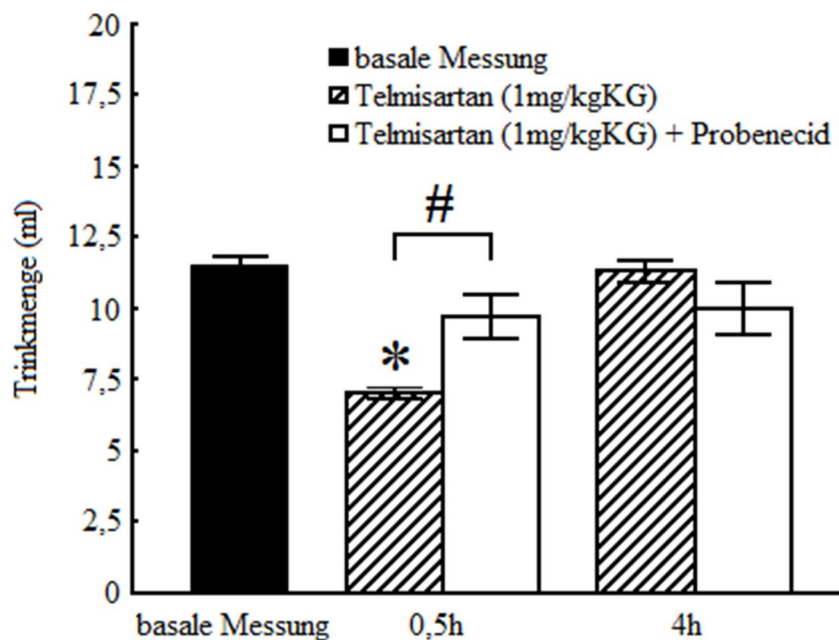


Abb. 6: Einfluss von i.v. appliziertem Telmisartan (1mg/kgKG) allein und in Kombination mit Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation von Telmisartan) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

* $p < 0,05$ vs. basal; # $p < 0,05$ vs. Telmisartan 0,5h

3.5.2 Telmisartan 3mg/kgKG

In einer Dosierung von 3mg/kgKG hemmte Telmisartan i.v. sowohl nach einer halben Stunde, als auch nach vier Stunden die Trinkantwort signifikant gegenüber der basalen Messung. Bei zusätzlicher Applikation von 90mg/kgKG Probenecid i.p., eine Stunde vor Gabe des Telmisartans, wurde die Trinkantwort zu beiden Zeitpunkten ebenfalls signifikant gehemmt. Die Trinkmengen nach alleiniger Gabe von Telmisartan und nach Applikation beider Medikamente unterschieden sich zu keiner Zeit signifikant (Abb. 7).

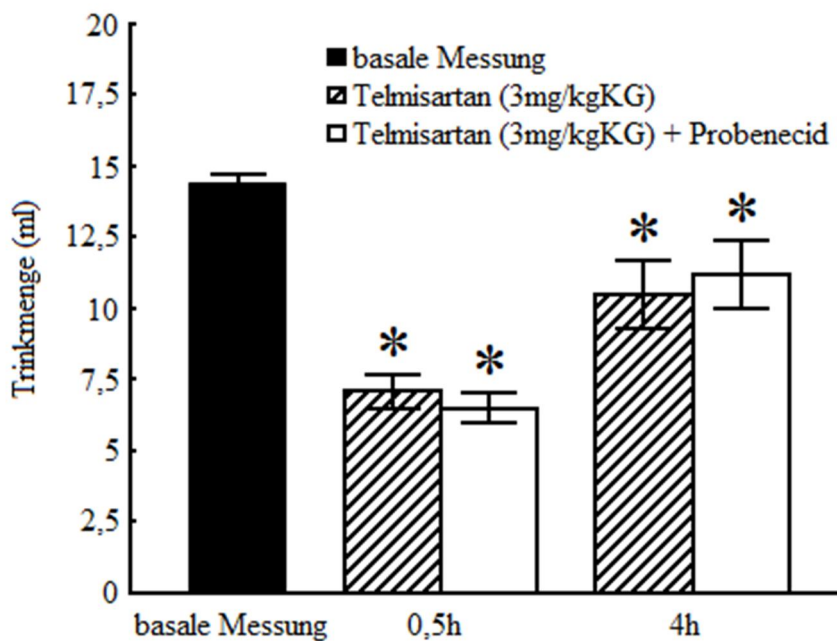


Abb. 7: Einfluss von i.v. appliziertem Telmisartan (3mg/kgKG) allein und in Kombination mit Probenecid (90mg/kgKG, i.p., 1h vor Applikation von Telmisartan) auf die Trinkmenge 0,5h und 4h nach i.c.v.-Injektion von ANG II.

* $p < 0,05$ vs. Basal

4 Diskussion

4.1 Transportervermittelte Effekte

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Probenecid signifikanten Einfluss auf die Trinkmenge nach Applikation von Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG hatte (vgl. Abb. 6). Der Einfluss auf die Trinkantwort kann nicht darauf zurückgeführt werden, dass die Gabe von Probenecid an sich die Trinkmenge verändert. Denn würde schon die alleinige Gabe von Probenecid die Trinkantwort verändern, hätte diese Veränderung in allen Gruppen, insbesondere in der Kontrollgruppe, gleichermaßen messbar sein müssen (vgl. Abb. 2-7). Weiterhin kann der Einfluss von Probenecid auf die Trinkantwort nicht dadurch begründet werden, dass Probenecid den Metabolismus von Telmisartan beeinflusst, denn die P450-Enzyme sind am Abbau von Telmisartan nicht beteiligt (Michel et al., 2013). Ein möglicher Einfluss von Probenecid auf diese Enzyme, sei er inhibierend oder induzierend, bliebe also ohne Konsequenzen für die Plasmakonzentration von Telmisartan. Ebenso wenig werden andere Medikamenteninteraktionen zwischen Telmisartan und Probenecid beschrieben, die für die veränderte Wirkung von Telmisartan, nach zusätzlicher Gabe von Probenecid, verantwortlich gemacht werden könnten. Folglich muss die Veränderung der Trinkantwort 0,5h nach der Gabe von Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG darauf zurückzuführen sein, dass Probenecid einen Transporter beeinflusst.

Allerdings widerspricht das Ergebnis den vor dem Experiment angestellten Überlegungen, denn der zu erwartende Effekt, der durch die zusätzliche Applikation von Probenecid hervorgerufen werden sollte, blieb aus. Erwartet wurde eine Abnahme der Trinkmenge: In-vitro konnte Telmisartan als Substrat von MRP2 identifiziert werden (G. Fricker, unveröffentlichte Befunde). Wird MRP2 durch Probenecid gehemmt, müsste demzufolge Telmisartan vermehrt im ZNS bleiben und somit die Trinkmenge stärker abnehmen als nach alleiniger Applikation von Telmisartan. Die Trinkmenge nahm jedoch, im Fall von Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG, 0,5h nach dessen Applikation, entgegen jeder Erwartung, signifikant zu (Abb. 6), während bei den anderen Versuchsreihen zum gleichen Zeitpunkt keine signifikante Veränderung durch die zusätzliche Gabe von Probenecid der Trinkmenge festgestellt werden konnte (Abb. 2-5 & 7). Da die Zunahme der Trinkmenge der vor dem Experiment aufgestellten Theorie widerspricht, scheint ein MRP2-vermittelter Effekt nicht an der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt zu sein.

Möglicherweise liegt der Zunahme der Trinkmenge trotzdem ein transportervermittelter Effekt zugrunde. Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass Probenecid einen anderen Transporter an der BHS induziert. Dieser pumpt dann Telmisartan verstärkt aus dem ZNS, was folglich zu einem Wiederanstieg der Trinkmenge führt. Dass Probenecid Transportersysteme nicht nur hemmt, sondern auch in der Lage ist, verschiedene Transporter, wie z.B. Pgp, zu induzieren, wird wiederkehrend beschrieben (Gant et al., 1995; Robertson et al., 2012). Ebenso stellt die Interaktion zwischen Telmisartan und Transporterproteinen ein Forschungsgebiet dar. Zum einen wurde Telmisartan als Inhibitor, sowohl von Pgp als auch von MRP2, identifiziert (Weiss et al., 2010). Zum anderen zeigten In-vitro-Versuche, dass Telmisartan ein Substrat von Pgp ist (Chang et al., 2006). Dies unterstützt die Theorie, dass ein durch Probenecid induzierter Transporter, wie z.B. Pgp, vermehrt Telmisartan aus dem ZNS pumpt und erklärt somit, warum die Trinkmenge, verglichen mit der alleinigen Gabe von Telmisartan, wieder zunahm (vgl. Abb. 6). Aber auch andere Transporter, wie Multidrug-Resistance 1, das organic anion transporting polypeptide 1B3, ein Transporter in der Leber, und sogar MRP2, sind an der Verteilung von Telmisartan beteiligt, wobei jedoch nur ein Abbauprodukt von Telmisartan, nicht Telmisartan selbst, über MRP2 in die Galle gelangt (Ishiguro et al., 2006, 2008; Nishino et al., 2000). Telmisartan wurde in diesen Experimenten also nicht als Substrat von MRP2 identifiziert.

Die zusätzliche Applikation von Probenecid rief bei Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG eine signifikante Zunahme der Trinkmenge hervor (Abb. 6). Dieser Effekt sollte sich auch bei Telmisartan in der Dosis von 3mg/kgKG messen lassen, doch ließ sich hier keine signifikante Veränderung zwischen alleiniger Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten und der zusätzlichen Gabe von Probenecid feststellen (Abb. 7). Vermutlich ist die alleinige Wirkung von Telmisartan so ausgeprägt, dass transportervermittelte Effekte nicht mehr messbar waren.

Ein weiteres Indiz dafür, dass Probenecid einen Transporter induziert, ist die Art und Weise, wie die zusätzliche Gabe von Probenecid die Trinkantwort 0,5h nach der Applikation von Candesartan veränderte (vgl. Abb. 3). Verglichen mit der alleinigen Gabe von Candesartan, führte zu diesem Zeitpunkt die zusätzliche Gabe von Probenecid zu einer Zunahme der Trinkmenge, ähnlich wie bei Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG (vgl. Abb. 6). Allerdings war bei Candesartan diese Zunahme nicht signifikant. Es handelt sich tendenziell jedoch um ähnliche Effekte (vgl. Abb. 3 & 6). Diese Erklärungsmöglichkeit wird dadurch gestützt, dass Candesartan als Substrat von Pgp identifiziert wurde (Zhou et al., 2009).

Der Transport von AT₁-Rezeptorantagonisten ist auch Gegenstand der Forschung einer weiteren Arbeitsgruppe. So fanden Soldner et al. (2000) heraus, dass Losartan von Pgp, aber nicht von MRP1 und MRP2, transportiert wird. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten

keine signifikante Abnahme der Trinkmenge durch die zusätzliche Applikation von Probenecid (vgl. Abb. 5) und bekräftigen somit, dass MRP2 keinen Einfluss auf den Transport von Losartan hat. Andererseits kam es durch die zusätzliche Applikation von Probenecid auch zu keiner Zunahme der Trinkmenge, was die Theorie unterstützt hätte, dass durch Probenecid induziertes Pgp vermehrt AT₁-Rezeptorantagonisten aus dem ZNS pumpt.

Ebenso führte die zusätzliche Applikation von Probenecid bei Irbesartan zu keiner signifikanten Abnahme der Trinkantwort (vgl. Abb. 4). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass ein aktiver, MRP2-vermittelter Auswärtstransport nicht für die, im Vergleich zu Irbesartan, effektivere zentrale Wirkung von Candesartan verantwortlich ist.

Mit der Theorie, transportervermittelte Effekte seien an der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt, lässt sich nicht erklären, warum Candesartan, in seiner Fähigkeit zentrale AT₁-Rezeptoren effektiv zu blockieren, anderen AT₁-Rezeptorantagonisten, wie Losartan und Irbesartan, überlegen ist. Der Grund für die wesentlich niedrigere Dosierung von Candesartan kann nicht auf den Einfluss von MRP2 auf den Transport von Losartan und Irbesartan über die BHS zurückgeführt werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen nicht, schließen allerdings auch nicht aus, dass transportervermittelte Effekte an der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt sind. So können neben MRP2 auch andere Transporter, wie das bereits erwähnte Pgp, beteiligt sein; diese gilt es noch eingehend zu untersuchen.

Im Folgenden werden andere Erklärungsmodelle für die bessere Wirksamkeit von Candesartan betrachtet.

4.2 Substanzspezifische Fettlöslichkeit

Eine Voraussetzung für die Blockade zentraler AT₁-Rezeptoren durch systemisch applizierte AT₁-Rezeptorantagonisten ist ihre Fähigkeit die BHS zu überwinden, wobei, wie bereits beschrieben, die Penetrationsfähigkeit einer Substanz ins ZNS in erster Linie von ihrer Fettlöslichkeit abhängig ist (vgl. 1.4; Levin, 1980; Pardridge, 1993; Saunders et al., 1999). Die verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten unterscheiden sich stark in ihrer Fettlöslichkeit: Telmisartan, Irbesartan und Losartan zeichnen sich im Vergleich zu EXP 3174 und Candesartan durch eine höhere Fettlöslichkeit aus (Gohlke et al., 2001; Morsing et al., 1999). Als Indikator für die Fettlöslichkeit dient der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient. Einen Überblick gibt die nachstehende Tabelle.

Tabelle 4: Fettlöslichkeit der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten (Zahlen nach Gohlke et al., 2001; Morsing et al., 1999)

Substanz	Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient bei einem pH-Wert von 7,4
Telmisartan	1,9
Irbesartan	1,0
Losartan	0,8
EXP 3174	-1,6
Candesartan	-1,7

Betrachtet man den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten als Maß für die Fettlöslichkeit und daraus folgend als Maß für die Penetrationsfähigkeit, müssten die lipophilen AT₁-Rezeptorantagonisten die BHS besser überwinden können als die hydrophilen.

In der experimentellen Praxis zeigte sich jedoch, dass EXP 3174 die zentralen AT₁-Rezeptoren besser blockierte als die Ausgangssubstanz Losartan (Polidori et al., 1996). Ebenso blockierte Candesartan die zentralen AT₁-Rezeptoren schon bei zehnmal geringerer Dosierung effektiver als Losartan und Irbesartan (Brolund, 2008). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Candesartan im Vergleich wesentlich geringer dosiert werden kann als Losartan und Irbesartan, um die gleiche zentrale Wirksamkeit zu erreichen (vgl. 2.2.2; Abb. 3-5). Außerdem ist gerade Candesartan in der Lage, die Trinkantwort auch nach 4h noch signifikant zu hemmen (vgl. Abb. 3), während das lipophilere Irbesartan dies nicht vermag (vgl. Abb. 4). Dies spricht zusätzlich gegen die substanzspezifische Fettlöslichkeit als Erklärung für eine bessere zentrale Wirksamkeit.

Die zentralen AT₁-Rezeptoren werden auch 4h nach Gabe von Losartan noch signifikant gehemmt (vgl. Abb. 5). Bei der Betrachtung von Losartan muss jedoch bedacht werden, dass etwa 10% von Losartan zu EXP 3174 metabolisiert werden und EXP 3174 etwa zehnmal affiner zum AT₁-Rezeptor ist (De Gasparo et al., 2000). Allerdings weisen sie, mit 2h für Losartan und 6-9h für EXP 3174, unterschiedlich lange Plasmahalbwertszeiten auf (Timmermans, 1999). Daher kann die signifikante Abnahme der Trinkmenge 4h nach Gabe von Losartan größtenteils auf die Blockade der zentralen AT₁-Rezeptoren durch EXP 3174 zurückgeführt werden, also einen AT₁-Rezeptorantagonisten, der wiederum zu den hydrophileren seiner Art zählt. Hierbei kann außer Acht gelassen werden, dass die Umwandlung von Losartan zu EXP 3174 Zeit in An-

spruch nimmt, da die maximale Plasmakonzentration von EXP 3174 schon nach etwa 0,5h erreicht ist (Shimizu et al., 2012). Demnach ist zum Zeitpunkt der zweiten Messung nach 4h EXP 3174 schon in ausreichender Konzentration vorhanden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass gerade die hydrophileren AT₁-Rezeptorantagonisten die zentralen AT₁-Rezeptoren effektiver und länger blockieren als die lipophileren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass allein die lipophilen oder hydrophilen Eigenschaften der AT₁-Rezeptorantagonisten ihre unterschiedlich stark ausgeprägte zentrale Wirksamkeit nicht erklären. Es müssen also andere Gründe für die bessere Wirksamkeit von Candesartan vorliegen.

4.3 Interaktion zwischen AT₁-Rezeptorantagonisten und AT₁-Rezeptoren

4.3.1 Daten aus der Literatur zur Affinität und 'Überwindbarkeit'

Die Interaktion zwischen AT₁-Rezeptorantagonist und AT₁-Rezeptor ist Gegenstand der Forschung vieler Arbeitsgruppen. Allerdings unterscheidet sich die Art und Weise der Untersuchung und je nach Arbeitsgruppe werden unterschiedliche Parameter bestimmt: Rezeptoraffinität, Rezeptor off-rate, Dissoziationshalbwertszeit, Dissoziationskonstante, Inhibitionskonstante, Dissoziationsrate oder Dissoziationsratenkonstante. Die Vergleichbarkeit wird noch dadurch erschwert, dass nicht immer die gleichen AT₁-Rezeptorantagonisten untersucht werden. Zusätzlich werden unterschiedliche Methoden und Modellsysteme angewandt und die Parameter in Geweben verschiedener Tierarten erforscht, was dazu führt, dass für gleiche Medikamente und gleiche Parameter unterschiedliche Werte gemessen werden. Im Folgenden werden nur die Daten für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AT₁-Rezeptorantagonisten analysiert.

Um die Affinität der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten zum Rezeptor zu untersuchen, bestimmten zum einen Noda et al. (1993) bei Candesartan und zum anderen Wienen et al. (2000) bei Telmisartan die Inhibitionskonstante K_i und verglichen diese jeweils mit den Inhibitionskonstanten von Losartan und von EXP 3174. Daraus leiteten Noda et al. (1993) ab, dass die Affinität von Candesartan zum AT₁-Rezeptor 80-mal höher ist als die von Losartan und zehnmal höher als die von EXP 3174. Analog lässt sich auch aus den Daten von Wienen et al. (2000) die Affinität von Telmisartan zum AT₁-Rezeptor bestimmen: Telmisartan ist 6,4-mal affiner als Losartan und 2,8-mal affiner als EXP 3174.

Timmermans (1999) hingegen setzte die verschiedenen AT₁-Rezeptoraffinitäten in Relation zu Candesartan. Um jeweils die gleiche Anzahl an AT₁-Rezeptoren zu blockieren, müssen Telmisartan zehnmal, Losartan 50-mal, EXP 3174 zehnmal und Irbesartan fünfmal höher dosiert werden als Candesartan. Zusätzlich untersuchte Timmermans (1999) die AT₁-Rezeptor off-rate der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten und teilte sie in 'schnell' und 'langsam' ein. Seinen Befunden zufolge wiesen alle AT₁-Rezeptorantagonisten eine langsame Rezeptor off-rate auf. Nur Losartan, dessen Rezeptor off-rate als schnell beschrieben wurde, bildete hiervon eine Ausnahme. Andere Arbeitsgruppen wurden hier konkreter und gaben Halbwertszeiten für die Dissoziation der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten vom Rezeptor an. Einen Überblick gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 5: Dissoziationshalbwertszeiten der AT₁-Rezeptorantagonisten in Minuten

Candesartan	Telmisartan	EXP 3174	Losartan	Irbesartan	Referenz
133	213	81	67	-	Kakuta et al., 2005
112	75	-	-	-	Maillard et al., 2002
120	25	30	schnell	7	Van Liefde und Vauquelin, 2009
152	-	31	5,2	17	Vanderheyden et al., 2000
-	354	-	-	-	Wienen et al., 2000

-: von der jeweiligen AG nicht untersucht

Vauquelin et al. (2006) fassten bisherige Ergebnisse zur Wirksamkeit der jeweiligen AT₁-Rezeptorantagonisten zu folgender Reihenfolge zusammen: Candesartan > EXP 3174 > Irbesartan >> Losartan. Auch Van Liefde und Vauquelin (2009) brachten die AT₁-Rezeptorantagonisten in ihrer Übersichtsarbeit diesbezüglich in eine Reihenfolge: Candesartan > Telmisartan ≈ EXP 3174 > Irbesartan > Losartan.

Miura et al. (2013) untersuchten verschiedene AT₁-Rezeptorantagonisten auf molekularer Ebene, indem sie in ihren Experimenten einzelne Aminosäuren des AT₁-Rezeptors austauschten. Auf diesem Weg verglichen sie den 'wild-type' und verschiedene 'mutierte' Rezeptoren miteinander bezüglich der Dissoziationskonstante K_D , als Maß für die Bindungsaffinität der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten. Aus den Werten der Dissoziationskonstanten für den 'wild-type' AT₁-Rezeptor ließ sich folgende Reihenfolge für die Affinität ableiten: Irbesartan

> Candesartan > EXP 3174 > Telmisartan. Miura et al. (2013) schlussfolgerten, dass der geringfügige Unterschied in der Struktur der AT₁-Rezeptorantagonisten scheinbar entscheidend für die Bindung an den AT₁-Rezeptor ist.

Bindungsdauer und Affinität zum AT₁-Rezeptor haben außerdem Einfluss darauf, ob ein AT₁-Rezeptorantagonist ein 'überwindbarer' oder ein 'nicht-überwindbarer' Hemmstoff ist. Wie bereits erwähnt, wird die Hemmung von Candesartan und Telmisartan als 'nicht-überwindbar' und die Wirkung von Losartan als 'überwindbar' beschrieben. Bei Irbesartan und EXP 3174 handelt es sich um Mischformen (Maillard et al., 2002; Vanderheyden et al., 1999). Dies äußerte sich auch darin, inwieweit die jeweiligen AT₁-Rezeptorantagonisten in der Lage waren, das Wirkmaximum der Dosis-Wirkungskurve von ANG II zu vermindern. So verringerte sich dieses Wirkmaximum durch die Applikation von Irbesartan um 27%, durch EXP 3174 um 71% und durch Candesartan sogar um 94%, während für Losartan keine Verminderung feststellbar war (Vanderheyden et al., 2000). Telmisartan wurde von dieser Arbeitsgruppe diesbezüglich nicht untersucht, allerdings lässt sich bei Wienen et al. (2000) grafisch eine Verminderung des Wirkmaximums um ca. 55% ermitteln.

Im Rahmen ihrer Übersichtsarbeit werteten Michel et al. (2013) viele Studien zu AT₁-Rezeptorantagonisten aus. Durch die Analyse von über 70 Studien zu Bindungsstellen für Radioliganden kamen sie zu dem Ergebnis, dass alle AT₁-Rezeptorantagonisten eine ähnlich starke Affinität zum AT₁-Rezeptor aufweisen. Auch die Daten diverser Studien zur 'Überwindbarkeit' analysierten Michel et al. (2013), wonach Losartan der einzige 'überwindbare Hemmstoff' ist. Telmisartan, Candesartan, Irbesartan und EXP 3174 wurden als 'nicht-überwindbare' Hemmstoffe klassifiziert, weisen hierbei jedoch ein unterschiedliches Ausmaß auf. Insgesamt kamen Michel et al. (2013) zu dem Schluss, dass Unterschiede in der Fettlöslichkeit nur wenig zur Gewebepenetration beitragen würden und sich die AT₁-Rezeptorantagonisten auch bezüglich Rezeptoraffinität lediglich bis zu einer gewissen Grenze unterscheiden. Entscheidend ist laut Michel et al. (2013) jedoch, dass sich die AT₁-Rezeptorantagonisten erheblich in ihrer Dissoziationskinetik unterscheiden und dass genau dieser Umstand für die 'Überwindbarkeit' ihrer Wirkung und für die Wirkdauer relevant ist.

4.3.2 Inbezugsetzung der Ergebnisse zu den Daten aus der Literatur

Größtenteils stimmen die verschiedenen Studien in ihren Aussagen überein, teilweise lassen sich aber auch Widersprüche zwischen den Studien finden. So ist, schlussfolgernd aus den Daten von Miura et al. (2013), Timmermans (1999) und Wienen et al. (2000), die Affinität zum AT₁-Rezeptor von Telmisartan geringer, gleich oder größer als die von EXP 3174. Außerdem weist Irbesartan laut Miura et al. (2013) eine höhere Affinität als Candesartan auf, ein Ergebnis, das in dieser Form durch keine andere Arbeitsgemeinschaft beschrieben wird. Auch die Dissoziationshalbwertszeiten weichen teilweise, bei Telmisartan enorm, voneinander ab (vgl. Tab. 5). Durch diese widersprüchliche Datenlage gestaltet es sich schwierig, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Beziehung zu den Daten in der Literatur zu setzen.

Viele der aufgeführten Studien zeigen, dass Candesartan eine der höchsten Affinitäten zum AT₁-Rezeptor besitzt, eine der Substanzen ist, die am längsten am Rezeptor bindet und somit ein 'nicht-überwindbarer' Hemmstoff ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und liefert eine Erklärung, warum Candesartan schon gering dosiert die zentralen AT₁-Rezeptoren lang anhaltend blockiert (vgl. Abb. 3) und warum Candesartan, um die gleiche zentrale Wirkung zu erreichen, bis zu 100-mal geringer dosiert werden kann als andere AT₁-Rezeptorantagonisten. Einzig bei Candesartan wird nach 4h die Hemmung noch stärker als nach 0,5h (vgl. Abb. 3-7), was mit einer, im Vergleich zu den anderen AT₁-Rezeptorantagonisten, deutlich längeren Dissoziationshalbwertszeit im Einklang steht (vgl. Tab. 5). Ebenso kann durch die Angaben in der Literatur begründet werden, warum Telmisartan die zentralen AT₁-Rezeptoren in drei- bis zehnmal geringerer Dosis als Losartan blockiert (vgl. Abb. 5-7).

Allerdings lässt sich allein durch die Datenlage zur Affinität nicht erklären, warum Irbesartan erst dreimal höher dosiert als Losartan die Trinkantwort gleichwertig hemmt (vgl. Abb. 4 & 5). Dies steht klar im Widerspruch dazu, dass Irbesartan zehnmal affiner als Losartan und doppelt so affin wie EXP 3174 ist (Miura et al., 2013; Timmermans, 1999), welches hauptsächlich für die Hemmung der Trinkantwort 4h nach Gabe von Losartan verantwortlich ist (vgl. 4.2). Die maximale Plasmakonzentration von EXP 3174 ist, wie bereits erwähnt, schon nach etwa 0,5h erreicht (Shimizu et al., 2012). Somit erklärt auch die zeitliche Verzögerung, bedingt durch die Umwandlung von Losartan in EXP 3174, nicht die, verglichen mit Irbesartan, länger anhaltende Wirkung von Losartan respektive EXP 3174. Allerdings weist EXP 3174 im Vergleich zu Irbesartan eine längere Dissoziationshalbwertszeit auf, bindet also länger am AT₁-Rezeptor (vgl. Tab. 5; Van Liefde und Vauquelin, 2009; Vanderheyden et al., 2000). Dies könnte zum einen

begründen, warum Losartan geringer dosiert werden muss als Irbesartan und zum anderen, warum die Trinkantwort nach 4h durch Losartan immer noch signifikant gehemmt wird, während bei Irbesartan keine Hemmung der Trinkantwort mehr messbar ist (vgl. Abb. 4 & 5).

Die Plasmahalbwertszeiten aller in den vorliegenden Untersuchungen applizierten AT₁-Rezeptorantagonisten, mit Ausnahme von Losartan, dafür aber von EXP 3174, sind so lang, dass sie keinen Einfluss darauf haben, ob 4h nach Applikation noch genug Wirkstoff vorhanden ist, um die Rezeptoren zu hemmen (Timmermans, 1999). Somit erklären auch die Plasmahalbwertszeiten die, je nach AT₁-Rezeptorantagonist, unterschiedlich lang anhaltende Hemmung der Trinkantwort nicht.

Die überlegene Wirkung von Candesartan ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl auf eine hohe Affinität zum Rezeptor als auch auf eine lange Dissoziationshalbwertszeit zurückzuführen, welche beide dazu beitragen, dass die Hemmung durch Candesartan 'nicht-überwindbar' ist.

4.4 Klinische Relevanz des Forschungsgebiets

Damit bestimmte Wirkstoffe vermehrt im ZNS wirken, kann es sinnvoll sein, Transporter an der BHS zu hemmen. Dies konnten Potschka et al. (2003) anhand von Antiepileptika und dem Transporterprotein MRP2 im Tiermodell zeigen. Ebenso wird daran geforscht, durch Inhibition von Pgp bestimmte antiretrovirale Medikamente verstärkt ins ZNS zu befördern (Robillard et al., 2014). Da dieser Ansatz erfolgversprechend zu sein scheint, wäre es wünschenswert, wenn er auch Anwendung in der Akuttherapie von Schlaganfallpatienten finden würde.

Bis heute haben viele Studien gezeigt, dass das RAS in der Pathogenese des Schlaganfalls von Bedeutung ist (Dai et al., 1999; Lee et al., 2012; Walther et al., 2002). Rekapitulierend kann festgehalten werden, dass nach einem Schlaganfall die zeitnahe Blockade zentraler AT₁-Rezeptoren zu einem verringerten Infarktvolume und verbesserten neurologischen Outcome führt (Brdon et al., 2007; Culman et al., 2002; Fu et al., 2011; Spaether, 2009). Allerdings erhält man diesen Nutzen nur, wenn im akuten Geschehen eine Blutdrucksenkung, welche die Gabe von AT₁-Rezeptorantagonisten meist mit sich bringt, und die damit einhergehenden Folgen vermieden werden. Zu diesen Folgen gehören die Zunahme der Infarktgröße (Eames et al., 2002) und möglicherweise eine Zunahme der Sterblichkeit (Wang et al., 2014). Dies zu vermeiden wäre auf zwei Arten möglich: Zum einen durch die periphere Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten in einer Dosis, gering genug um den Blutdruck nicht zu senken, aber

hoch genug, damit die AT₁-Rezeptorantagonisten in ausreichender Menge ins ZNS penetrieren. Zum anderen durch die Blockade eines auswärtsgerichteten Transporters an der BHS, zu dessen Substraten die AT₁-Rezeptorantagonisten zählen.

Wie eingangs erwähnt konnten Schrader et al. (2003) zeigen, dass niedrig dosiertes Candesartan (4mg pro Tag) auf Schlaganfallpatienten im Akutstadium positive, von der Blutdrucksenkung unabhängige, Effekte hat. Die Auswirkungen einer zeitnahen Gabe von Candesartan auf diese Patientengruppe war auch Gegenstand der 'Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial (SCAST)-Studie'. Aus den Ergebnissen der SCAST-Studie wurde geschlussfolgert, dass eine zeitnahe Gabe von Candesartan auf Patienten, die akut einen Schlaganfall erlitten haben, keine positiven Auswirkungen hat (Sandset et al., 2011). Allerdings wurde hier die Dosis von Candesartan schnell von 4mg auf 16mg innerhalb von drei Tagen erhöht. In der Studie von Schrader et al. (2003) erfolgte eine Dosiserhöhung dagegen nur, wenn der Blutdruck Werte von mehr als 160mmHg systolisch oder 100mmHg diastolisch überschritt. Als Folge der SCAST-Studie verlor die Gabe von AT₁-Rezeptorantagonisten in der Akutbehandlung von Schlaganfallpatienten an Bedeutung, sodass dieses Forschungsgebiet seine Aktualität eingebüßt hat.

Die Schlaganfallforschung befasst sich jedoch weiterhin mit dem RAS, konzentriert sich hierbei aber mehr auf den AT₂-Rezeptor. So konnten Alhusban et al. (2015) zeigen, dass durch eine spezifische Stimulation des AT₂-Rezeptors die Größe des Infarktareals verringert und das neurologische Outcome verbessert wurde. Alhusban et al. (2015) führten dies auf die proangiogenetischen, neuroprotektiven und antiinflammatorischen Effekte zurück, die durch die Stimulation der AT₂-Rezeptoren hervorgerufen wurden. Einen Einfluss auf den Blutdruck hatte die Stimulation der AT₂-Rezeptoren nicht.

Aufgrund der Bedeutung des RAS in der Pathogenese des Schlaganfalls und der Ergebnisse der dargestellten Studien, die diesbezüglich eine positive Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten aufweisen, sollte dem Forschungsgebiet, trotz der Ergebnisse der SCAST-Studie, weiterhin Aufmerksamkeit geschenkt werden. Es sollte weiter daran geforscht werden, wie AT₁-Rezeptorantagonisten nach peripherer Applikation in hoher Menge ins ZNS gelangen können, damit gleichzeitig ihre im Akutstadium eines Schlaganfalls schädliche systemische Wirkung vermieden werden kann. Von Erfolgen auf diesem Gebiet könnten viele Schlaganfallpatienten profitieren.

4.5 MRP2 und Probenecid

Wie bereits beschrieben befindet sich MRP2 nicht nur in Leber, Niere und Darm sondern ist auch an der BHS lokalisiert (Borst et al., 2000; Saunders et al., 1999). Die Entscheidung, genau diesen Transporter zu hemmen, wurde aufgrund der eigens dafür angestellten In-vitro-Versuche zur Interaktion zwischen MRP2 und Telmisartan getroffen (G. Fricker, unveröffentlichte Befunde). Zusätzlich wurde in einer parallel durchgeführten Studie das Transporterprotein Pgp untersucht, da auch dieses am Transport der AT₁-Rezeptorantagonisten von Bedeutung zu sein scheint. In jener Studie wurde Pgp durch Verapamil gehemmt; ansonsten stimmt das Studiendesign vollkommen überein.

Auch die Entscheidung für Probenecid fiel bewusst, obwohl auch andere MRP2-Hemmstoffe experimentell genutzt werden; diese wurden jedoch für einen Einsatz in dieser Studie ausgeschlossen. So ist zum Beispiel das Schleifendiuretikum Furosemid ebenfalls ein Hemmstoff des Transporterproteins MRP2 (Bakos et al., 2000). Allerdings ist Furosemid durch seinen starken Einfluss auf den Wasserhaushalt für ein Experiment ungeeignet, das einen Trinkversuch als Messmethode beinhaltet.

Gegen die Verwendung des als MRP2 spezifisch geltenden Hemmstoffs MK-571 sprach, dass dieser ebenso Pgp hemmt (Matsson et al., 2009), womit Überschneidungen mit der parallel durchgeführten Studie nicht ausgeschlossen wären. Außerdem ließe sich nicht mehr bestimmen, auf welchen Transporter ein gemessener Effekt zurückzuführen wäre, denn Losartan und Candesartan sind beide Pgp-Substrate (Soldner et al., 2000; Zhou et al., 2009) und Telmisartan wurde sowohl als Substrat von Pgp als auch von MRP2 identifiziert (Chang et al., 2006; G. Fricker, unveröffentlichte Befunde). Daher fiel die Wahl auf Probenecid, auch aufgrund der häufigen Verwendung von Probenecid als MRP2-Hemmstoff (Luna-Tortós et al., 2010; Van Vliet et al., 2005; Yao et al., 2012).

Andere Arbeitsgruppen haben Probenecid in einer Dosierung von lediglich 50mg/kgKG i.p. appliziert und erfolgreich MRP2 an der BHS gehemmt. Allerdings lagen hierbei je nur 15 beziehungsweise 30 Min. zwischen der Injektion von Probenecid und der Gabe des Medikaments, dessen Penetration ins ZNS untersucht wurde (Van Vliet et al., 2005; Yao et al., 2012). Probenecid wird nicht nur benutzt, um MRP2 an der BHS zu hemmen, sondern auch, um das renal und biliär exprimierte MRP2 zu hemmen. Hierfür reichte eine Dosis von 0,9 bis 23,9mg/kgKG, i.p. appliziert, aus (Shin et al., 2013).

In dem Versuch der vorliegenden Arbeit wurde Probenecid mit 90mg/kgKG i.p. wesentlich höher dosiert, allerdings war auch der Zeitraum zwischen der Applikation von Probenecid und

der der AT₁-Rezeptorantagonisten länger (vgl. Abb. 1). Betrachtet man nun die Dosis-Zeit-Kurve von Probenecid nach i.v.-Gabe, lässt sich feststellen, dass der Plasmaspiegel nach 90 Min. und nach 5h auf ungefähr 33% respektive 2% fällt (Emanuelsson und Paalzow, 1988). Dies entspräche einer Dosis von 30 beziehungsweise 1,8mg/kgKG bei sofortiger Applikation. Zur Berechnung des Plasmaspiegels von Probenecid werden die i.p.-Gabe und die i.v.-Gabe als nahezu gleichwertig angesehen, da es auch nach einer i.p.-Injektion zu einem sehr schnellen Wirkungseintritt kommt (Fink und Frey, 2010). Demnach ist MRP2 in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der ersten Messung vollständig, zum Zeitpunkt der zweiten Messung zumindest noch teilweise gehemmt.

Um MRP2 über den gesamten Zeitraum vollständig gehemmt zu wissen, müsste Probenecid entweder nachinjiziert oder eine Pumpe zur Dauerinfusion implantiert werden. Beides bedeutet zusätzlichen Stress für die Tiere, der sich negativ auf den Trinkversuch auswirken könnte. Ein Trinkversuch ist ein empfindliches Messverfahren und Störungen von außen führen dazu, dass die Tiere ihrem Dursttrieb nicht mehr ungestört nachgehen. Daher wurde darauf verzichtet, MRP2 über den gesamten Versuchszeitraum vollständig zu hemmen und Probenecid wurde nur einmal zu Beginn appliziert (vgl. Abb. 1).

Ein Nachteil von Probenecid besteht darin, dass es nicht spezifisch für MRP2 ist, sondern auch andere Transporter wie MRP1, MRP5 oder organische Anionen-Transportersysteme hemmt (Bakos et al., 2000; Luna-Tortós et al., 2010; Potschka et al., 2003). Allerdings kam es, verglichen mit der alleinigen Gabe des jeweiligen AT₁-Rezeptorantagonisten, durch die zusätzliche Applikation von Probenecid in keiner Versuchsreihe zu einer signifikanten Abnahme der Trinkantwort (vgl. Abb. 3-7). Daraus lässt sich schließen, dass auch diese Transporter nicht an der Penetration der AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt sind. Somit sind alle durch Probenecid gehemmten Transportersysteme nicht für die überlegene Wirkung von Candesartan verantwortlich.

4.6 Schlussfolgerung der Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss transportervermittelter Effekte auf die Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS zu untersuchen.

Verglichen mit der alleinigen Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten, ließ sich durch die zusätzliche Hemmung von MRP2 mit Probenecid keine signifikante Abnahme der Trinkantwort feststellen (vgl. Abb. 3-7), die eine Bedeutung von MRP2 für den Transport von AT₁-

Rezeptorantagonisten über die BHS hätte bestätigen können. Als Ergebnis kann daher festgehalten werden, dass die durch Probenecid gehemmten Transportersysteme, allen voran MRP2, nicht an der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt sind. Somit ist der aktive Auswärtstransport von AT₁-Rezeptorantagonisten nicht für die überlegene Wirksamkeit von Candesartan verantwortlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in Verbindung mit den Daten aus der Literatur, legen nahe, dass vermutlich die Wirksamkeit der AT₁-Rezeptorantagonisten im ZNS nicht darin begründet liegt, wie gut sie die BHS überwinden, sei die Penetration ins ZNS transportervermittelt oder nicht, sondern wie sie mit den zentralen AT₁-Rezeptoren interagieren.

Obwohl es Widersprüche zwischen einigen Studien gibt, liefern Affinität und Dissoziationshalbwertszeit ein gutes Erklärungsmodell für die unterschiedliche zentrale Wirksamkeit der verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten. Wie effektiv und lange die AT₁-Rezeptoren im ZNS nach peripherer Gabe von AT₁-Rezeptorantagonisten blockiert werden, scheint eine Kombination verschiedener Voraussetzungen zu sein: Affinität, Dissoziationshalbwertszeit und eine Form der 'Überwindbarkeit' der Hemmung.

Sollte tatsächlich ein Pgp-vermittelter Effekt dafür verantwortlich sein, dass 0,5h nach Gabe von Telmisartan in der Dosierung von 1mg/kgKG die Trinkmenge durch die zusätzliche Applikation von Probenecid, verglichen mit der alleinigen Gabe von Telmisartan, zunimmt (vgl. Abb. 6), gilt es, dies in weiteren Untersuchungen zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Obwohl AT₁-Rezeptorantagonisten von der Behandlung der Hypertonie und der Herzinsuffizienz hinreichend bekannt sind, hat diese Substanzgruppe unter gewissen Voraussetzungen (niedrig dosiert, zeitnahe Gabe) auch positive Effekte in der Akuttherapie von Schlaganfallpatienten. Hierfür ist eine auf das ZNS beschränkte Wirkung der AT₁-Rezeptorantagonisten notwendig. Ihre periphere Wirkung, im Sinne einer Blutdrucksenkung, hätte negative Konsequenzen (Zunahme der Infarktgröße, unter Umständen erhöhte Sterblichkeit). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten unterschiedlich dosiert werden müssen, um zentrale Rezeptoren ebenbürtig zu blockieren. Insbesondere Candesartan scheint hier den anderen überlegen zu sein, da nur ein Zehntel bis ein Hundertstel der Dosis anderer AT₁-Rezeptorantagonisten benötigt wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Transportermechanismen an der BHS für die unterschiedliche zentrale Wirksamkeit peripher applizierter AT₁-Rezeptorantagonisten verantwortlich gemacht werden können. Am Beispiel von MRP2 sollte überprüft werden, ob dieser Transporter an der Penetration der AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt ist und somit die überlegene Wirksamkeit von Candesartan erklärt werden kann. Zu diesem Zweck wurde MRP2 mit Probenecid gehemmt. Wäre dieser Transporter an der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS beteiligt, müssten die AT₁-Rezeptorantagonisten länger im ZNS bleiben und demnach die Trinkantwort auf i.c.v. appliziertes ANG II als Indikator abnehmen. Durch die Hemmung des aktiven Auswärtstransports sollten Substrate von MRP2 (Telmisartan wurde bereits in-vitro als solches identifiziert) eine bessere zentrale Wirksamkeit aufweisen. Würde also die zusätzliche Applikation von Probenecid bei Losartan, Irbesartan oder Telmisartan zu einer signifikanten Abnahme der Trinkantwort führen, ließe sich daraus schlussfolgern, dass die, im Vergleich zu Candesartan, geringere zentrale Wirksamkeit von Losartan, Irbesartan oder Telmisartan durch deren MRP2-vermittelten aktiven Auswärtstransport bedingt ist.

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten durchgeführt, denen eine Kanüle in den Seitenventrikel und ein i.v.-Katheter implantiert wurden. Während der ersten Versuchsreihe wurden folgende AT₁-Rezeptorantagonisten i.v. appliziert: Telmisartan 1mg/kgKG und 3mg/kgKG, Candesartan 0,33mg/kgKG, Irbesartan 30mg/kgKG und Losartan 10mg/kgKG. Die Kontrollgruppe erhielt das jeweilige Lösungsmittel. Nach 0,5h sowie nach 4h erfolgte die

Messung der Trinkantwort nach i.c.v. Applikation von 100ng ANG II. Bei der zweiten Versuchsreihe erfolgte 1h vor Applikation der AT₁-Rezeptorantagonisten die Gabe von 90mg/kgKG Probenecid i.p.. Ansonsten wurde wie bei der ersten Versuchsreihe verfahren.

Es konnte gezeigt werden, dass nur der Transport von Telmisartan in der Dosis von 1mg/kgKG durch Probenecid signifikant beeinflusst wurde. Allerdings nahm die Trinkmenge wieder zu, was den vor dem Experiment angestellten Überlegungen widerspricht. Die gleiche Tendenz lässt sich auch bei Candesartan feststellen, allerdings ist hier der gemessene Unterschied nicht signifikant. In Verbindung mit den Daten aus der Literatur lässt sich schlussfolgern, dass Probenecid hier vermutlich einen Transporter induziert, der AT₁-Rezeptorantagonisten aus dem ZNS befördert.

Die gegenüber anderen AT₁-Rezeptorantagonisten effektivere zentrale Wirkung von Candesartan lässt sich demnach nicht durch den aktiven Auswärtstransport anderer AT₁-Rezeptorantagonisten durch MRP2 erklären. Genauso wenig liefert die substanzspezifische Fettlöslichkeit eine plausible Erklärungsmöglichkeit. Es scheint also eine Frage von Affinität, Dissoziationshalbwertszeit und eine Form der 'Überwindbarkeit' der Hemmung zu sein, die darüber entscheidet, wie effektiv und lange die zentralen AT₁-Rezeptoren nach peripherer Applikation eines AT₁-Rezeptorantagonisten blockiert werden. Allerdings ist noch nicht geklärt, welchen Einfluss andere Transporterproteine neben MRP2 auf den Transport von AT₁-Rezeptorantagonisten über die BHS haben.

6 Literaturverzeichnis

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J. (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37, 13-25

Alhusban, A., Fouda, A.Y., Pillai, B., Ishrat, T., Soliman, S., Fagan, S.C. (2015): Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke. *J Hypertens.* 33, 170-80

Bakos, E., Evers, R., Sinkó, E., Váradi, A., Borst, P., Sarkadi, B. (2000): Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol.* 57, 760-8

Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92, 1295-302

Brdon, J., Kaiser, S., Hagemann, F., Zhao, Y., Culman, J., Gohlke, P. (2007): Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J Hypertens.* 25, 187-96

Brolund, L. (2008): Vergleichende Untersuchung der Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke - Bedeutung von P-Glykoprotein -. *Med. Diss., Kiel*

Burton, S., Lemke, K.A., Ihle, S.L., Mackenzie, A.L. (1998): Effects of medetomidine on serum osmolality; urine volume, osmolality and pH; free water clearance; and fractional clearance of sodium, chloride, potassium, and glucose in dogs. *Am J Vet Res.* 59, 756-61

Chang, C., Bahadduri, P.M., Polli, J.E., Swaan, P.W., Ekins, S. (2006): Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 34, 1976-84

Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T. (2002): The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT₁-receptor blockers. *J Hum Hypertens.* 16, 64-70

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

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, 415-72

Eames, P.J., Blake, M.J., Dawson, S.L., Panerai, R.B., Potter, J.F. (2002): Dynamic cerebral autoregulation and beat to beat blood pressure control are impaired in acute ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 72, 467-72

Emanuelsson, B.M., Paalzow, L.K. (1988): Dose-dependent pharmacokinetics of probenecid in the rat. *Biopharm Drug Dispos*. 9, 59-70

Engelhorn, T., Goerike, S., Doerfler, A., Okorn, C., Forsting, M., Heusch, G., Schulz, R. (2004): The angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan increases cerebral blood flow, reduces infarct size, and improves neurologic outcome after transient cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24, 467-74

Fagan, S.C., Kozak, A., Hill, W.D., Pollock, D.M., Xu, L., Johnson, M.H., Ergul, A., Hess, D.C. (2006): Hypertension after experimental cerebral ischemia: candesartan provides neurovascular protection. *J Hypertens*. 24, 535-9

Fink, H., Frey, H.H. (2010): Allgemeine Pharmakologie. In: Frey, H.H., Löscher, W. (Hrsg.) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 3. vollständig überarbeitete Auflage, 18, Enke Verlag, Stuttgart

Fu, H., Hosomi, N., Pelisch, N., Nakano, D., Liu, G., Ueno, M., Miki, T., Masugata, H., Sueda, Y., Itano, T., Matsumoto, M., Nishiyama, A., Kohno, M. (2011): Therapeutic effects of postischemic treatment with hypotensive doses of an angiotensin II receptor blocker on transient focal cerebral ischemia. *J Hypertens*. 29, 2210-9

Gant, T.W., O'Connor, C.K., Corbitt, R., Thorgeirsson, U., Thorgeirsson, S.S. (1995): In vivo induction of liver P-glycoprotein expression by xenobiotics in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 133, 269-76

Girardin, F. (2006): Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. *Dialogues Clin Neurosci.* 8, 311-21

Gohlke, P., Weiss, S., Jansen, A., Wiene, W., Stangier, J., Rascher, W., Culman, J., Unger, T. (2001): AT₁ receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 298, 62-70

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

Gohlke, P., Von Kügelgen, S., Jürgensen, T., Kox, T., Rascher, W., Culman, J., Unger, T. (2002b): Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Hypertens.* 20, 909-18

Grady, E.F., Sechi, L.A., Griffin, C.A., Schambelan, M., Kalinyak, J.E. (1991): Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* 88, 921-33

Guimond, M.O., Gallo-Payet, N. (2012): The Angiotensin II Type 2 Receptor in Brain Functions: An Update. *Int J Hypertens.* 2012, Article ID 351758, 18 pages, doi: 10.1155/2012/351758

Hawkins, B.T., Davis, T.P. (2005): The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57, 173-85

Heeneman, S., Sluimer, J.C., Daemen, M.J. (2007): Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res.* 101, 441-54

Ishiguro, N., Maeda, K., Kishimoto, W., Saito, A., Harada, A., Ebner, T., Roth, W., Igarashi, T., Sugiyama, Y. (2006): Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos.* 34, 1109-15

Ishiguro, N., Maeda, K., Saito, A., Kishimoto, W., Matsushima, S., Ebner, T., Roth, W., Igarashi, T., Sugiyama, Y. (2008): Establishment of a set of double transfectants coexpressing organic anion transporting polypeptide 1B3 and hepatic efflux transporters for the characterization of the hepatobiliary transport of telmisartan acylglucuronide. *Drug Metab Dispos.* 36, 796-805

Ju, H., Zhao, S., Jassal, D.S., Dixon, I.M. (1997): Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 35, 223-32

Kakuta, H., Sudoh, K., Sasamata, M., Yamagishi, S. (2005): Telmisartan has the strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor: comparison with other angiotensin II type 1 receptor blockers. *Int J Clin Pharmacol Res.* 25, 41-6

Kozak, W., Kozak, A., Johnson, M.H., Elewa, H.F., Fagan, S.C. (2008): Vascular protection with candesartan after experimental acute stroke in hypertensive rats: a dose-response study. *J Pharmacol Exp Ther.* 326, 773-82

Lautier, D., Canitrot, Y., Deeley, R.G., Cole, S.P. (1996): Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol.* 52, 967-77

Lee, S., Brait, V.H., Arumugam, T.V., Evans, M.A., Kim, H.A., Widdop, R.E., Drummond, G.R., Sobey, C.G., Jones, E.S. (2012): Neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Exp Transl Stroke Med.* 2012 4:16

Levin, V.A. (1980): Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem.* 23, 682-4

Li, Y.C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z.F., Liu, S.Q., Cao, L.P. (2002): 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 110, 229-38

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 Metab.* 24, 536-47

Ludbrook, J. (1994): Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. *Cardiovasc Res.* 28, 303-11

Luna-Tortós, C., Fedrowitz, M., Löscher, W. (2010): Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmaco-resistant epilepsy. *Neuropharmacology.* 58, 1019-32

Maillard, M.P., Perregaux, C., Centeno, C., Stangier, J., Wiene, W., Brunner, H.R., Burnier, M. (2002): In vitro and in vivo characterization of the activity of telmisartan: an insurmountable angiotensin II receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 302, 1089-95

Matsson, P., Pedersen, J.M., Norinder, U., Bergström, C.A., Artursson, P. (2009): Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res.* 26, 1816-31

Michel, M.C., Foster, C., Brunner, H.R., Liu, L. (2013): A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 65, 809-48

Miura, S., Nakao, N., Hanzawa, H., Matsuo, Y., Saku, K., Karnik, S.S. (2013): Reassessment of the unique mode of binding between angiotensin II type 1 receptor and their blockers. *PLoS One.* 8(11): e79914. doi: 10.1371/journal.pone.0079914

Morsing, P., Adler, G., Brandt-Eliasson, U., Karp, L., Ohlson, K., Renberg, L., Sjöquist, P.O., Abrahamsson, T. (1999): Mechanistic differences of various AT1-receptor blockers in isolated vessels of different origin. *Hypertension.* 33, 1406-13

Nishino, A., Kato, Y., Igarashi, T., Sugiyama, Y. (2000): Both cMOAT/MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the nonpeptide angiotensin II antagonist, telmisaltan. *Drug Metab Dispos.* 28, 1146-8

Noda, M., Shibouta, Y., Inada, Y., Ojima, M., Wada, T., Sanada, T., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T., Nishikawa, K. (1993): Inhibition of rabbit aortic angiotensin II (AII) receptor by CV-11974, a new nonpeptide AII antagonist. *Biochem Pharmacol.* 46, 311-8

Pardridge, W.M. (1993): Brain drug delivery and blood-brain barrier transport. *Drug Delivery.* 1, 83-101

Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86, 747-803

Paxinos, G., Watson, C. (1986): The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, London, UK

Polidori, C., Ciccocioppo, R., Pompei, P., Cirillo, R., Massi, M. (1996): Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Eur J Pharmacol.* 307, 259-67

Potschka, H., Fedrowitz, M., Löscher, W. (2003): Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 306, 124-31

Robertson, S., Penzak, S.R., Huang, S.M. (2012): Drug Interactions. In: Atkinson, A.J. Jr., Huang, S.M., Lertora, J.J.L., Markey, S.P. (Hrsg.) *Principles of Clinical Pharmacology*, 3. Auflage, 245, Academic Press, London, UK

Robillard, K.R., Chan, G.N., Zhang, G., la Porte, C., Cameron, W., Bendayan, R. (2014): Role of P-glycoprotein in the distribution of the HIV protease inhibitor atazanavir in the brain and male genital tract. *Antimicrob Agents Chemother.* 58, 1713-22

Saavedra, J.M. (1992): Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 13, 329-80

Sandset, E.C., Bath, P.M., Boysen, G., Jatuzis, D., Kõrv, J., Lüders, S., Murray, G.D., Richter, P.S., Roine, R.O., Terént, A., Thijs, V., Berge, E.; SCAST Study Group. (2011): The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* 377, 741-50

Saunders, N.R., Habgood, M.D., Dziegielewska, K.M. (1999): Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26, 11-9

Schmidt-Ott, K.M., Kagiya, S., Phillips, M.I. (2000): The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept.* 93, 65-77

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

Schroten, M., Hanisch, F.G., Quednau, N., Stump, C., Riebe, R., Lenk, M., Wolburg, H., Tenenbaum, T., Schwerk, C. (2012): A novel porcine in vitro model of the blood-cerebrospinal fluid barrier with strong barrier function. *PLoS One.* 7(6): e39835. doi: 10.1371/journal.pone.0039835

Shimizu, R., Miyazaki, M., Iwanaga, K., Kakemi, M. (2012): The pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the hypotensive effect after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide in spontaneously hypertensive rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 207-15

Shin, Y.J., Lee, J.H., Oh, J.H., Lee, Y.J. (2013): Low-dose probenecid selectively inhibits urinary excretion of phenolsulfonphthalein in rats without affecting biliary excretion. *J Appl Toxicol.* 33, 511-5

Soldner, A., Benet, L.Z., Mutschler, E., Christians, U. (2000): Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol.* 129, 1235-43

Spaether, K.R. (2009): Vergleichende Untersuchung der neuroprotektiven Effekte verschiedener AT₁-Rezeptorantagonisten nach fokaler Gehirnischämie. *Med. Diss., Kiel*

Timmermans, P.B. (1999): Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics. *Hypertens Res.* 22, 147-53

Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Höhle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., Zhu, Y.Z. (1996): Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 14, 95-103

Van Liefde, I., Vauquelin, G. (2009): Sartan-AT₁ receptor interactions: in vitro evidence for insurmountable antagonism and inverse agonism. *Mol Cell Endocrinol.* 302, 237-43

Van Vliet, E.A., Redeker, S., Aronica, E., Edelbroek, P.M., Gorter, J.A. (2005): Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia.* 46, 1569-80

Vanderheyden, P.M., Fierens, F.L., De Backer, J.P., Fraeyman, N., Vauquelin, G. (1999): Distinction between surmountable and insurmountable selective AT₁ receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT₁ receptors. *Br J Pharmacol.* 126, 1057-65

Vanderheyden, P.M., Fierens, F.L., Vauquelin, G. (2000): Angiotensin II type 1 receptor antagonists. Why do some of them produce insurmountable inhibition? *Biochem Pharmacol.* 60, 1557-63

Vauquelin, G., Fierens, F.L., Van Liefde, I. (2006): Long-lasting angiotensin type 1 receptor binding and protection by candesartan: comparison with other biphenyl-tetrazole sartans. *J Hypertens Suppl.* 24, 23-30

Veltkamp, R. (2012): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. In: Diener, H.C., Weimar, C. (Hrsg.) *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, Herausgegeben von der Kommission „Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie“, 5. vollständig überarbeitete Auflage, 307-23, Thieme Verlag, Stuttgart

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

Wang, H., Tang, Y., Rong, X., Li, H., Pan, R., Wang, Y., Peng, Y. (2014): Effects of early blood pressure lowering on early and long-term outcomes after acute stroke: an updated meta-analysis. *PLoS One.* 9(5): e97917. doi: 10.1371/journal.pone.0097917

Weiss, J., Sauer, A., Divac, N., Herzog, M., Schwedhelm, E., Böger, R.H., Haefeli, W.E., Benndorf, R.A. (2010): Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters. *Biopharm Drug Dispos.* 31, 150-61

Wienen, W., Entzeroth, M., van Meel, J.C.A., Stangier, J., Busch, U., Ebner, T., Schmid, J., Lehmann, H., Matzek, K., Kempthorne-Rawson, J., Gladigau, V., Huel, N.H. (2000): A Review on Telmisartan: A Novel, Long-Acting Angiotensin II-Receptor Antagonist. *Cardio-vasc Drug Rev.* 18, 127-54

Wolf, G. (2000): Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep.* 2, 167-73

Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., Searson, P.C. (2013): The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng.* 6:7. doi: 10.3389/fneng.2013.00007

Yao, D., Liu, L., Jin, S., Li, J., Liu, X.D. (2012): Overexpression of multidrug resistance-associated protein 2 in the brain of pentylentetrazole-kindled rats. *Neuroscience.* 227, 283-92

Zhou, L., Chen, X., Gu, Y., Liang, J. (2009): Transport characteristics of candesartan in human intestinal Caco-2 cell line. *Biopharm Drug Dispos.* 30, 259-64

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Folgende Personen möchte ich besonders hervorheben:

Zunächst danke ich Prof. Dr. Dr. Cascorbi für die Überlassung des Themas. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gohlke für die sehr gute Betreuung und unermüdliche Unterstützung während des experimentellen Teils, bei dem es nicht nur eine Hürde zu überwinden gab, sowie bei der Entstehung der Dissertationsschrift. Ebenso bedanke ich mich bei PD Dr. Culman für die guten Ratschläge im experimentellen Teil und die zielführende Hilfe bei der Fehlersuche. Meinen Dank spreche ich sowohl Dr. Brdon für das Beibringen der Versuchs- und OP-Techniken als auch den Tierpflegerinnen aus, ohne deren Hilfe ein tierexperimenteller Versuch nicht durchzuführen ist. Ebenso gilt mein Dank den technischen Assistentinnen aus dem Institut für die anfängliche Unterstützung im Laborteil.

Ole danke ich für die gemeinsam bei den Experimenten verbrachte Zeit, die nicht nur harte Arbeit war, sondern zusammen sogar Spaß gemacht hat.

Katrin bin ich für so vieles dankbar: Für die großartige, ausdauernde Unterstützung beim Korrekturlesen, ihre unendliche Geduld und die aufheiternden Worte, wenn es mal schwierig war.

Von Herzen danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben zu studieren und diese Dissertation zu verfassen. Ihre Unterstützung und Glaube an mich haben mir den Ansporn gegeben, dieses Vorhaben umzusetzen und somit in hohem Maße zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

8 Publikationen

Jacob, T., Schuster, S.O., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2012): Bedeutung der Transporterproteine MRP-2 und P-Glykoprotein für die Penetration von AT1-Rezeptorantagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke, 14. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere-Tage, 14.-16. Mai 2012, Bad Herrenalb

Schuster, S.O., Jacob, T., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2013): Role of the transporter proteins MRP-2 and P-glycoprotein in the penetration of AT1-receptor antagonists through the blood-brain barrier. Barriers of the CNS, 10.-13. Februar 2013, Costa Teguisse, Lanzarote

Jacob, T., Schuster, S.O., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2014): Penetration of AT1-receptor antagonists through the blood-brain barrier: Are transporter proteins such as MRP-2 and P-glycoprotein involved? 38. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. – Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, 11.-13. Dezember 2014, Berlin

Jacob, T., Schuster, S.O., Cascorbi, I., Culman, J., Gohlke, P. (2015): Penetration of AT1-receptor antagonists through the blood-brain barrier: Are transporter proteins such as MRP-2 and P-glycoprotein involved? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 10.-12. März 2015, Kiel

Culman, J., Jacob, T., Schuster, S.O., Spaether, K., Brolund, L., Cascorbi, I., Zhao, Y., Gohlke, P. (2017): Neuroprotective effects of AT1 receptor antagonists after experimental ischaemic stroke: What is important? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 390, 949-59

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jacob
Vorname	Toni Alexander
Adresse	Hasseldieksdammer Weg 39, 24114 Kiel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	09.08.1986
Geburtsort	Werneck

Schulische Ausbildung

September 1993 bis Juli 1994	Julius-Echter-Volksschule in Berggrheinfeld
September 1994 bis Juli 1997	Volksschule Am Wehrbusch in Grafenrheinfeld
September 1997 bis Juni 2006	Celtis-Gymnasium in Schweinfurt, Hochschulreife mit der Gesamtnote 1,4

Zivildienst

Juli 2006 bis März 2007	Zivildienstleistender beim Bayerischen Roten Kreuz, Kreisverband Schweinfurt, im Bereich Rettungsdienst, Abschlussprüfung zum Rettungssanitäter mit der Gesamtnote 2,0
-------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Studium

Oktober 2007 bis Dezember 2013	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss des Studiums durch das zweite Staatsexamen, Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote 1,5
Januar 2014	Approbation

Famulaturen

März 2010	Allgemeinmedizin, Dres. Schwabe, Grafenrheinfeld
August 2010	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH, Kiel
März 2011	Neurochirurgie, UKSH, Kiel
September 2011	Plastische Chirurgie, Dr. Klinzing, Hamburg
März 2012	Radiologie, UKSH, Kiel

Freiwillige Praktika

März 2012	Plastische Chirurgie, Dr. Klinzing, Hamburg
März 2013	Plastische Chirurgie, Dr. Häring, Kiel

Dissertation

Seit Juli 2010	Experimentelle Forschung zu Transporterproteinen an der Blut-Hirn-Schranke, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH, Kiel
Mai 2012	Teilnahme an den 14. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere-Tagen
März 2015	Teilnahme an der 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie in Kiel (Poster)