

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleichende Interventionsstudie mit Telmisartan, Ramipril und der  
Kombination im akuten Modell des Schlaganfalls der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kay Rumschübel

aus Belzig

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. T. Unger  
                             2. Prof. Dr. med. D. M. Hermann  
                             3. Prof. Dr. med. M. Bader

Datum der Promotion: 18.11.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SCHLAGANFALL</b>	<b>1</b>
1.1.1. DEFINITION, EINTEILUNG, EPIDEMIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN DES SCHLAGANFALLS	1
1.1.2. PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	5
1.1.3. THERAPIE UND PRÄVENTION DES AKUTEN ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	9
<b>1.2. RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM</b>	<b>12</b>
1.2.1. PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS	12
1.2.2. REZEPTOREN DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS	17
1.2.2.1. Angiotensin-Typ-1-Rezeptor	17
1.2.2.2. Angiotensin-Typ-2-Rezeptor	19
1.2.2.3. <i>Insulin Regulated Aminopeptidase</i>	20
1.2.2.4. Mas-Onkogen-Rezeptor	20
1.2.2.5. Renin/Prorenin-Rezeptor	21
1.2.3. RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM IM GEHIRN	21
1.2.4. PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS	23
1.2.5. DIE BEDEUTUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS IM SCHLAGANFALL	24
<b>1.3. NEUROTROPHINE</b>	<b>27</b>
1.3.1. <i>BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR</i>	27
1.3.2. TYROSINKINASE B	28
<b>1.4. PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM</b>	<b>29</b>
1.4.1. TUMOR-NEKROSE-FAKTOR ALPHA	30
1.4.2. INTERLEUKIN-6	31
<b>1.5. HYPOTHESE DER ARBEIT</b>	<b>32</b>
<b>2. MATERIALIEN UND METHDEN</b>	<b>34</b>
<b>2.1. MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>34</b>
2.1.1. MATERIALIEN	34
2.1.1.1. Chemikalien und Substanzen	34

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.1.2. <i>Primer</i>	37
2.1.1.3. Enzyme	37
2.1.1.4. Antikörper	38
2.1.1.5. Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte	38
2.1.2. GERÄTE	40
<b>2.2. METHODEN</b>	<b>42</b>
2.2.1. METHODEN DER <i>IN VIVO</i> -VERSUCHE	42
2.2.1.1. Haltung und Pflege der Tiere	42
2.2.1.2. Studiendesign	42
2.2.1.3. Einbringen der arteriellen und venösen Femoraliskatheter	44
2.2.1.4. Bestimmung der Behandlungsdosen im Rahmen der Pilotstudie	44
2.2.1.5. Messung der zerebralen Blutflusses	45
2.2.1.6. <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	46
2.2.1.7. Angiografie	46
2.2.1.8. Quantifizierung der Infarktvolimina	47
2.2.1.9. Beurteilung der neurologischen Defizite	47
2.2.1.10. Tötung der Tiere und Organentnahme	48
2.2.2. METHODEN DER NUKLEOTIDANALYTIK	49
2.2.2.1. RNA-Isolation	49
2.2.2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	49
2.2.2.3. DNase-Verdau	49
2.2.2.4. Umschreiben der RNA in komplementäre DNA	50
2.2.2.5. Quantitative <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	50
2.2.3. METHODEN DER IMMUNFLUORESZENZZYTOCHEMIE	52
2.2.3.1. Anfertigung von Kryoschnitten	52
2.2.3.2. Färbung der Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin	52
2.2.3.3. Immunfluoreszenzfärbungen	53
2.2.3.3.1. Nissl-Fluoreszenzfärbung mittels <i>NeuroTrace<sup>TM</sup></i>	53
2.2.3.3.2. Fluoreszenzfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol	54
2.2.3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörpern	54
2.2.3.3.4. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen	55
2.2.4. METHODEN DER STATISTIK	56

<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>3.1. ERGEBNISSE DER TIEREXPERIMENTELLEN VERSUCHE</b>	<b>57</b>
3.1.1. ERGEBNISSE DER PILOTSTUDIE ZUR DOSISFINDUNG	57
3.1.1.1. Bestimmung der Angiotensin I- und Angiotensin II-Konzentrationen	57
3.1.1.2. Bestimmung der Telmisartan-Konzentration	58
3.1.1.3. Bestimmung der Ramipril-Konzentration	59
3.1.1.4. Bestimmung der Konzentration in der Kombinationsbehandlungsgruppe	60
3.1.1.5. Messung der Änderung des mittelarteriellen Drucks nach Renin-Angiotensin-System-Blockade über 24 h	61
3.1.1.6. Bestimmung des mittelarteriellen Drucks im Rahmen der <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	62
3.1.2. ERGEBNISSE DER HAUPTSTUDIE IM RAHMEN DER <i>MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION</i> - VERSUCHE	63
3.1.2.1. Darstellung der intrakraniellen Gefäße vor, während und nach der <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	63
3.1.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses	64
3.1.2.3. Perioperative Messung diverser klinisch-chemischer Parameter im gemischt-venösen Blut	64
3.1.2.4. Bestimmung des Körpergewichts 48 h nach <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	65
3.1.2.5. Darstellung und Bestimmung der absoluten und relativen Infarkt volumina	66
3.1.2.6. Evaluierung der neurologischen Defizite	68
<b>3.2. ERGEBNISSE DER <i>IN VITRO</i>-VERSUCHE</b>	<b>69</b>
3.2.1. ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN MITTELS QUANTITATIVER <i>REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION</i>	69
3.2.1.1. Untersuchung der Interleukin-6-Expression nach <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	70
3.2.1.2. Untersuchung der Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ -Expression nach <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	70
3.2.1.3. Untersuchung der <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> -Expression nach <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	71
3.2.1.4. Untersuchung der Tyrosinkinase B-Expression nach <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	72
3.2.2. ERGEBNISSE DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN	72
3.2.2.1. Ergebnisse der Nissl-Fluoreszenzfärbung mittels <i>NeuroTrace<sup>TM</sup></i>	72

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2.2. Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol	76
3.2.2.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörpern	81
3.2.2.3.1. Ergebnisse der Interleukin-6-Immunfluoreszenzfärbung	81
3.2.2.3.2. Ergebnisse der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Immunfluoreszenzfärbung	88
3.2.2.3.3. Ergebnisse der Tyrosinkinase B-Immunfluoreszenzfärbung	95
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>103</b>
<b>4.1. PILOTSTUDIE ZUR DOSISFINDUNG</b>	<b>103</b>
<b>4.2. EINFLUSS DER VORBEHANDLUNGEN AUF DIE ERGEBNISSE DER <i>IN VIVO</i>- UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>104</b>
<b>4.3. EINFLUSS DER VORBEHANDLUNGEN AUF DIE ERGEBNISSE DER <i>IN VITRO</i>-ERGEBNISSE</b>	<b>109</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>120</b>
<b>6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>122</b>
<b>7. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>9. ERKLÄRUNG</b>	<b>145</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>147</b>
<b>11. CURRICULUM VITAE</b>	<b>148</b>
<b>12. PUBLIKATIONEN</b>	<b>149</b>

### Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGT	Angiotensinogen
AMI	akuter Myokardinfarkt
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4- Isoxazolpropionsäure
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III
Ang IV	Angiotensin IV
Ang <sup>1-7</sup>	Angiotensin 1-7
Ang <sup>1-9</sup>	Angiotensin 1-9
Ang <sup>2-8</sup>	Angiotensin 2-8
Ang <sup>3-8</sup>	Angiotensin 3-8
ARB	Angiotensin-Rezeptortyp 1-Blocker
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure
AT <sub>1</sub> -R.	Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor
AT <sub>2</sub> -R.	Angiotensin II-Typ-2-Rezeptor
ATIP	<i>AT<sub>2</sub>-receptor-Interacting Proteins</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BK	Bradykinin
BMI	<i>Body Mass Index</i>
C21	<i>Compound 21</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CBF	zerebraler Blutfluss

## Abkürzungsverzeichnis

---

CCR	<i>Center for Cardiovascular Research</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D	Deutschland
D. m.	Diabetes mellitus
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol·HCl
DBS	<i>Donkey Blocking Serum</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	MAPK <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
ICAM-1	<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>
ICB	intrazerebrale Blutung
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Il	Interleukin
Il-1-Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonisten
Il-6-R.	Interleukin-6-Rezeptor
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRAP	<i>Insulin Regulated Aminopeptidase</i>
JAK	Janus-Kinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

K <sup>+</sup>	Kalium
KG	Körpergewicht
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo-Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
km	Kilometer
l	Liter
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LTP	<i>Long-Term-Potential</i>
LVD	<i>large vessel disease</i>
M.	<i>Morbus</i>
MAP	mittelarterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mas-R.	Mas Onkogen-Rezeptor
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Million
Mrd.	Milliarde
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
ms	Millisekunden
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Ncl.	<i>Nucleus</i>
NEP	neutrale Aminopeptidase
NFκB	<i>Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickoxid
NOS	NO-Synthase
NSD	<i>Neutral Sphingomyelinase Domain</i>
NT	Neurotrophin
NWFZ	Neurowissenschaftliches Forschungszentrum
OAK	orale Antikoagulation
p75 <sup>NTR</sup>	p75-NT-Rezeptor
paCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
paO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PARP-1	Poly(ADP)Ribose-Polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCP	Prolyl-Carboxypeptidase
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PI3	Phosphoinositit-3
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA 2	Phospholipase A 2
PLC	Phospholipase C
POP	Prolyl-Oligopeptidase
PPAR- $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierer Rezeptor $\gamma$
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPR	Renin/Prorenin-Rezeptor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rt-PA	rekombinantrm Gewebsplasminogenaktivator
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
s	Sekunden
s. c.	subkutan

## Abkürzungsverzeichnis

---

SAB	Subarachnoidalblutung
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SHP	spontan hypertensive Ratten
SPF	<i>special pathogen free</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SVD	<i>small vessel disease</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> 1</i>
TIA	transitorisch ischämische Attacke
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TNFR.	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TOP	Thimet-Oligopeptidase
TRAF-2	<i>TNFR-Associated Factor 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRID	<i>TNFR-1 Internalization Domain</i>
Trk	Tyrosinkinase
Trk-R.	Tyrosinkinase-Rezeptor
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHF	Vorhofflimmern
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1. Schlaganfall

#### 1.1.1. Definition, Einteilung, Epidemiologie und Risikofaktoren des Schlaganfalls

*Es nimmt der Augenblick, was Jahre geben.*

Johann Wolfgang von Goethe

Es war das Jahr 1658, als der Schweizer Pathologe Johann Jakob Wepfer in seinem Werk „*Apoplexie*“ erstmals in der Geschichte der Medizin über eine intra- und extrakranielle Thrombose der Karotiden berichtete. Seinen Vorstellungen zufolge seien in Anlehnung an Galen sogenannte „*natural spirits*“ aus der Körperperipherie hervorgegangen und über das Blut zum Herzen transportiert worden, wo eine Umwandlung der „*natural spirits*“ in „*vital spirits*“ erfolgte. Über die Karotiden und Vertebralarterien seien die „*vital spirits*“ anschließend in das Gehirn gelangt. Dies habe die Bildung von „*animal spirits*“ in *Cerebrum*, *Cerebellum* und der *Medulla oblongata* ermöglicht. Erst durch Ausbreitung der „*animal spirits*“ über die *Medulla*, das Rückenmark und die peripheren Nerven sei es einem Menschen möglich gewesen, Sinn, Verstand, Bewusstsein und die Fähigkeit der Bewegung einzelner Körperteile zu entwickeln. Würden die „*vital spirits*“ durch einen Verschluss der Gefäße daran gehindert werden in das Gehirn zu gelangen, resultiere ein Schlaganfall (1).

Aus heutiger Sicht definiert die WHO den Schlaganfall als ein Krankheitsbild, welches sich durch das Auftreten einer fokalen oder globalen Störung der zerebralen Funktion auszeichnet und mindestens 24 Stunden (h) anhält oder zum Tode führt sowie nicht offensichtlich auf eine avaskuläre Ursache zurückzuführen ist. Eschenfelder *et al.* fügen des Weiteren hinzu, dass es sich demzufolge um ein akut einsetzendes fokales (oder globales) neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen (oder globalen) Durchblutungsstörung des Gehirns handle (2).

Ätiologisch können 2 Formen des Schlaganfalls unterschieden werden. Mit 85-87 % repräsentiert der ischämische Schlaganfall den weitaus größeren Teil im Vergleich zur hämorrhagischen Form, die für 13-15 % der Fälle verantwortlich ist. Beiden Formen sind Symptome wie fokale Muskelschwäche oder Taubheit, Sehstörungen, Schwindel, Verwirrtheit, Sprach- und Verständnisstörungen sowie plötzlicher schwerer Kopfschmerz gemein. Dem ischämischen Schlaganfall liegt ein Gefäßverschluss zugrunde, der konsekutiv zu einer Minderversorgung des nachgeschalteten Areals mit Sauerstoff führt. Dieser Verschluss kann durch 3 Mechanismen her-

vorgerufen werden. Die im Rahmen einer *large vessel disease* (LVD) langsam voran schreitende Atherosklerose kann zur Ruptur einer intravaskulär gelegenen Plaque und im Folgenden zur Entwicklung eines Thrombus oder Embolus führen, welcher eine Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF) zur Folge haben kann. Diese Veränderungen können sowohl intrakraniell, als auch in extrakraniellen Gefäßen, wie dem *Arcus aortae*, auftreten. Im Gegensatz dazu betreffen lakunäre Infarkte die kleinen Gefäße des Gehirns, weswegen oft von einer *small vessel disease* (SVD) gesprochen wird. Als ursächlich für die okklusiven Veränderungen der kleinen Gefäße wird die Entstehung einer Lipohyalinose gesehen. Dabei handelt es sich um eine Degeneration der Gefäßwand mit Ablagerungen innerhalb des Gefäßlumens. Beispiele für Lipohyalinosehervorrufende Erkrankungen sind die Eklampsie und Arteriitiden. Der dritte Mechanismus, dem ein ischämischer Infarkt zugrunde liegen kann, entspricht dem der Embolie. Dabei gelangen Thromben aus der Peripherie in die hirnersorgenden Gefäße und führen zu einem Gefäßverschluss. Der Großteil der zirkulierenden Thromben ist kardialer Genese und wird durch Vorhofflimmern (VHF), akuten Myokardinfarkt (AMI), Klappenerkrankungen, Kardiomyopathien oder Endokarditis begünstigt. Ferner können auch Fettembolien aus frakturierten Knochen oder korpuskuläre Thromben bei Drogenabhängigen eine Okklusion von intra- und extrakraniellen Gefäßen herbeiführen. Bei jüngeren Patienten werden auch andere, vor allem seltenere, Ursachen eines ischämischen Schlaganfalls beobachtet. Zu diesen gehören u. a. Gefäßdissektionen, Hyperkoagulabilität, Sinusvenenthrombose, Vaskulitis, Hyperviskositätssyndrome, Thrombozytosen, Sichelzellanämie und ein persistierendes, offenes *Foramen ovale* (3). Hämorrhagische Schlaganfälle zeichnen sich durch eine besonders hohe Mortalität aus. Innerhalb von 30 Tagen nach dem Schlaganfall versterben 35-52 % der Patienten, die Hälfte davon in den ersten 2 Tagen (4). Vor Etablierung der Computertomografie als Diagnostikum der Wahl war mit einer Mortalität von 58-92 % zu rechnen (2). Weiterhin unterscheidet sich gegenüber dem ischämischen Schlaganfall das Patientengut, welches im Falle der hämorrhagischen Schlaganfälle meist jünger als 40 Jahre alt ist. Ferner tritt diese Form des Infarkts in der schwarzen sowie asiatischen Bevölkerung 2-3-mal häufiger auf. Den häufigsten Typ des hämorrhagischen Infarkts stellt die intrazerebrale Blutung (ICB) dar, welche für 10 % aller Schlaganfälle verantwortlich ist. Für 60 % dieser Blutungen ist ein arterieller Hypertonus ursächlich. Daneben zählen Koagulopathien (idiopathisch wie auch iatrogen hervorgerufen), Amyloidablagerungen bei älteren Menschen sowie gut vaskularisierte Metastasen, z. B. des malignen Melanoms oder Nierenzellkarzinoms, zu den Ursachen. Während die intrazerebrale Blutung größtenteils tief in den Hemisphären oder in den *Lobi parietales et occipitales* auftritt, entsteht die Subarachnoidalblutung (SAB) durch Rupturen von sakkulären, insbesondere an Gefäßbifurkationen gelegenen,

Aneurysmen. Insgesamt verursachen SAB 3-5 % aller Schlaganfälle. Ein besonderes Merkmal ist neben der Bevorzugung des weiblichen Geschlechts die Gefahr eines sekundären Infarkts durch Vasospasmen intrakranieller Gefäße in der späten Phase während der Behandlung einer SAB (3, 4).

Epidemiologisch gilt der Schlaganfall nicht nur als Hauptursache für Behinderung im Erwachsenenalter (5, 6), sondern repräsentiert auch den häufigsten Grund einer erworbenen Epilepsie im fortgeschrittenen Alter und bedingt am zweithäufigsten die Entwicklung einer Demenz (7). Jährlich erleiden weltweit 150-350/100.000 Menschen einen Schlaganfall (2), in Deutschland rechnet man mit einer Inzidenz von ca. 174/100.000, dem entsprechen 185.000 bis 220.000 Fälle pro Jahr (8). Betrachtet man Statistiken aus den Vereinigten Staaten von Amerika (USA), tritt ein Schlaganfall alle 40-45 Sekunden (s) auf. Während dort die Prävalenz der unter 40-Jährigen bei 0,5 % liegt, beträgt diese im Alter von 60-79 Jahren 6 % und steigt bis auf über 12 % bei den über 80-Jährigen (3). Vergleicht man Statistiken der Industrienationen miteinander, finden sich Inzidenzen bis zu 600/100.000 in Novosibirsk, Russland (9). Neben höheren Inzidenzzahlen, zeigen sich in Osteuropa auch schwerwiegendere Folgen eines Schlaganfalls im Vergleich zu den westeuropäischen Staaten (7). Generell lässt sich eine Altersabhängigkeit für das Auftreten eines Schlaganfalls feststellen. So sind mehr als 70-75 % der Patienten älter als 65 Jahre (6, 10). Im Jahr 2005 waren weltweit 6 Millionen (Mio.) Todesfälle auf einen Schlaganfall zurückzuführen, was einen relativen Anteil von ca. 10 % aller Todesfälle bedeutet (5). Demzufolge stellt die Erkrankung die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Ländern nach der koronaren Herzkrankheit (KHK) und Krebserkrankungen dar (5, 10). In der nächsten Dekade erwartet man zudem eine Steigerung der, auf einen Schlaganfall zurückzuführenden, Todesfälle um etwa 12 % (5). Zur Veranschaulichung des Sachverhaltes sei wiederholt auf die Statistiken der USA verwiesen, aus denen hervorgeht, dass alle 3-4 Minuten (min) ein Patient an einem Schlaganfall verstirbt, umgerechnet ergibt das eine Gesamtzahl von 150.000 Todesfällen pro Jahr (3). Im zeitlichen Verlauf versterben weltweit ein Viertel der Patienten nach einem Monat, ein Drittel nach 6 Monaten und die Hälfte innerhalb eines Jahres (9). In Deutschland sterben rund 15 % der Patienten innerhalb von 3 Monaten an den Folgen eines Schlaganfalls. Diese können in direktem Zusammenhang mit dem Infarkt stehen, insbesondere als vom Infarkt hervorgerufene ödematöse Raumforderung, oder sekundär zum Tode führen. Als sekundäre Ursachen hervorzuheben sind v. a. Pneumonie, Lungenarterienembolie, Einblutung und ein zweiter Schlaganfall (2). Eine zusätzliche Bedeutung erlangt der Schlaganfall unter gesundheitsökonomischen Aspekten. Keine Erkrankung erfordert sowohl in der stationären, als auch in der häuslichen Pflege einen größeren Aufwand (10). Weltweit sind 2-4 % aller Gesundheitskosten

auf die Folgen eines Schlaganfalls zurückzuführen, in den Industrienationen werden allein 4 % der Gesamtpflegekosten für die Versorgung von Schlaganfallpatienten aufgewendet (11). 2008 betragen die direkten medizinischen und indirekten, z. B. durch Produktivitätsausfall verursachten, Kosten in den USA rund 65,5 Milliarden (Mrd.) US-Dollar (3). Bis zum Jahr 2020 wird erwartet, dass die vom Gesundheitssystem zu tragenden Kosten der Schlaganfallnachsorge nach der KHK, Depression und Verkehrsunfällen an die vierte Stelle vorrücken (12). Zwar zeigt die Inzidenz schon seit langem eine fallende Tendenz, jedoch fällt die Mortalitätsrate im Vergleich dazu schneller und die Zahl der Überlebenden steigt in gleichem Maße. Somit ist in naher Zukunft mit steigenden Kosten und aufwendigerer Fürsorge zu rechnen (11). Derzeit beträgt die relative Zahl permanent behinderter Patienten 3 Monate nach Schlaganfall 15-30 %. 20 % nehmen professionelle Hilfe, beispielsweise in Form von institutioneller Fürsorge, in Anspruch (6). In Deutschland werden 650.000-945.000 Patienten aufgrund von Schlaganfallfolgen versorgt (8).

Der wichtigste Risikofaktor, unabhängig vom Typ des Schlaganfalls, ist der arterielle Bluthochdruck (3, 7, 13, 14). Zwischen dem Anstieg des arteriellen Drucks und der Risikoerhöhung besteht ein linearer Zusammenhang. So bedingt eine Erhöhung des Blutdrucks um 10 mmHg je nach Literatur eine Risikoerhöhung von 10-30 %. Liegt der Blutdruck dauerhaft über 120/80 mmHg, verdoppelt sich das Lebenszeitrisiko für das Auftreten eines Schlaganfalls (3, 13). Darüber hinaus spielen auch andere Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine wichtige Rolle. Leidet ein Patient an einer KHK, ist das Risiko für einen Schlaganfall 2-fach erhöht (3). Besteht dagegen ein VHF, verfünffacht sich das Risiko (3, 7, 14). Ferner kann eine hochgradige Karotisstenose das Risiko einer Minderperfusion des Gehirns erhöhen (3). In der Vergangenheit wurde oft über den Einfluss einer postmenopausalen Östrogensubstitution diskutiert. Viele Studien konnten zeigen, dass die Verwendung derartiger Präparate zu einem erhöhten Risiko führt (15, 16, 17). Ebenfalls kann Rauchen das Risiko für einen Schlaganfall steigern (3, 7, 14). Während das Risiko für einen ischämischen Insult 2-fach erhöht ist, findet sich für die SAB eine 3-fache Erhöhung sowohl beim männlichen, als auch weiblichen Geschlecht (18), auch Passivrauchen begünstigt das Entstehen eines Schlaganfalls (19). Eine tägliche Konsumierung von mehr als 60 g Alkohol führt ebenso zu einer Risikoerhöhung. Dagegen verringert sich das Auftreten von Hirninfarkten bei Verbrauch von weniger als 12 g pro Tag (3, 7, 14, 20). Weitere Faktoren, die nachweislich einen Schlaganfall begünstigen sind: Diabetes mellitus (D. m.) mit einer 1,8- bis 6-fachen Risikoerhöhung (3, 7, 13, 14), *Body Mass Index* (BMI) über 25 (21, 22), abdominelle Adipositas, metabolisches Syndrom (3, 14), Hypercholesterinämie (23), niedriges *high density lipoprotein* (HDL) bei Männern (24), geringe Einnahme von Vitamin D (25) und eine

Hyperhomocysteinämie (26). Demgegenüber senken körperliche Aktivität (7, 14, 27) und eine Ernährung mit viel Obst und Gemüse das Schlaganfallrisiko (28). Eine besondere Stellung hat in kürzerer Zeit die transitorisch ischämische Attacke (TIA) als eigenständiger Risikofaktor eingenommen. TIAs sind kurze, nicht länger als 24 h dauernde, Episoden, die durch ein neurologisches Defizit als Ergebnis einer fokalen zerebralen oder retinalen Ischämie gekennzeichnet sind. 85-95 % der Episoden halten weniger als 60 min an. Der übrige Anteil bildet sich innerhalb von 24 h zurück (3). Man geht davon aus, dass ca. 8 % der Patienten mit einer TIA in den folgenden 8-15 Tagen einen Schlaganfall erleiden, Innerhalb von 3 Monaten sind es 20 % (29). Umgekehrt geht 25 % aller Schlaganfälle innerhalb von 3 Monaten eine TIA voraus (30). Jährlich ist das relative Risiko für einen Insult nach einer TIA 2-5-fach erhöht (31). Analog zur TIA repräsentiert auch ein bereits überlebter Schlaganfall einen eigenständigen Risikofaktor. Nach einem Jahr erleiden 8-15 % der Überlebenden einen erneuten Schlaganfall, nach 5 Jahren sind es 30-40 %, nach 10 Jahren bereits 55 % (13).

### 1.1.2. Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Das menschliche Gehirn benötigt für seine Energiegewinnung pro Tag 75 Liter (l) molekularen Sauerstoff sowie 120 Gramm (g) Glukose. Obwohl der relative Anteil des Körpergewichts nur 2 % beträgt, beansprucht das Gehirn rund 20 % des Herzzeitvolumens bzw. des ganzkörperlichen Sauerstoffverbrauchs (2). Diese große Menge an Sauerstoff wird für die Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung benötigt. Rund 70 % dieser energiereichen Verbindungen werden für die Funktion der Natrium-Kalium-ATPase (Na-K-ATPase) verbraucht, um eine hohe intrazelluläre Konzentration von Kalium ( $K^+$ ) respektive eine niedrige intrazelluläre Konzentration von Natrium ( $Na^+$ ) und somit die Ionengradienten aufrecht zu erhalten. Diese sind für die Erzeugung von Aktionspotentialen erforderlich. Bei einer globalen Ischämie sind die ATP-Reserven bereits nach 2 min verbraucht (32), ein totaler Verschluss eines versorgenden Gefäßes führt nach 5-10 min zu einem irreversiblen Zelluntergang (33). Zur weiteren Veranschaulichung werden in der Literatur Angaben zum CBF gemacht. So erfolgt die Energiegewinnung der Neuronen ab einem Fluss von 0,35 ml/g/min durch anaerobe Glykolyse. Anoxische Depolarisationen entstehen aufgrund eines Zusammenbruchs des Energiehaushaltes unterhalb eines Flusses von 0,15 ml/g/min (34). Die hohe Geschwindigkeit des Untergangs von Neuronen und dementsprechend deren Vulnerabilität bei Hypoxie wird durch die Vorstellung illustriert, dass dies bei einem Infarkt mit einer durchschnittlichen Größe von 54 ml und einer durchschnittlichen Entwicklung innerhalb von 10 h ein Absterben von 1,9 Mio. Neuronen, 14

Mrd. Synapsen und eine Zerstörung von 12 Kilometern (km) myelinisierten Nervenfasern pro min bedeutet (2).

Voraussetzung für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen im Rahmen eines Schlaganfalls ist das Konzept der Penumbra. Astrup *et al.* erkannten, dass in der infarktbedingten Läsion verschiedene Areale voneinander abzugrenzen sind. Den ischämischen Kern umgibt demnach eine Zone, die zwar funktionell geschädigt, aber strukturell noch intakt ist. Die Bezeichnung entstand in Analogie zum Halbschatten um das Zentrum einer Sonnenfinsternis (35). Innerhalb des Kerns kommt es aufgrund der mangelnden Energiegewinnung zur massiven Störung metabolischer Prozesse, Verlust der Ionenhomöostase und der zellulären Integrität. Endpunkt dieser Ereignisse ist eine Nekrose des Gewebes innerhalb von Minuten. Dagegen besteht in der Penumbra eine leichtere Störung der zellulären Homöostase, sodass es zu einem langsameren Zelltod und damit einhergehend zu einer langsameren Vergrößerung der Läsion kommt (36). Der CBF beträgt im Kern durchschnittlich weniger als 10-25 % (10-12 ml/100g/min), demgegenüber bleibt in der Penumbra ein Fluss von rund 60 ml/g/min bestehen (32).

Aufgrund der Hypoxie innerhalb des Kerngebietes kommt es zu einer Störung der Funktion der Na-K-ATPase und infolgedessen zu einer mangelnden Aufrechterhaltung der Ionengradienten. Daraus resultiert eine Depolarisation der Plasmamembran und einer Aktivierung spannungsabhängiger Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Kanäle. Durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden exzitatorische Neurotransmitter, vor allem Glutamat, freigesetzt. Im nicht ischämischen Gehirn werden Glutamatmoleküle über Transporter, insbesondere über einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen sekundär aktiven Transport, sowohl prä- und postsynaptisch, als auch durch Astrozyten aufgenommen. Infolge der steigenden intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration kommt es zu einer Aufhebung dieses Transports und konsekutiv zu einer Akkumulation im extrazellulären Raum. Dort bindet Glutamat an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-,  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure (AMPA)- und Kainatrezeptoren. Diese ionotropen Rezeptoren sind mit einem Ionenkanal gekoppelt, der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -durchgängig ist. Bedingt durch die hohe extrazelluläre Glutamatkonzentration und Überaktivierung der Rezeptoren erhöht sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weiter. In der Folge werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen, Lipasen und DNasen aktiviert. Das im Rahmen der anaeroben Glykolyse gebildete Laktat bewirkt über eine pH-Absenkung in Richtung Azidose eine weitere Hemmung der Na-K-ATPase. Daneben kommt es zu einem passiven Einstrom von Wasser und einem Gewebsödem. Resultierend aus dem Hyperkatabolismus und der Ödembedingten osmotischen Lyse (Nekrose) geht ein Großteil der Zellen unter. Dieser aufgrund der Überaktivierung hervorgerufene Prozess wird unter dem Begriff der Exzitotoxizität zusammen-

gefasst (32, 33, 34, 36). Die hohen extrazellulären Konzentrationen von Glutamat und  $K^+$  führen zu einer Diffusion dieser Moleküle in die Penumbra. Dort rufen sie vereinzelte exzitatorische und elektrochemische Depolarisationen hervor. Im Gegensatz zum Kern sind die Zellen der Penumbra noch in der Lage, durch Repolarisation das Ruhepotential wiederherzustellen. Dennoch bedeutet dies einen zusätzlichen Verbrauch energiereicher Verbindungen, sodass diese Peri-Infarkt-Depolarisationen zu einer Ausdehnung des Kerns beitragen können.

Als Ergebnis der Ischämie kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zu den wichtigsten gehören Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylgruppen-tragende Radikale. ROS können mit beliebigen Bestandteilen der Zelle reagieren und eine Schädigung hervorrufen. Eine Schlüsselstellung nimmt dabei das Superoxid ein. Durch Reaktion mit Stickoxid (NO) wird das besonders zellschädigende Peroxynitrit gebildet. Zudem aktiviert dieses Reaktionsprodukt  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Formen der NO-Synthase (NOS). Im Gegensatz zur endothelialen NOS (eNOS), die eine Vasodilatation vermittelt, rufen die neuronale (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) eine Verstärkung der NMDA-Rezeptor-abhängigen Exzitotoxizität und die Bildung von Peroxynitrit hervor (36). Des Weiteren aktiviert NO die Poly(ADP)Ribose-Polymerase 1 (PARP 1), die unter Verbrauch von ATP die Umsetzung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid ( $NAD^+$ ) zu Nicotinsäureamid katalysiert. Diese Umsetzung entzieht wichtigen Stoffwechselschritten, z. B. der anaeroben Glykolyse, das notwendige  $NAD^+$ . Ferner führt NO über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BBB). Überdies schädigen ROS die innere Mitochondrienmembran, wodurch die Permeabilität gesteigert wird. In der Folge kann das Potential über der Membran nicht aufrecht erhalten werden; die oxidative Phosphorylierung wird entkoppelt. Durch die Schwellung der Mitochondrien wird die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran gestört. Über die Bildung einer mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore werden proapoptotische Moleküle in das Zytosol freigesetzt. Andere Zellorganellen, wie das endoplasmatische Retikulum (ER) werden ebenfalls geschädigt. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER und einer Aktivierung der Proteinkinase R, was eine Hemmung der Proteinsynthese auf Translations-ebene zur Folge hat (34).

Während der Großteil der Zellen im Kern durch Nekrosen untergeht, findet in der Penumbra vielmehr der Ablauf der Apoptose, d. h. des programmierten Zelltodes, statt und dauert bis zu Tagen, während die Zellen im Kern innerhalb von Minuten absterben. Unter dem programmierten Zelltod versteht man eine biochemische Kaskade, die in der Aktivierung von Caspasen endet. Diese sind Enzyme, die die Zerstörung der Zelle katalysieren. Neben der extrinsischen Aktivierung über den Fas-Rezeptor, z. B. durch Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), kann die

Kaskade auch intrinsisch durch hohe Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, Glutamat oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung initialisiert werden. Letztlich führen beide Wege zu einer Schädigung der Mitochondrienmembran, was die Freisetzung von Cytochrom C bewirkt. Zusammen mit zytosolischem Apaf 1, Caspase 9-*Precursorprotein* und ATP bildet Cytochrom C das Apoptosom. Die Freisetzung von Cytochrom C ist zudem abhängig von Proteinen der Bcl-2-Familie, die zum einen proapoptotisch (Bid, Bax, Bad, Bag), zum anderen antiapoptotisch (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) wirken können. Durch limitierte Proteolyse erfolgt die Aktivierung der Caspasen, deren wichtigste die Caspase 3 ist.

Gegenwärtige Studien konnten zeigen, dass inflammatorische Mechanismen die Entwicklung und das Fortschreiten eines Infarkts beeinflussen. In den ersten Stunden nach Schlaganfallbeginn werden vermehrt Adäsionsmoleküle wie *InterCellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) exprimiert, was Leukozyten durch Wechselwirkung mit Integrinen auf der Zelloberfläche ermöglicht, aus den Blutgefäßen in das Hirnparenchym zu transmigrieren. Die erste anzutreffende Population weißer Blutkörperchen stellen die neutrophilen Granulozyten dar. Mittels Bildung von ROS und proteolytischen Enzymen führen sie zu einer weiteren Schädigung der Neuronen. Daneben können Neutrophile auch kleine Mikrogefäße in der Penumbra okkludieren und somit die Versorgung mit Sauerstoff stören. Sowohl Granulozyten, als auch Makrophagen und Lymphozyten tragen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (Il-1), Interleukin-6 (Il-6) oder TNF- $\alpha$  und antiinflammatorische Zytokinen wie *Transforming Growth Factor- $\beta$  1* (TGF- $\beta$  1) und Interleukin-10 (Il-10) bei. Darüber hinaus kommt es zur Bildung von Chemokinen wie *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) und *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*. Il-1 beeinflusst das Infarktgeschehen u. a. durch Fieberentstehung, Arachidonsäurefreisetzung, Verstärkung NMDA-abhängiger Exzitotoxizität und NO-Synthesestimulation. Zwar sind hohe Level von Il-6 mit einem größeren Infarktvolumen verbunden, jedoch kann es auch die Bildung eines Il-1-Rezeptorantagonisten (Il-1-Ra) induzieren, sodass die genaue Stellung dieses Zytokins, den Schlaganfall betreffend, noch ungewiss bleibt. TNF- $\alpha$  verursacht eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen, induziert die Bildung anderer proinflammatorischer Zytokine und akuter Phase-Proteine. Dagegen zeigte sich TGF- $\beta$  als neuroprotektiv im Zusammenhang mit einem Schlaganfall. Mikroglia, die primären Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS), produzieren sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Zytokine. Neben der Bildung von Zytokinen und Chemokinen induzieren Leukozyten die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche durch Bildung freier Radikale und Prostaglandine eine weitere Schädigung des Parenchyms hervorrufen kann (32, 33, 36).

Im Zusammenhang mit inflammatorischen Wirkungen auf den Schlaganfall konnte auch eine umgekehrte Beeinflussung beobachtet werden. In der Folge eines Infarktes kommt es durch Überaktivierung des Sympathikus, eine schwere und anhaltende Lymphopenie, eine gestörte Monozyten- und Lymphozytenfunktion sowie eine gestörte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Sekretion zu einer Schlaganfall-induzierten Depression des Immunsystems, die sich insbesondere durch eine Infektanfälligkeit und einer damit zusammenhängenden höheren Mortalität auszeichnet (36).

### 1.1.3. Therapie und Prävention des akuten ischämischen Schlaganfalls

Das Konzept der Penumbra hat die Vorstellung und die Therapiestrategien des akuten Schlaganfalls wesentlich beeinflusst. In der heutigen Zeit wird versucht, die Perfusion in der Penumbra schnellstmöglich wiederherzustellen und den infarktbedingten Schaden zu begrenzen (37). Die Reperfusion des verschlossenen Gefäßes im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls wird versucht durch eine systemische Thrombolyse mittels rekombinatem Gewebsplasminogenaktivator (rt-PA) zu erreichen. Für diese Form der Rekanalisation ist es erforderlich, innerhalb eines Intervalls von 3 bis 6 h mit der Thrombolyse zu beginnen. Grundlage dessen sind mehrere Studien, die eine Wirksamkeit sowohl für ein 3 h- (38), als auch ein 6 h-Interwall belegen (39, 40, 41). Neben rt-PA werden auch neuere Thrombolytika auf ihre Wirksamkeit untersucht. Dazu gehören Tenecteplase und Desmetopase (42), welches sich aus einer Substanz aus dem Speichel der Fledermaus *Desmodus rotundus* ableitet (4). Weiterhin werden alternative Strategien erprobt, zu denen die lokale arterielle Thrombolyse mit Pro-Urokinase (37) oder ein *Bridging*-Verfahren gehören. Letzteres kombiniert die lokale und systemische Thrombolyse (43). Unter der Vorstellung, dass die Thrombolyse selbst eine Thrombozytenaktivierung hervorruft und bei erfolgreicher Auflösung eines Thrombus die darunterliegende thrombozytenaktivierende Gefäßoberfläche freigelegt wird, scheint eine medikamentös herbeigeführte Hemmung der Thrombozytenaggregation ebenfalls ein viel versprechender Ansatzpunkt zu sein. Einige Studien mit Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten wie Abciximab und Tirofiban, die die Aggregation durch Hemmung der Bindung von Fibrin an Thrombozyten verhindern, konnten eine Wirksamkeit nachweisen (44, 45). Ferner versprechen Studien mit niederfrequentem Ultraschall (2 MHz) und gleichzeitiger Thrombolyse eine erhöhte Rekanalisierungsrate (46, 47). Eine Erweiterung dieses Verfahrens ist die Verwendung von Galaktose-basierten *Microbubbles*, wodurch eine Wirkungsverstärkung des Ultraschalls erreicht wird (48). Für die Etablierung dieser neuen Ansätze in der Schlaganfallbehandlung fehlt dennoch eine ausreichende Menge an Daten.

Durch das zunehmende Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Bereich der Penumbra wurden viele Ansätze zur Neuroprotektion verfolgt. In der Literatur wird diese als jede Intervention definiert, welche die Sequenz jener schädigender biochemischer und molekularer Vorgänge antagonisiert, unterbricht oder verlangsamt, die andernfalls in einer irreversiblen ischämisch bedingten Schädigung resultieren würde (49). In den meisten Fällen wird versucht, pharmakologisch in das Geschehen einzugreifen. So wurden Glutamat-Antagonisten, antiinflammatorische Substanzen, Radikalfänger, Ionenkanalblocker,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Modulatoren, Serotonin-Antagonisten, Caspase-Inhibitoren oder neurotrophe Faktoren auf ihre Wirksamkeit untersucht. Obwohl in den *in vitro*-Experimenten und auch in Tiermodellen sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, konnte eine Übertragung auf den Menschen durch klinische Studien bisher nicht ausreichend belegt werden (37).

Eine Verbesserung der Patientenversorgung in der Akuttherapie stellte die Einführung spezieller Schlaganfalleinheiten, sogenannter *stroke units*, dar. Diese verfügen idealerweise über einen 24-stündigen Schichtbetrieb, speziell geschultes ärztliches und pflegerisches Personal und speziellen infrastrukturellen Voraussetzungen wie z. B. neurovaskuläre Ultraschalldiagnostik, 24 h-CT-Bereitschaft oder kontinuierliches Vitalparametermonitoring. Durch die Einführung konnte eine 6,5 %-ige absolute Risikoreduktion für Tod und Behinderung erreicht werden (37). Zu den allgemeinen Therapieansätzen im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls zählen die Verminderung hoher Blutzuckerwerte (50, 51) und einer Hyperthermie (52). Beide Faktoren sind mit einem schlechteren *Outcome* verbunden. Den Blutdruck betreffend sollte ein systolischer Wert bis 180 mmHg toleriert werden. Zu niedrige Werte sind mit einer schlechteren Perfusion noch vitaler Hirnareale und somit ebenfalls mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert (53).

Eine weitaus größere Bedeutung als der Akuttherapie des Schlaganfalls, wird der Prävention zerebrovaskulärer Ereignisse beigemessen. Im Rahmen der Primärprävention wird versucht den primären Eintritt einer Erkrankung, insbesondere durch Beseitigung bzw. Behandlung von Risikofaktoren, zu verhindern. Dagegen ist das Ziel der Sekundärprävention, im Falle des Schlaganfalls, das wiederholte Auftreten eines Infarktes zu vermeiden. Die wichtigste Rolle in der Primärprävention trägt die Behandlung eines bestehenden arteriellen Hypertonus, dem wichtigsten Risikofaktor. Zur Verfügung stehen u. a. *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren), Angiotensin-Rezeptortyp 1-Blocker (ARBs),  $\beta$ -Blocker, Diuretika und Calciumantagonisten. Dabei scheint die Wahl des Antihypertensivums nach aktueller Datenlage weniger entscheidend zu sein als die effektive Blutdrucksenkung (13). Eine Reduktion des Blutdrucks, im günstigsten Fall unter 140/85 mmHg, führt, abhängig vom Grad der Senkung, zu einer signifikanten Reduktion von Schlaganfällen (54, 55, 56). Obwohl ein existierender D. m.

das Risiko eines Schlaganfalls erhöht, führt eine konsequente Einstellung der Blutzuckerwerte nicht zu einer Risikoreduktion (57). Dennoch sollte bei Diabetikern die Blutdruckeinstellung im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aggressiver erfolgen (58). Dagegen kann mittels Statinen die Behandlung einer Hypercholesterinämie zu einer verringerten Anzahl vor allem nicht-fataler Insulte führen (59, 60). Des Weiteren wird durch vermehrte körperliche Aktivität (27), Aufgabe des Rauchens (18) und hohen Anteil von Obst und Gemüse in der Ernährung eine niedrigere Inzidenz von Schlaganfällen erreicht (28). Demgegenüber konnte keine Wirkung einer Körpergewichtssenkung (61) oder Vitamin D-Substitution auf die Schlaganfallinzidenz gezeigt werden (62). Ein großes Streitthema ist der Einsatz antithrombotischer Medikamente im Rahmen der Infarktprophylaxe. Studien konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure (ASS) bei Frauen im Alter von 45 Jahren und älter sowie niedrigem Risiko eine leichte Reduktion der Schlaganfallzahl zu Folge hat. Dagegen fand man bei Männern keine solche Tendenz (63). Besteht ein höheres kardiovaskuläres Risiko, hat eine prophylaktische ASS-Gabe keinen Nutzen (64). Ein anderes Bild zeigt sich bei der Behandlung des VHF. Im Alter unter 65 Jahren ohne Risikofaktoren verringert eine Medikation mit ASS die Anzahl von Insulten (65), bestehen Risikofaktoren wie hoher Blutdruck, linksventrikuläre Dysfunktion, D. m., ein Zustand nach vorheriger systemischer Embolie oder ein Alter über 75 Jahren, profitieren die Patienten von einer oralen Antikoagulation (OAK). Im Alter zwischen 65 und 75 kann je nach Risikoprofil des Patienten die Gabe von ASS oder eine OAK das Risiko senken (66). Eine operative Versorgung einer asymptomatischen Karotisstenose senkt das Risiko eines Schlaganfalls zwar auf 1 % pro Jahr, jedoch führt die perioperative Letalität von 3 % insgesamt nicht zu einer Empfehlung des Verfahrens (67, 68).

Analog zur Primärprävention reduziert, wie durch viele Studien belegt, eine Blutdrucksenkung auch das Wiederauftreten eines Schlaganfall (69, 70, 71). Im Gegensatz zur Primärprävention scheint der Einsatz von ACE-Inhibitoren und ARBs aufgrund Blutdruck-unabhängiger Effekte günstiger zu sein (72, 73, 74, 75). Weiterhin zeigen die Behandlung eines D. m. (76) sowie die Behandlung einer Hypercholesterinämie (insbesondere bei nicht-embolischen Infarkten) einen positiven Effekt auf die Reinfarktinzidenz (60). Die Studienlage zum Einsatz antithrombotischer Pharmaka im Rahmen der Sekundärprävention ist eindeutiger als in der Primärprävention. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl wiederholter Schlaganfälle durch Gabe von ASS (77, 78, 79, 80), Clopidogrel (81), Dipyridamol (82) und Trifusal (83) verringert werden kann. Im Falle eines bestehenden VHF bewirkt eine OAK ebenfalls eine Risikoreduktion (84). Außerdem ist auch ein verringertes Risiko bei 70-99 %-igen Karotisstenosen durch eine Karotisendarteriektomie belegt (85, 86), nach Intervention bei einer Stenose unter 50 % wird

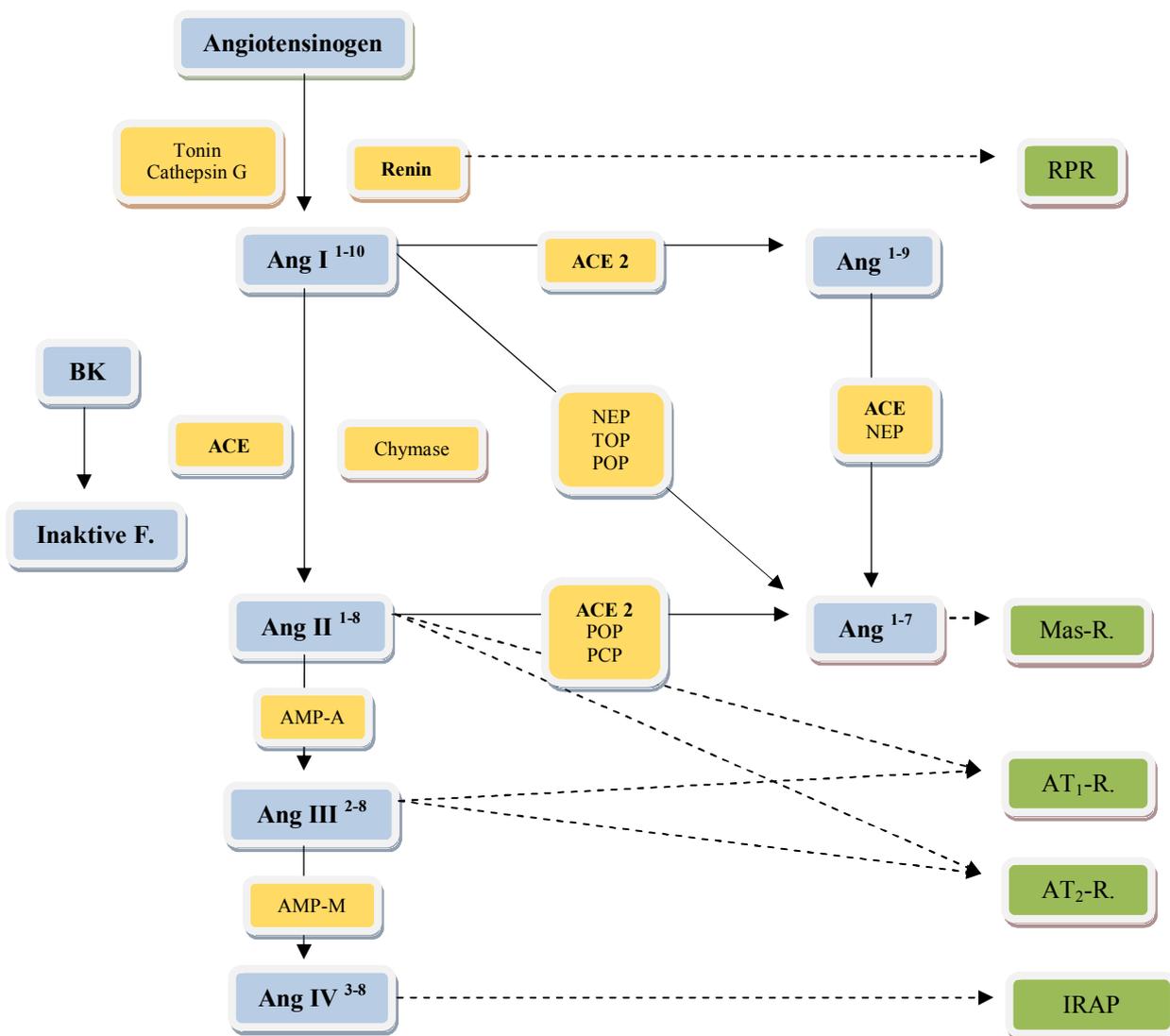
keine geringere Schlaganfallinzidenz beobachtet (85). Dagegen gibt es für die perkutane transluminale Angioplaste (PTA) der Karotis noch keine eindeutigen Daten (7, 87).

### 1.2. Renin-Angiotensin-System

#### 1.2.1. Physiologie und Pathophysiologie des Renin-Angiotensin-Systems

Die ersten Erkenntnisse, das Renin-Angiotensin-Systems (RAS) betreffend, gehen auf Arbeiten des finnischen Physiologen Robert Tigerstedt und seines schwedischen studentischen Mitarbeiters Per Bergman zurück. 1898 veröffentlichten sie in ihrer Publikation „Niere und Kreislauf“ die Ergebnisse aus den Jahren 1896-97, in denen sie von einer Erhöhung des Blutdruckes berichteten, wenn einem gesunden Kaninchen Nierenextrakte aus einem anderen gesunden Kaninchen injiziert werden. Darüber hinaus stellten sie fest, dass die Injektion renal-venösen Blutes in nephrektomierten Tieren ebenfalls eine Steigerung des Blutdruckes zu Folge hat. Daraus schlossen die Wissenschaftler, dass es in der Niere eine Substanz geben muss, die für die Blutdrucksteigerung verantwortlich ist und nannten diese der Herkunft wegen Renin (88). In den folgenden Jahren konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden. Erst als Goldblatt *et al.* 1934 das erste erfolgreiche Modell zur künstlichen Erzeugung eines Bluthochdrucks entwickelten, wurden weitere Fortschritte erzielt. So begannen 1936 2 Gruppen von Wissenschaftlern unabhängig voneinander in Buenos Aires, Argentinien, unter der Leitung von Eduardo Braun-Memendez sowie in Indianapolis, USA, unter der Leitung von Irving H. Page weitere Untersuchungen und entdeckten im Verlauf ihrer Arbeiten eine Substanz, die ähnliche Wirkungen wie das beschriebene Renin hervorrief. Nach erfolgreicher Isolierung wurde die Substanz in Buenos Aires Hypertensin, in den USA Angiotonin bezeichnet; 1958 einigte man sich auf die Bezeichnung Angiotensin. Für einen weiteren großen Schritt für das Verständnis des RAS sorgte Leonard Skeggs, als er 1954 erstmals die Umwandlung von Angiotensin I (Ang I) zu Angiotensin II (Ang II) durch das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) beschrieb (89, 90, 91). Nach gegenwärtigen Vorstellungen, die in Abbildung (Abb.) 1-1. illustriert sind, wird Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere durch Stimuli, wie Erniedrigungen von Blutdruck, Blutvolumen und  $\text{Na}^+$ -Konzentration, sowie durch eine erhöhte sympathische Aktivierung freigesetzt. Im Plasma spaltet Renin die ersten 10 Aminosäuren (AS) von Angiotensinogen (AGT), einem in der Leber synthetisierten, glykosylierten  $\alpha$ 2-Globulin, ab, infolgedessen das Dekapeptid Ang I entsteht. Durch das ACE, welches als Zink-Metalloproteinase fungiert und insbesondere an

den Membranen vaskulärer Endothelzellen gebunden vorliegt, wird das C-terminale Dipeptid Histidin-Leucin von Ang I unter Bildung des Oktapeptids Ang II abgespalten. Neben Ang I metabolisiert das ACE auch andere Substrate wie Bradykinin (BK), Substanz P, Luteinisierendes Hormon-*releasing* Hormon, Enkephaline oder die  $\beta$ -Kette des Insulins. In diesen Fällen erfolgt aber keine Aktivierung, sondern ein Abbau bzw. eine Inaktivierung der Substanzen. Ang II werden die wesentlichen klinischen Wirkungen des RAS zugesprochen. Diese werden durch Bindung des Moleküls an 2 verschiedene Rezeptoren hervorgerufen. Neben dem Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-R.), der den Großteil der klinisch fassbaren Wirkungen vermittelt, bindet Ang II auch an den Angiotensin II-Typ-2-Rezeptor (AT<sub>2</sub>-R.).



**Abbildung 1-1.** Schematische Darstellung der heutigen Ansicht des RAS modifiziert nach Fyhrquist und Saijonmaa (92). Blauer Hintergrund: Effektoren des RAS, gelber Hintergrund: beteiligte Enzyme, grüner Hintergrund: beteiligte Rezeptoren; Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; Ang III: Angiotensin III; Ang IV: Angiotensin IV; Ang<sup>1-9</sup>: Angiotensin 1-9; Ang<sup>1-7</sup>: Angiotensin 1-7; BK: Bradykinin; Inaktive F.: Inaktive Fragmente; ACE: *Angiotensin-Converting-Enzyme*; ACE 2: *Angiotensin-Converting-Enzyme 2*; AMP-A: Aminopeptidase A; AMP-M: Aminopeptidase M; NEP: neutrale Endopeptidase (Neprilysin); PCP: Prolyl-Carboxypeptidase; POP: Prolyl-Oligopeptidase; TOP: Thimet-Oligopeptidase; RPR: Renin/Proreninrezeptor; Mas-R.: Mas-Onkogen-Rezeptor; AT<sub>1</sub>-R.: Angiotensin-Typ-1-Rezeptor; AT<sub>2</sub>-R.: Angiotensin-Typ-2-Rezeptor; IRAP.: *Insulin Regulated Amino peptidase*

Zu den Hauptaufgaben des RAS gehören die Aufrechterhaltung und Regulation des Blutdrucks sowie des Wasser- und Elektrolythaushalts (93). Im Gefäßsystem verengt Ang II beispielsweise über AT<sub>1</sub>-R. die Gefäße (94), verstärkt die Noradrenalin (NA)-Freisetzung der Nervenendigungen an glatten Muskelzellen und verstärkt die Antwort der glatten Muskulatur auf NA (95). Letztlich führen die genannten Mechanismen zu einem Anstieg des Blutdrucks. Des Weiteren...

ren führt Ang II zu einer Freisetzung von Aldosteron aus der *Zona glomerulosa* der Nebenniere. Im distalen Tubulus und in den Sammelrohren der Niere induziert Aldosteron die Expression von luminalen epithelialen Natriumkanälen sowie der basolateralen Na-K-ATPase und vermittelt auf diesem Weg eine gesteigerte Na<sup>+</sup>-Rückresorption (96). Ang II wirkt im Rahmen des Wasser- und Elektrolythaushaltes auch direkt an der Niere. Durch Verengung afferenter respektive efferenter Arteriolen oder Herabsetzung des medullären Blutflusses nimmt es Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsrate. In der Neurohypophyse bewirkt Ang II eine vermehrte Sekretion von antidiuretischem Hormon (ADH), welches durch die Induktion von Aquaporinen in den Sammelrohren der Niere zu einer Steigerung der Wasserreabsorption führt (93). Neben diesen Hauptaufgaben wurden in den vergangenen Jahren weitere, Blutdruck-unabhängige Wirkungen beschrieben, z. B. die Beeinflussung von inflammatorischen, fibrotischen Prozessen oder Zellwachstum (97). Unter 1.2.2. wird detaillierter auf derartige Wirkungen eingegangen.

Während das RAS unter physiologischen Umständen einen ausgeglichenen Wasser- und Elektrolythaushalt sowie die Aufrechterhaltung des Blutdrucks gewährleistet, kann eine Überaktivierung des RAS die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus verursachen und Organschäden begünstigen. So kann die Überaktivierung und der damit verbundene Bluthochdruck Folge einer Nierenarterienstenose oder von Parenchymerkrankungen der Niere, beispielsweise einer chronischen Glomerulonephritis, sein. Man spricht in diesem Falle von einem sekundären Hypertonus (98). Bei einem essentiellen Hypertonus würde man niedrige Reninwerte aufgrund der ungestörten, wenn nicht gesteigerten, Nierenperfusion erwarten. Dies trifft jedoch nur bei rund einem Drittel der Patienten zu. Als mögliche Ursachen sieht man einen erhöhten Sympathikotonus, eine defekte Feedback-Schleife innerhalb des RAS oder eine Subpopulation ischämischer Nephrons, die durch eine erhöhte Reninsekretion eine Perfusionssteigerung zu erreichen versuchen (99). Zu anderen Veränderungen, die mit einer pathologisch erhöhten Aktivierung des RAS verbunden sind, zählen ein größeres Media/Lumen-Verhältnis der Gefäße aufgrund vermehrter Bildung von Wachstumsfaktoren, z. B. *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), eine Aktivierung der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase mit konsekutiver ROS-Bildung und Begünstigung lokaler proinflammatorischer Prozesse und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NFκB) sowie eine kardiale Hypertrophie, kardiale Fibrose und eingeschränkte linksventrikuläre diastolische Relaxation. In der Niere kann eine überschießende Antwort des RAS Arteriolenverdickungen, fibrinoide Ablagerungen in den Glomeruli, eine Proteinurie und proinflammatorische Prozesse hervorrufen (93).

Die bisher dargelegten Aspekte des RAS wurden in den letzten Jahren durch weitere Erkenntnisse erweitert. Ang II wird über Aminopeptidasen in Angiotensin III (Ang III) bzw. Angiotensin 2-8 (Ang<sup>2-8</sup>) umgewandelt. Aufgrund der Tatsache, dass Ang<sup>2-8</sup> seine Wirkungen wie Ang II über den AT<sub>1</sub>-R. und AT<sub>2</sub>-R. entfaltet, sind die Wirkungen ähnlich. Dennoch scheint der Großteil der AT<sub>1</sub>-R.-abhängigen Effekte durch Ang II verursacht zu werden, da der Abbau von Ang<sup>2-8</sup> 5-mal schneller erfolgt als der von Ang II. Ang III wird wiederum durch Aminopeptidasen zu Angiotensin IV (Ang IV) bzw. Angiotensin 3-8 (Ang<sup>3-8</sup>) verstoffwechselt. Als Rezeptor dieses Angiotensins wurde die *Insulin Regulated Aminopeptidase* (IRAP) identifiziert (92). Die über diesen Rezeptor vermittelten Wirkungen werden unter 1.2.2. beschrieben. Im Jahr 2000 wurde von 2 unabhängig voneinander arbeitenden Arbeitsgruppen mit dem *Angiotensin-Converting-Enzyme 2* (ACE 2) ein weiterer Bestandteil des RAS entdeckt (100, 101). Diese Carboxypeptidase spaltet Angiotensin 1-9 (Ang<sup>1-9</sup>) von Ang I sowie in weitaus größerem Maße Angiotensin 1-7 (Ang<sup>1-7</sup>) von Ang II ab und liegt insbesondere in Nieren, Herz, Hypothalamus, Hoden und der Aortenwand in höherer Konzentration vor. Derzeit wird das ACE 2 als Gegenspieler des ACE gesehen und stellt ein potentiell Ziel von Pharmaka dar (92). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das ACE 2 ein Rezeptor des *Severe Acute Respiratory Syndrom*-Coronavirus ist und eine verminderte Aktivität des Enzyms im Rahmen einer Infektion zu einer Lungenschädigung beitragen kann (102). Neben ACE 2 scheint auch Ang<sup>1-7</sup> ein Gegengewicht zu den klassischen Wirkungen des RAS darzustellen. Außer dem schon beschriebenen Bildungsmechanismus kann Ang<sup>1-7</sup> aus Ang<sup>1-9</sup> durch das ACE oder direkt aus Ang I mit Hilfe verschiedener Peptidasen umgewandelt werden. Seine Wirkungen vermittelt Ang<sup>1-7</sup> über den Mas Onkogen-Rezeptor (Mas-R.) (siehe 1.2.2.).

Ursprünglich ging man nur von einem zirkulierenden RAS aus. Mit der Entdeckung lokaler RAS Anfang der 90-er Jahre wurde diese Ansicht verworfen. Während in einigen Organen, wie dem Gehirn oder den Nebennieren, die lokalen RAS unabhängig vom zirkulierenden RAS fungieren, sind in anderen Organen, z. B. im Herz oder in den Nieren, die Wirkungen eng mit denen des zirkulierenden RAS verknüpft. Durch diese neuen Erkenntnisse zeigt sich das RAS nicht nur als endokrines, sondern auch als parakrines System (92). Darüber hinaus gibt es Hinweise für ein intrazelluläres RAS, für dessen Verständnis es weitere experimentelle Studien bedarf (103).

### 1.2.2. Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Systems

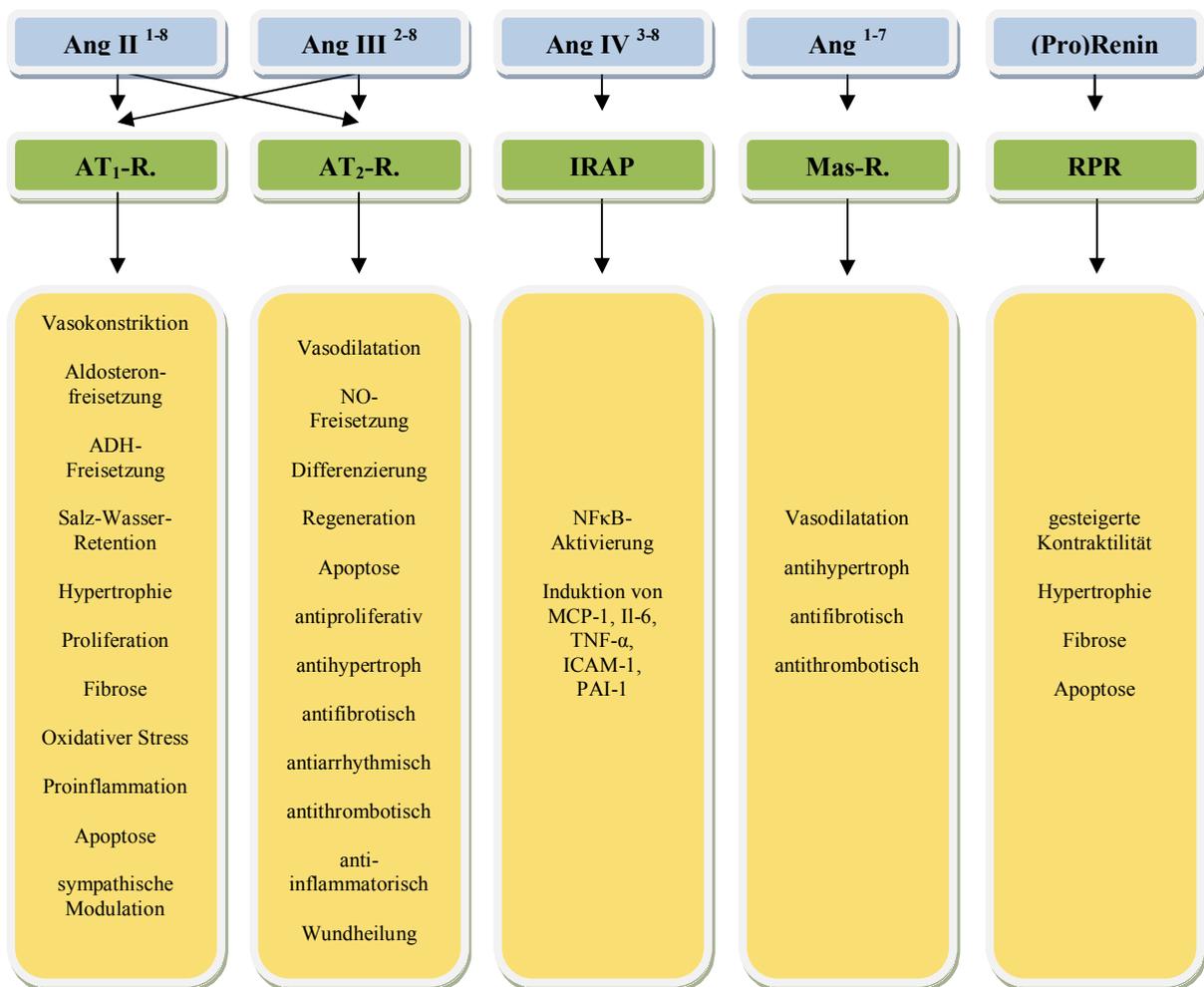
#### 1.2.2.1. Angiotensin-Typ-1-Rezeptor

Der AT<sub>1</sub>-R. vermittelt die Hauptwirkungen von Ang II und Ang III und ist von den bekannten Rezeptoren innerhalb des RAS am besten untersucht (92). Das Gen des AT<sub>1</sub>-R. liegt auf Chromosom 3q22 und kodiert für ein 359 AS-großes Protein, was die Funktion eines heptahelikalen, G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptors trägt (104). Hohe Konzentrationen dieses Rezeptors finden sich an glatten Muskelzellen und der Adventitia von Blutgefäßen (105), in den Interlobärarterien, dem tubulointerstitiellen Bindegewebe sowie in den kortikal gelegenen Tubuli der Niere (106), im *Endometrium* (107), im Gastrointestinaltrakt (93), an glatten Muskelzellen und Makrophagen in der Lunge (108), auf Vorstufen roter Blutkörperchen, auf Follikulostellarzellen der Leber (109) oder in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde (110). Des Weiteren wird der AT<sub>1</sub>-R. auch im Gehirn in der *Substantia nigra*, dem *Nucleus* (Ncl.) *caudatus* und der Adventitia hirnversorgender Gefäße exprimiert, weswegen eine Rolle von Ang II als Neuromodulator und Neurotransmitter im ZNS diskutiert wird (105).

Nach Bindung eines Liganden erfolgt unter Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die Hydrolyse von Phosphatidylinositol zu Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). IP<sub>3</sub> setzt Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern frei, welches zu einer Kontraktion glatter Muskulatur führt und wie DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Diese beeinflusst neben Kontraktionsabläufen auch zelluläres Wachstum. Darüber hinaus werden über den Rezeptor Tyrosinkinasen aktiviert, die durch Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen, wie den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), und der Translokation dieser Proteine in den Zellkern, Prozesse wie zelluläres Wachstum, Apoptose, Differenzierung und Transformation beeinflusst (111). Ein weiterer Signalweg führt über den Mechanismus der Janus-Kinase/*Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK/STAT)-Transduktion, welche insbesondere das Zellwachstum und die Zellproliferation reguliert. Im Gehirn sind als Vertreter dieses Signalweges c-Fos und c-Jun am bedeutsamsten (112, 113). Andere durch den Rezeptor vermittelte zellbiologische Wirkungen sind die Aktivierung der Phospholipase A 2 (PLA 2), welche Arachidonsäure aus Phospholipiden freisetzt und damit Einfluss auf den Stoffwechsel der Prostaglandine und Eikosanoide nimmt sowie die Aktivierung der NADPH-Oxidase, die mit der Bildung von ROS zellschädigende und proinflammatorische Abläufe begünstigt (114, 115).

## Einleitung

Die wesentlichen Wirkungen, die durch den AT<sub>1</sub>-R. hervorgerufen werden, sind in Abb. 1-2. illustriert. Aus dieser Abbildung geht ferner hervor, dass Ang II und Ang III über den AT<sub>1</sub>-R. viele Blutdruck-unabhängige Wirkungen entfalten. Neben den genannten seien als Beispiele die Begünstigung einer Glomerulosklerose (116), Arrhythmien (117), Thrombosen durch Stimulation des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (118) oder die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten durch Stimulation der MCP-1-Expression (119). Überdies beeinflusst die Aktivierung des RAS über den AT<sub>1</sub>-R. auch mittels anderer Wege Zellwachstum, Zelladhäsion, Zellmigration, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Gewebe-Remodelling, Zellreparatur, und Atherosklerose. So führt die Aktivierung des AT<sub>1</sub>-R. zu einer gesteigerten Expression von PDGF, TGF-β, bFGF, *Epidermal Growth Factor*, *Insulin like Growth Factor-1*, *Platelet Activating Factor* (120, 121), Endothelin-1, der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie von TNF-α (119).



**Abbildung 1-2.** Übersicht über die Rezeptor-vermittelten Wirkungen der Effektoren des RAS; modifiziert nach Fyhrquist und Saijonmaa (92). Blauer Hintergrund: Effektoren des RAS, grüner Hintergrund: beteiligte Rezeptoren, gelber Hinter-

grund: Wirkungen, Ang I: Angiotensin I; Ang II: Angiotensin II; Ang III: Angiotensin III; Ang IV: Angiotensin IV; Ang<sup>1-9</sup>: Angiotensin 1-9; Ang<sup>1-7</sup>: Angiotensin 1-7; AT<sub>1</sub>-R.: Angiotensin-Typ-1-Rezeptor; AT<sub>2</sub>-R.: Angiotensin-Typ-2-Rezeptor; IRAP.: *Insulin Regulated Aminopeptidase*; Mas-R.: Mas-Onkogen-Rezeptor; RPR: Renin/Proreninrezeptor, ADH: antidiuretisches Hormon, NO: Stickoxid, NFκB: *Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*, MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1*, Il-6: Interleukin 6, TNF-α: Tumor-Nekrose-Faktor α, ICAM-1: *InterCellular Adhesion Molecule-1*, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

### 1.2.2.2. Angiotensin-Typ-2-Rezeptor

Weit weniger ist bisher über den AT<sub>2</sub>-R. bekannt, dessen kodierendes Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms liegt (Xq22-q23) (93). Zwischen dem AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-R. bestehen rund 32-34 % Sequenzhomologie. Ähnlich wie beim AT<sub>1</sub>-R. handelt es sich beim Typ 2 ebenfalls um einen heptahelikalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Jedoch kann es sich sowohl um G<sub>i</sub> -, als auch um G<sub>s</sub>-Proteine handeln (119). Die höchste Dichte und Konzentration von AT<sub>2</sub>-R. finden sich in fetalem Gewebe, was die Rolle dieses Rezeptors im Rahmen von Wachstum und Differenzierung impliziert (122). Nach der Geburt fällt die Konzentration rapide ab und so wird der Rezeptor nur noch in einzelnen Organen bzw. Organabschnitten wie Nebennierenmark, Herz und Koronarien, *Myometrium*, im Epithel der Lungen oder in den großen präglomerulären Gefäßen und Interstitium der Niere exprimiert. Ferner findet sich der AT<sub>2</sub>-R. im limbischen System, in verschiedenen thalamischen *Nuclei*, im *Ncl. subthalamicus*, im Bereich der unteren Olive sowie im Hirnstamm und Kleinhirn (123). Darüber hinaus wird die Expression in einigen Geweben unter pathologischen Umständen wie AMI, chronischer Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Nervenschädigungen und Ischämien des Gehirns gesteigert (119).

Einer der Signalwege des AT<sub>2</sub>-R. ist durch die Aktivierung von Phosphatasen charakterisiert. Darunter zählen die Serin/Threonin-Phosphatase PP2A, die zu einer Hyperpolarisation von Neuronen führt (124), die Protein-Phosphotyrosin-Phosphatasen, die in das Zellwachstum eingreifen, die MAPK-Phosphatase-1, welche durch Inaktivierung der MAPK *Extracellular Signal-Regulated Kinases-1/2* (ERK-1 /2) eine Hochregulierung des proapoptischen Proteins Bax bewirkt (125) und die *Src Homology 2 (SH2) domain-containing Phosphatase-1*, die ebenfalls in den MAPK-Signalweg eingreift (126). Einen möglichen molekularen Mechanismus dieser ERK-Inhibition konnte durch die Entdeckung von *AT<sub>2</sub>-receptor-Interacting Proteins* (ATIPs) beschrieben werden, welche in Anwesenheit des AT<sub>2</sub>-R. die Tyrosinkinaseaktivität von Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren transinaktivieren (127). Über die Rekrutierung von Ceramiden und der damit verbundenen Aktivierung von Caspasen greift der AT<sub>2</sub>-R. durch einen

zusätzlichen Mechanismus in den programmierten Zelltod ein (128). Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass der AT<sub>2</sub>-R. zu einer Aktivierung der PLA 2 führt und durch Induktion des Na<sup>+</sup>/Bikarbonat-Symporter-Systems eine Rolle in der Regulation des pH-Wertes spielt (127). Die Aktivierung des NO-Systems ist ein weiterer Mechanismus innerhalb der AT<sub>2</sub>-R.-Signaltransduktion. Durch die konsekutive Aktivierung der Guanylatzyklase und der Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt Ang II eine Vasodilatation und eine Hemmung von Wachstumsprozessen durch cGMP-abhängige Kinasen (129). Eine neuere Erkenntnis ist die Induktion von *Zinc-finger homeodomain enhancer binding protein*-Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, welche zelluläre Differenzierungsprozesse regulieren und Einfluss auf Entwicklung und Zellregeneration nehmen (130).

In Abb. 1-2. sind die wesentlichen Wirkungen des AT<sub>2</sub>-R. zusammengefasst, worunter die Regeneration insbesondere in der Schlaganfallforschung eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von zerebralen AT<sub>2</sub>-R. unter ischämischen Bedingungen das Auswachsen von Neuriten und auch das Überleben von Neuronen im Sinne einer Neuroprotektion bedingt (131).

### 1.2.2.3. *Insulin Regulated Aminopeptidase*

Ang IV vermittelt seine Wirkungen über die IRAP, eine membrangebundene Zink-abhängige Metalloproteinase. Über die Signaltransduktion nach Bindung von Ang IV kann derzeit nur spekuliert werden (132). Zu den Wirkungen von Ang IV über diesen Rezeptor zählen renale Vasodilatation, Hypertrophie und die Aktivierung von NFκB. Darüber hinaus werden diesem Molekül Funktionen im Bereich von Kognition, Nierenstoffwechsel und kardiovaskulären Schädigungen zugeschrieben (92). Abb. 1-2. gibt wichtige Wirkungen wieder.

### 1.2.2.4. **Mas-Onkogen-Rezeptor**

Die genauen Mechanismen, die der Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Mas-R. durch seinen Liganden Ang<sup>1-7</sup> zu Grunde liegen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Man nimmt eine Beteiligung der PKC, Inhibition von MAPK und Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB) bzw. von Akt an (133). Infolge dieser Signaltransduktion kommt es zu antitrophischen und vasodilatierenden Effekten, v. a. durch Verstärkung der durch BK vermittelten Gefäßerweiterung. Generell wird eine antagonistische Funktion gegenüber den AT<sub>1</sub>-R.-assoziierten

Wirkungen angenommen (92). Weitere Wirkungen, die der Aktivierung des Mas-R. zugeschrieben werden, sind in Abb. 1-2. dargestellt.

### 1.2.2.5. Renin/Prorenin-Rezeptor

Die Entdeckung von Renin- bzw. Prorenin-Rezeptoren (RPR) brachte neue Sichtweisen und Vorstellungen hinsichtlich des RAS hervor. Bisher wurden 2 Rezeptoren, an die sowohl Renin, als auch sein Proenzym Prorenin binden, identifiziert. Während der Mannose-6-Phosphat/*Insulin like Growth Factor-2*-Rezeptor beide Moleküle bindet, internalisiert und somit eine *Clearance*-Funktion übernimmt, ist die Physiologie des spezifischen RPR komplexer. Zum einen führt die Bindung von Prorenin, welches konstitutiv von der Niere sezerniert wird und in 10-mal so hoher Konzentration wie Renin im Plasma vorliegt, zu einer Überführung in die aktive Form des Renins. Zum anderen wird durch die Aktivierung des Rezeptors, unabhängig davon, durch welche der beiden Substanzen, die Genexpression der MAPK p44/p42 sowie der profibrotischen Moleküle PAI-1 und TGF- $\beta$  1 gesteigert. Letzteres wiederum induziert die Bildung weiterer profibrotischer Substanzen wie Fibronectin und Kollagen 1 (134).

Die höchsten Konzentrationen des RPR finden sich in Herz, Gehirn, Plazenta und viszeralem Fettgewebe, geringere Werte in Nieren, Leber und subkutanem Fettgewebe. Pharmakologisch erhofft man sich durch Blockierung des RPR positive Effekte insbesondere in der Behandlung diabetisch- und Bluthochdruck-bedingter Organschäden, z. B. an der Niere (92). Abb. 1-2. listet wichtige Rezeptor-vermittelte Wirkungen auf.

### 1.2.3. Renin-Angiotensin-System im Gehirn

Bereits 1971 postulierten Ganten *et al.*, dass es neben dem aus der Niere stammenden Renin auch ein davon unabhängiges Renin innerhalb des Gehirns gäbe (135). In den folgenden Jahren bzw. Jahrzehnten konnten alle Komponenten des RAS im Gehirn identifiziert werden. So ist in der heutigen Zeit die Existenz eines eigenständigen, unabhängigen RAS innerhalb des Gehirns allgemein akzeptiert (136). Dabei wirkt Ang II sowohl an Gehirnstrukturen innerhalb, als auch außerhalb der BBB. Die wichtigsten Wirkungen sind die Induktion des Trinkverhaltens, Natriurese, Stimulation der ADH-Freisetzung, Modulation der sympathischen Innervation der Peripherie und die Abschwächung des Barorezeptorreflexes. Durch diese Effekte wird dem Gehirn-RAS eine tragende Rolle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines neurogenen arte-

riellen Hypertonus zugeschrieben (137). Renin wird in Neuronen synthetisiert und in Nervenendigungen gespeichert. Ebenso ist das ACE im Bereich der Synapsen zu finden, insbesondere in der *Lamina terminalis*, den zirkumventrikulären Organen, dem *Hypothalamus* und in einigen Kernen des Hirnstamms. Dagegen befindet sich der Großteil des AGT extrazellulär, weswegen eine extrazelluläre Bildung von Ang II angenommen wurde. Jedoch wird der weitaus größte Teil von Ang II in synaptischen Vesikeln gespeichert, was gegen diese Hypothese spricht (138). Darüber hinaus wird Renin v. a. in den Bereichen gering exprimiert, in denen hohe Konzentrationen von Angiotensinogen und Ang II vorkommen. Diese Tatsachen zeigen die noch unzureichend geklärte Verteilung des RAS im Gehirn und deren Bedeutung (137). Der größte Teil der Ang II-typischen Wirkungen wird durch Aktivierung von AT<sub>1</sub>-R. hervorgerufen (104). Die Injektion von Ang II in die Seitenventrikel verursacht eine Blutdruckerhöhung. Ursächlich sieht man vor allem die Sekretion von ADH in den *Ncl. supraoptici et paraventriculares* infolge der Aktivierung von NA-ergen Interneuronen, die in hypothalamische Areale projizieren. In der *Medulla oblongata* befinden sich weitere Zentren der Blutdruckregulation. Dazu gehören die *Area postrema*, der *Ncl. tractus solitarii* sowie die rostrale ventrolaterale *Medulla*. Mikroinjektionen von Ang II bewirken eine Abschwächung des Barorezeptorreflexes. Neben diesen 2 Wirkungen kann Ang II durch Verstärkung der sympathischen Transmission einen Blutdruckanstieg bewirken (137). Weitere Hinweise dafür, dass das RAS eine wichtige Rolle in der neurogenen Entstehung respektive Aufrechterhaltung eines Hypertonus spielt, konnte durch Verwendung von *Antisense*-Oligonukleotiden gezeigt werden, die mit der *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) von Angiotensinogen und dem AT<sub>1</sub>-R. interferieren. So beobachtete man eine Senkung des Blutdruckes in spontan hypertensiven Ratten (SHR) unter Nutzung dieser Methode (136).

Infolge der regenerativen Eigenschaften der AT<sub>2</sub>-R.-Aktivierung wird eine protektive Rolle dieses Rezeptors im Rahmen ischämischer Erkrankungen des Gehirns angenommen. Diesbezüglich konnten Studien vielversprechende Ergebnisse erzielen (137).

Neben den klassischen Vertretern des RAS finden sich in tierexperimentellen Studien auch Areale mit Expression von ACE 2 und Ang<sup>1-7</sup>. Letzteres wird z. B. in Blutdruck-regulierenden Bereichen des Hirnstamms und *Hypothalamus* exprimiert. Dabei führt Ang<sup>1-7</sup> zu einer gesteigerten Sensitivität des Barorezeptorreflexes, verhindert die NA-Freisetzung und vermittelt Blutdruck-senkende Effekte in hypertensiven Ratten. Aufgrund dieser Eigenschaften scheint Ang<sup>1-7</sup> neben synergistischen, auch AT<sub>1</sub>-R.-gegensätzliche Wirkungen im Gehirn zu entfalten (139).

### 1.2.4. Pharmakologische Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems

In der klinischen Praxis findet die pharmakologische Blockierung des RAS derzeit über 3 Mechanismen Anwendung. Dazu gehören die Hemmung des ACE durch ACE-Inhibitoren, die Blockierung von AT<sub>1</sub>-R. durch ARBs und die Renin-Inhibition (92).

Die älteste Substanzgruppe bilden die ACE-Inhibitoren, deren erster Vertreter Captopril war. ACE-Inhibitoren wie Ramipril reduzieren durch Hemmung der Ang I-Konversion in Ang II dessen Effekte, können sie aber nicht aufheben. Ursache sind lokale RAS, die unabhängig Ang II bilden können und von ACE-Inhibitoren nicht erfasst werden. Dieser Umstand wird auch als *Escape*-Mechanismus beschrieben. Ein weiterer *Escape*-Mechanismus führt zu einer gesteigerten Aldosteron-Produktion im Rahmen einer Therapie mit ACE-Inhibitoren. Des Weiteren fungiert das ACE als Kininase II. Infolge der Hemmung durch ACE-Inhibitoren verringert sich somit der Abbau von BK, welches über seinen Rezeptor und der nachgeschalteten Aktivierung des NO-Systems zusätzlich zu einer Vasodilatation führt und folglich zu den antihypertensiven Eigenschaften der ACE-Inhibitoren beiträgt. Demgegenüber steht die Gefahr eines Angioödems und Hustens, welche bei dispositionierten Patienten durch BK ausgelöst werden können. Dieser Nachteil wird durch die anderen RAS-blockierenden Substanzgruppen umgangen (140). Studien belegen die gute Wirksamkeit der ACE-Inhibitoren als Antihypertensiva. Daneben werden dieser Substanzgruppe auch weitere Wirkungen zugeschrieben, z. B. Verbesserung der Endothelfunktion, Renoprotektion bei Diabetikern, Rückbildung einer linksventrikulären Hypertrophie und weitere kardioprotektive Effekte (119).

ARBs werden durch die Substanzgruppe der Sartane repräsentiert. Der erste Vertreter dieser Klasse war Saralasin, welches 1971 eingeführt wurde. Dieses Molekül basierte jedoch auf einer Peptidstruktur, welche eine orale Applikation nicht ermöglichte. Neben der schlechten oralen Bioverfügbarkeit unterschied Saralasin nicht zwischen den beiden AT-R., hatte eine kurze Wirkungsdauer sowie eine hohe intrinsische Aktivität. Aufgrund der Summe dieser Nachteile konnte sich die Substanz nicht etablieren (141). Mitte der 90-er Jahre wurde mit Irbesartan der erste, nicht auf Peptidstruktur-basierte, ARB zugelassen. Darauf folgten weitere, z. B. Candesartan, Eprosartan, Valsartan oder Telmisartan. Diese neueren ARBs bieten im Vergleich zu ACE-Inhibitoren den Vorteil, selektiv den AT<sub>1</sub>-R. kompetitiv und reversibel zu blockieren. In der Folge kann Ang II den nicht besetzten AT<sub>2</sub>-R. aktivieren. Darüber hinaus können die oben beschriebenen *Escape*-Mechanismen umgangen werden, da die Blockierung des RAS direkt am Rezeptor erfolgt. Welche klinische Relevanz diese Effekte haben, muss durch weitere Studien untersucht werden (142). Neben der Blutdruck-senkenden Wirkung werden den Sartanen auch Blutdruck-

unabhängige pleiotrope Effekte zugeschrieben. So konnten antiinflammatorische (143) und, im Rahmen der diabetischen Nephropathie, renoprotektive (144, 145) Wirkungen gezeigt werden. Ebenso wurde ein Inzidenzrückgang von neu aufgetretenem Typ-2-Diabetes in hypertensiven Patienten beobachtet (146, 147). Ursache dieses Phänomens könnte die Eigenschaft der Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivieren  $\gamma$ -Rezeptoren (PPAR- $\gamma$ ) einiger Sartane sein. Von allen Sartanan zeigt Telmisartan die größte Potenz der PPAR- $\gamma$ -Aktivierung. Folge dieser Aktivierung ist die vermehrte Bildung von Adiponektin, welches die periphere Insulinsensitivität verbessert (148, 149).

Ein weiteres Behandlungskonzept stellt die Kombination von ACE-Inhibitoren und ARBs dar. Durch die Kombination sollen sich die Vorteile beider Substanzgruppen addieren bzw. Nachteile wie das *Escape*-Phänomen kompensiert werden. So konnte die Val-HeFT-Studie zeigen, dass die Aldosteronspiegel im Plasma in der Kombinationsgruppe signifikant geringer waren als in der Standardmedikationsgruppe (150).

Die dritte mit dem RAS interferierende Substanzgruppe stellen die Renin-Inhibitoren dar, deren einziger bisher zugelassene Vertreter Aliskiren ist. Durch die Hemmung der Reninaktivität ist es möglich die Umsetzung von Angiotensinogen zu Ang I und damit den limitierenden Schritt der Ang II-Produktion zu blockieren (151). Mehrere Studien über die Wirksamkeit Aliskirens bei arterieller Hypertonie zeigten im Vergleich zu anderen Antihypertensiva vergleichbare Wirkungen (152, 153, 154, 155, 156, 157, 158). Inwieweit Aliskiren Endorganschäden verhindern kann und ob eine Kombination mit anderen RAS-blockierenden Medikamenten zusätzlichen Nutzen bringt sowie die Frage nach pleiotropen Effekten werden zukünftige Studien beantworten (151). Vielversprechende Ergebnisse konnten bisher mit dem selektiven AT<sub>2</sub>-R.-Agonisten *Compound 21* (C21) erzielt werden. Diese nicht auf Peptidstruktur-basierende Substanz bietet die Möglichkeit einer oralen Applikation. In Tier-und Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass die selektive Aktivierung des AT<sub>2</sub>-R. durch C21 das Auswachsen von Neuriten bewirkt. Zudem wurden Studien durchgeführt, die C21-vermittelte kardioprotektive, neuroprotektive, antiinflammatorische und protektive Wirkungen hinsichtlich des Gastrointestinaltraktes zeigen (159).

### **1.2.5. Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems im Schlaganfall**

Ang II spielt durch seine Blutdruck-steigernden Wirkungen eine wesentliche Rolle in der Schlaganfallentstehung. Neben der Bedeutung des arteriellen Hypertonus als Risikofaktor allge-

mein, vermittelt Ang II Störungen der Gefäßregulation und Permeabilität. Infolge der Hypertension kommt es zu neointimalen Proliferationen innerhalb der Gefäßwände, die zu einer Beeinflussung der Endothel-abhängigen Vasodilatation von Arteriolen führen. Dadurch verringert sich die Kapazität der Widerstandsgefäße, wodurch eine Anpassung der Perfusion an Blutdruckveränderungen nicht mehr gewährleistet ist. Zudem verstärken Blutdruck-vermittelte, proinflammatorische Prozesse diese Mechanismen. Vorbehandlungen mit ARBs verbessern die Gefäßreaktivität, schwächen die Entzündungsreaktion ab und verbessern die Kapazität der Arteriolen. Durch diese Normalisierung der zerebrovaskulären Autoregulation können ARBs die Entstehung von Schlaganfällen in SHR verhindern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des RAS mittels ACE-Inhibitoren und ARBs über vasodilatierende, antiinflammatorische und antiproliferative Effekte der Genese atherosklerotischer Veränderungen vorbeugen kann (160). Die Bedeutung von AT-R. wird durch weitere tierexperimentelle Ansätze unterstrichen, die zeigen, dass ein Fehlen des AT<sub>1</sub>-R. mit kleineren, ein Fehlen des AT<sub>2</sub>-R. dagegen mit größeren Infarkten verbunden ist. Als Ursache dieser neuroprotektiven Wirkungen des AT<sub>2</sub>-R. sieht man u. a. dessen vermittelte Vasodilatation (161, 162). Nach zerebraler Ischämie zeigt sich eine höhere Dichte von AT<sub>2</sub>-R. in der Penumbra; die Aktivierung dieser Rezeptoren könnte Ursache dafür sein, dass eine Vorbehandlung mit Irbesartan im Tiermodell eine Verkleinerung der Schlaganfallvolumina hervorruft (131). Darüber hinaus verbesserte sich das neurologische *Outcome* von Tieren auch bei postischämischer Gabe von Irbesartan (163). Hinsichtlich der Wirkungen des AT<sub>2</sub>-R. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die direkte Stimulation des Rezeptors durch einen AT<sub>2</sub>-Agonisten neuroprotektive Wirkungen im Rahmen eines Schlaganfalls vermittelt (164), ähnliche AT<sub>2</sub>-assoziierte Effekte wurden in Modellen von Nervenschädigungen beobachtet (165). Diese Vielzahl an Ergebnissen sprechen für Blutdruck-unabhängige Wirkungen von ARBs in der Entstehung und der Behandlung von Schlaganfällen. In diesem Zusammenhang konnten Krikov *et al.* zeigen, dass die Vorbehandlung mit einer nicht antihypertensiven Dosis von Candesartan zu einer Aktivierung des *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF)/Tyrosinkinase B (TrkB)-Systems und der Verbesserung des neurologischen *Outcomes* führt. Demgegenüber konnten im direkten Vergleich für Ramipril derartige Wirkungen nicht gezeigt werden (166).

Klinische Studien belegen die Wirksamkeit von ACE-Inhibitoren und ARBs in der Primärprävention des Schlaganfalls. In der *Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE)-Studie zeigten sich in der Ramipril-Behandlungsgruppe 32 % weniger Schlaganfälle im Vergleich zur Behandlung mit einem Placebo (70). In der *Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial* (ASCOT)-Studie wurden 2 Therapiestrategien miteinander verglichen. Die Therapie mit dem Ca<sup>2+</sup>-

Antagonisten Amlodipin und dem ACE-Inhibitor Ramipril war wirksamer als die Therapie mit dem Betablocker Atenolol und dem Diuretikum Bendroflumethiazid (167). Im Vergleich des ARB Valsartan und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Amlodipin ergaben sich im Rahmen der *Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation* (VALUE)-Studie keine Unterschiede zwischen den Behandlungen (168). Dagegen zeigte sich für Losartan eine bessere Wirkung im Vergleich zu Atenolol in der *Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension* (LIFE)-Studie bezüglich der Schlaganfallinzidenz (146). Neue und wichtige Erkenntnisse lassen sich aus der *Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial* (ONTARGET)-Studie ableiten, in der erstmals ein ACE-Inhibitor (Ramipril) und ein ARB (Telmisartan) sowie deren Kombination hinsichtlich verschiedener Endpunkte verglichen wurden. Zusammenfassend zeigten sich die Behandlungen mit Ramipril und Telmisartan in der Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse gleichwertig, wobei innerhalb der Telmisartan-Behandlungsgruppe weniger Nebenwirkungen wie Angioödeme auftraten. Die Kombinationstherapie erbrachte keinen zusätzlichen Nutzen; stattdessen war diese mit einer höheren Zahl von Nebenwirkungen verbunden (169). Aus der ONTARGET-Studie ging die *Telmisartan Randomised AssessmeNt Study in ACE-iNtolerant subjects with cardiovascular Disease* (TRANSCEND)-Studie hervor. Patienten, die einen ACE-Inhibitor nicht vertrugen, erhielten stattdessen Telmisartan. Im weiteren Verlauf wurde geprüft, inwieweit die Medikation von Telmisartan Vorteile gegenüber einem Placebo bezüglich der Endpunkte AMI, Schlaganfall, kardiovaskuläre Todesfälle und Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz hat. Alle Endpunkte zusammengenommen, war Telmisartan dem Placebo nicht überlegen. Dennoch ergab sich für Telmisartan eine signifikant geringere Anzahl von AMI, Schlaganfall, und kardiovaskulären Todesfällen (170).

Positive Effekte der RAS-blockierenden Substanzen konnten auch in Studien gezeigt werden, welche im Rahmen der Sekundärprävention durchgeführt wurden. In der *Perindopril pROtection aGainst REcurrent Stroke Study* (PROGRESS)-Studie war die ACE-Inhibitor-Medikation wirksamer als die Placebo-Gabe (72). Die *Morbidity and Mortality after Stroke-Eprosartan vs. Nitrendipine in Secondary Prevention* (MOSES)-Studie verglich den ARB Eprosartan mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Nitrendipin. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass Eprosartan wirksamer hinsichtlich der kardiovaskulären Mortalität bzw. Morbidität war (73). Dagegen zeigte sich in der *PReventiOn regimen For Effectively avoiding Second Strokes* (PROFESS)-Studie kein Vorteil von Telmisarten im Vergleich zu einem Placebo in der Reduktion von Schlaganfallrezidiven. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass sich ein signifikanter Vorteil durch Telmisartan erst bei einer längeren Beobachtungsdauer als in der Studie ergibt (75).

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Gabe von Candesartan während der akuten Phase des Schlaganfalls in der *Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors* (ACCESS)-Studie untersucht. Dabei ergab sich eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zur Placebo-Gruppe (74).

### 1.3. Neurotrophine

Neurotrophine (NT) sind kleine basische Proteine, die u. a. das Überleben von Neuronen und Gliazellen, Wachstum von Axonen und Dendriten sowie die Struktur und Funktion von Synapsen regulieren (171) und Einfluss auf die Aktivitäts-abhängige Form synaptischer Plastizität nehmen (172). Das zuerst entdeckte Neurotophin war der *Nerve Growth Factor* (NGF) Anfang der 50-er Jahre (173), 1982 folgte die Entdeckung des BDNF (174). Die übrigen 3 relevanten NT, Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) wurden später identifiziert (175, 176, 177). Jedes NT bindet an *Tropomyosin-related kinase*-Rezeptoren, welche zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehören (178). NGF und in geringem Maße auch NT-3 binden an den Tyrosinkinase-A (TrkA)-Rezeptor, NT-3 selbst vermittelt den Großteil seiner Wirkungen über den Tyrosinkinase C (TrkC)-Rezeptor. Dagegen binden BDNF und NT-4/5 an den TrkB-Rezeptor (179). Allen NT gemein ist die Eigenschaft den p75-NT-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) zu binden. Dieser zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren (TNFR) gehörende Rezeptor zeigt andere Wirkungen als die Trk-Rezeptoren (Trk-R.) (180). So scheint p75<sup>NTR</sup> die Spezifität der einzelnen Trk-R. zu verändern und somit die Affinität für den eigentlichen Liganden zu erhöhen (181). Daneben schützt der Rezeptor vor Glutamat-medierter Zytotoxizität (182) und vermittelt sowohl Überleben, als auch Apoptose (183).

#### 1.3.1. Brain Derived Neurotrophic Factor

BDNF wird hauptsächlich und primär als Vorläuferprotein in Form des proBDNF gebildet und durch Spaltung mittels Plasmin in die normale Form überführt. ProBDNF findet sich v. a. im *Hippocampus*, *Cortex*, *Cerebellum*, *Hypothalamus*, Rückenmark, in der *Substantia nigra* und *Amygdala* (172). Dagegen wird der Großteil der Normalform im *Hippocampus* konstitutiv exprimiert; nach Aktivierung des BDNF-Systems beobachtet man eine weite Verteilung (184). Eine erhöhte Expression bzw. eine vermehrte Freisetzung von BDNF resultiert aus photonischen und osmotischen Reizen, elektrischen Stimuli z. B. im Rahmen der Lang-Zeit-Potenzierung

(LTP) im *Hippocampus* und körperlicher Aktivität. Zudem variieren die BDNF-Spiegel im Plasma während des weiblichen Zyklus (185).

Im Rahmen der synaptischen Transmission verstärkt BDNF die Glutamat-erge Übertragung (185), während die GABA-erge Inhibition abgeschwächt wird (186). Des Weiteren wurden neurogenetische Eigenschaften im *Bulbus olfactorius*, *Striatum* und *Thalamus* beobachtet (185). Durch Blockierung der BDNF-vermittelten Wirkungen konnten weitere Effekte untersucht werden. So verschlechtert eine Blockierung das räumliche Denken (185). In Tiermodellen verhindert die Blockierung das Entstehen von epileptischen Anfällen (185). In Analogie dazu zeigte sich bei Patienten mit Temporallappenepilepsie eine erhöhte Expression dieses NT (187). Nach entzündlicher Schädigung des Rückenmarks wird BDNF in den Hinterhornzellen vermehrt gebildet. Infolgedessen werden afferente Nozizeptoren sensitisiert und so eine Hyperalgesie hervorgerufen, wodurch auch eine zentrale Schmerzsensibilisierung vermittelt wird (188). Eine verminderte Bildung von BDNF findet sich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie *Morbus* (M.) Alzheimer (189), M. Parkinson (190) oder *Chorea* Huntington. Bei letzterer konnte gezeigt werden, dass Huntingtin, welches im Rahmen dieser Erkrankung verändert ist, eine Erhöhung der BDNF-Expression vermittelt (191). Ein weiteres Beispiel, welches mit einer verminderten Bildung einhergeht, stellt die Depression dar (192).

Bei fokaler transientser Ischämie wirkt BDNF durch Reduktion des kortikalen Infarktolumens neuroprotektiv (193). Überdies verhindert BDNF in vitro die NO-vermittelte Glutamat-Toxizität, welche auch in der Folge einer Ischämie zu beobachten ist (194).

### 1.3.2. Tyrosinkinase B

Die TrkB fungiert als Rezeptor für BDNF sowie NT-4/5 und findet sich im *Cortex*, *Hippocampus*, Hirnstamm, in septalen *Nuclei*, Purkinjezellen des Kleinhirns, Motoneuronen des Rückenmarks und in der *Substantia nigra*. Der Großteil ist intrazellulär lokalisiert und wird nach Depolarisierung der Plasmamembran in diese transloziert (172).

Nach Bindung des Liganden dimerisiert der Rezeptor mit nachfolgender Kinaseaktivierung, Rezeptorautophosphorylierung von multiplen Tyrosinresten und Anlagerung von Zielproteinen an SH2-Domänen. Zu diesen gehören die Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase, die PLC- $\gamma$  und das kleine G-Protein Ras (178, 179). Insbesondere dem kleinen G-Protein Ras und der PI3-Kinase wird die Eigenschaft zugeschrieben, für das neuronale Überleben verantwortlich zu sein (181). Durch die anschließende Aktivierung verschiedener Gene vermittelt BDNF die oben beschriebene

nen Wirkungen. Der Großteil dieser Wirkungen benötigt Tage bis Wochen. Daneben sind jedoch auch schnellere Effekte beschrieben worden, z. B. Modulation der Ionenkanalaktivität, NT-Freisetzung oder Regulierung der synaptischen Transmission, die durch die Kollokalisierung von TrkB, BDNF und Glutamat-ergen Synapsen gewährleistet ist (195). Kürzlich wurde die Fähigkeit von BDNF beschrieben, Na<sup>+</sup>-Kanäle innerhalb von Millisekunden (ms) zu öffnen. Somit wäre BDNF die potenteste exzitatorische Substanz im ZNS. Derzeit nimmt man die Existenz von Na<sup>+</sup>-Kanälen an, die direkt mit der TrkB gekoppelt sind und nach Ligandenbindung aktiviert werden (196).

Neben der normalen Form der TrkB sind auch verkürzte, sogenannte trunkierte Rezeptoren beschrieben worden. Diese stellen aber nur einen kleinen Teil aller Rezeptoren dar und scheinen Wachstums- und Entwicklungsprozesse zu beeinflussen (197). Darüber hinaus wurde eine vermehrte Expression trunkierter Rezeptoren auf Astrozyten nach Hirnschädigung gefunden, weswegen man eine modulierende Funktion im Rahmen der Vulnerabilität des ZNS annimmt (198).

### 1.4. Proinflammatorische Zytokine im zentralen Nervensystem

Zytokine sind Polypeptide niedrigen Molekulargewichts (MG) mit multifunktionellen, pleiotropen Effekten und regulieren Prozesse wie Zellaktivierung, Proliferation und Differenzierung. Demgegenüber stellen Chemokine Glykoproteine mit niedrigem MG dar, die Einfluss auf Leukozytenaktivierung und Chemotaxis nehmen (199). Zu den wichtigsten Zytokinen des ZNS zählen Il-1, Il-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Lymphotoxin- $\alpha$ . Während in der Peripherie der Großteil proinflammatorischer Zytokine auf Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Zellen zurückzuführen ist, repräsentieren aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten die Hauptquellen innerhalb des ZNS. So sind diese Zellen in der Lage, selbst Il-1, Il-6 und TNF- $\alpha$  zu bilden. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass auch Neuronen fähig zur Produktion von TNF- $\alpha$  und Il-6 fähig sind. Daneben wird ein Teil der Zytokine im ZNS durch Endothel und perivaskuläre Zellen gebildet. Zytokine vermitteln den Hauptteil der Wirkungen auf Neuronen indirekt über Gliazellen, können aber auch direkt auf Neuronen wirken. Aufgrund der fehlenden Pinozytosefunktion der BBB und der dichten *Tight Junctions* ist eine passive Diffusion von Zytokinen aus der Peripherie ins ZNS kaum möglich. Zwar können Zytokine in den zirkumventrikulären Organen Einfluss auf ZNS-Prozesse nehmen, doch reicht diese Erklärung nicht aus, um die vielfältigen Wirkungen der Zytokine aus der Peripherie auf das ZNS zu erklären. Daher bedarf der genaue Mechanismus noch weitere Studien (200)

### 1.4.1. Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist ein 26 Kilo-Dalton (kDa) großes, Membran-gebundenes *Precursor*-Polypeptid, welches durch das TNF- $\alpha$ -*Converting Enzyme* in eine 17 kDa große Untereinheit gespalten wird. Als Homotrimer vermittelt TNF- $\alpha$  seine Wirkungen über 2 TNF- $\alpha$ -Rezeptoren: TNFR-1 (p55) und TNFR-2 (p75), welche zur TNFR-Superfamilie gehören (199). Im Allgemeinen wird TNF- $\alpha$  v. a. durch aktivierte Immunzellen wie Makrophagen, T- und B-Zellen gebildet. Im ZNS wird unter normalen Umständen der Großteil durch Neuronen produziert. Kommt es zu einer Entzündungsreaktion des ZNS, z. B. im Rahmen von Infektionen, Schädigungen oder Ischämien, treten Astrozyten und Mikrogliazellen in den Vordergrund (200).

Der TNFR-1 verfügt über 3 zytoplasmatische Domänen: die TNFR-1 *Internalization Domain* (TRID), *Neutral Sphingomyelinase Domain* (NSD) und die *Death Domain* (DD). Die TRID ist für die Internalisierung des Rezeptors und Initiierung von Apoptosevorgängen von Bedeutung, die NSD ist mit der Produktion von Ceramiden und der Aktivierung der Caspase 3 verbunden. Die DD ist die Bindungsstelle für die *TNFR-Associated Death Domain*, welche die Adaptorproteine *Receptor Interacting Protein*, *TNFR-Associated Factor 2* (TRAF-2) und *Fas-Associated Death Domain* (FADD) rekrutiert. Während FADD mit der Herbeiführung von Apoptose assoziiert ist, führt eine TRAF-2-Rekrutierung zu Überlebenssignalen für die Zelle. Über den TNFR-2 ist bisher weniger bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass durch diesen Rezeptor neuroprotektive Effekte über eine PI3-Kinase-abhängige Transduktion vermittelt werden (201).

Über den TNFR-1 ruft TNF- $\alpha$  zu einer neurotoxischen, zum anderen auch neuroprotektiven Wirkung hervor. So fördert er nach Schädigung des ZNS proinflammatorische und neurodegenerative Vorgänge. Beispielsweise finden sich erhöhte Werte von TNF- $\alpha$  bei M. Alzheimer, M. Parkinson, Multipler Sklerose und Humaner Immundefizienz-Virus-bedingter Demenz. Neurotoxische Wirkungen werden z. B. durch Veränderungen der BBB-Integrität herbeigeführt, dessen Folge eine verbesserte Adhäsion und Infiltration von Immunzellen ist. Darüber hinaus führt die Aktivierung von Mikrogliazellen über die Generierung von ROS zur Induktion weiterer proinflammatorischer Zytokine. Durch Modulation der *Major Histocompatibility Complex*-Präsentation steigt die Vulnerabilität von Astrozyten gegenüber zytotoxischen T-Zellen. Ferner wird durch die Wiederaufnahmehemmung von Glutamat dessen exzitotoxische Wirkung verstärkt. Weitere Mechanismen sind die Verstärkung von vasogenen Ödemen, Modulation von Ionenströmen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, Induktion der NADPH-Oxidase und COX, Freisetzung von PAI-1 sowie die Störung von LTP-Prozessen (199). Außerdem unterstützt TNF- $\alpha$  über die In-

duktion von Il-1  $\beta$  und konsekutiv erhöhter NGF-Expression die zentrale Schmerzsensibilisierung (200).

Demgegenüber werden auch neuroprotektive Wirkungen beobachtet. Dazu gehören die Förderung von Überleben, Differenzierung, Proliferation, Wachstum oder Remyelinisierung. Ursächlich sind z. B. die Stimulation von Astrozyten zur Freisetzung neurotrophischer Faktoren, Aktivierung von Reparaturprozessen in peripheren Nerven und Hirngefäßen, Stimulation neuronaler Plastizität, Induktion von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und antioxidativen Stoffwechselwegen (199).

Im Rahmen von zerebralen Ischämien zeigen sich erhöhte Werte von TNF- $\alpha$ . Des Weiteren ist die Induktion von TNF- $\alpha$  mit einer Verschlechterung neurologischer Defizite und einer Vergrößerung des Infarktolumens verbunden (199). Mögliche Ursachen sind die Potenzierung der Glutamat-Toxizität und die gesteigerte Expression von ICAM-1, VCAM-1, COX-2, iNOS sowie MMPs (202). Bereits 3 h nach Infarkt wurden in Tiermodellen erhöhte Konzentrationen der mRNA festgestellt (201). Dennoch kann nicht von einer rein neurotoxischen Wirkung im Falle des Schlaganfalls ausgegangen werden. So konnte gezeigt werden, dass das Infarktolumen bei TNF- $\alpha$ -*Knock-Out*-Mäusen deutlich größer ist (201). Weiterhin bedingt eine Präkonditionierung mit TNF- $\alpha$  eine erhöhte Ischämietoleranz. Insofern scheint ein gewisser Grad der Aktivierung von TNF- $\alpha$ -abhängigen Signalwegen unabdingbar für den Schutz gegenüber Ischämie-bedingten Schäden zu sein. Vielmehr scheint der Zeitpunkt der TNF- $\alpha$ -vermittelten Wirkungen entscheidend zu sein (199).

### 1.4.2. Interleukin-6

Il-6 repräsentiert ein weiteres wichtiges Zytokin im ZNS und gehört zusammen mit dem *leukemia inhibiting factor*, Onkostatin M, Il-11 und anderen zu einer Familie von Zytokinen, die ähnliche Wirkungen entfalten. Produziert wird Il-6 hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten, in geringerem Maße auch durch T-Helfer-Typ 2-Zellen. Die höchsten Konzentrationen finden sich in Gliazellen und Neuronen im *Hippocampus*. *In vitro* lässt sich die Expression von Il-6 insbesondere durch Il-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Lipopolysaccharide steigern. Auch Nervenschädigungen führen eine gesteigerte Bildung dieses Zytokins herbei (200). Seine Wirkungen vermittelt Il-6 über den Il-6-Rezeptor (Il-6R). Dieser ist in der Plasmamembran mit dem Glykoprotein 130 (gp 130) assoziiert und transduziert über den JAK/STAT-Signalweg. Neben dieser Membran-gebundenen Form gibt es auch den löslichen Il-6R, der Il-6 im Plasma binden und in der Folge

den gp 130-Rezeptor aktivieren kann. Dieser wird im Gegensatz zum Il-6R ubiquitär exprimiert, sodass Il-6 auch in Il-6R-negativen Geweben Wirkungen hervorrufen kann (203).

Zu den Wirkungen zählen die Regulation der Thrombozytenfunktion, Differenzierung von leukämischen Zellen und embryonischen Immunstammzellen sowie die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, Stimulation der akuten Phase-Reaktion der Leber, Hemmung der Lipoproteinlipase, Fieberentstehung und reaktive Gliose. Darüber hinaus induziert Il-6 die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons aus der Hypophyse. Durch den daraus resultierenden Anstieg der Glucocortikoide kommt es zur Hemmung von Il-1- und TNF- $\alpha$ -abhängigen Signalwegen (200). Daneben stimuliert Il-6 die Produktion des Il-1Ra und Il-10, welches eine Inhibition der Synthese von Il-1, TNF- $\alpha$  und Il-8 bewirkt (204). Während Lymphozyten vor Apoptose durch Hochregulierung von schützenden Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> geschützt werden, induziert Il-6 in neutrophilen Granulozyten den programmierten Zelltod (205). Nach Nervenschädigung führt Il-6 zu einer Aktivierung von Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen, wodurch eine schnellere Regeneration erreicht wird. Diese Vielfalt an pro- und antiinflammatorischen Effekten unterstreicht die komplexe Wirkung von Il-6 im Rahmen entzündlicher Vorgänge (200).

In Modellen des Schlaganfalls korrelieren hohe Werte von Il-6 mit einem größeren Infarktvolu-  
men. Jedoch wurde gezeigt, dass Il-6-defiziente Tiere keine Unterschiede bezüglich des Schadens aufweisen. Diese Ergebnisse implizieren, dass Il-6 nicht direkt das Infarktgeschehen beeinflusst (6). Dennoch sind im Rahmen hämorrhagischer Schlaganfälle hohe Il-6-Werte mit einem schlechten *Outcome* verbunden (206). Ebenso sind hohe Werte mit einem erhöhten Risiko eines wiederholten Infarkts assoziiert (207).

### 1.5. Hypothese der Arbeit

Viele Studien belegen, dass mit Hilfe der Blockierung des RAS mit ACE-Inhibitoren und ARBs die Inzidenz von Schlaganfällen verringert werden kann (70, 72, 73, 75, 146, 167, 168, 169, 170). Darüber hinaus zeigen Tiermodellstudien, dass insbesondere ARBs Blutdruck-unabhängige, neuroprotektive Wirkungen vermitteln, welche die Schlaganfallpathophysiologie beeinflussen können (131, 161, 162, 163, 166). Unter dieser Vorstellung könnte die Therapie mit einem ARB der Therapie mit einem ACE-Inhibitor überlegen sein. Hinsichtlich der Schlaganfallinzidenz konnte die ONTARGET-Studie keinen Unterschied zwischen beiden Substanzgruppen feststellen. Zudem erbrachte die Kombinationstherapie aus beiden Substanzgruppen keinen zusätzlichen Nutzen (169). Jedoch war es anhand der Studienergebnisse nicht

möglich, Aussagen über Unterschiede bezüglich des neurologischen Schadens zwischen den Gruppen zu machen.

Die vorliegende Arbeit untersucht über die ONTARGET-Studie hinaus erstmals mit Hilfe eines Schlaganfallmodells der Ratte, inwieweit eine Vorbehandlung mit dem ARB Telmisartan, dem ACE-Inhibitor Ramipril und deren Kombination das Ausmaß des neurologischen Schadens nach fokaler zerebraler Ischämie durch Blutdruck-unabhängige Wirkungen beeinflusst.

Voraussetzung dieser Untersuchung ist

1. eine suffiziente und äquipotente Blockierung des RAS durch die Substanzgruppen für die Dauer von 24 h und
2. eine fehlende Blutdrucksenkung durch die Substanzgruppen vor, während und nach dem herbeigeführten Schlaganfall.

Für die Einschätzung des neurologischen Schadens wurden die Infarkt volumina, das neurologische *Outcome*, der Nervenzellverlust in der Penumbra, die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und neuroprotektiver Faktoren sowie diesbezügliche immunfluoreszenzzytochemisch sichtbare Veränderungen herangezogen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien und Geräte

#### 2.1.1. Materialien

##### 2.1.1.1. Chemikalien und Substanzen

Die verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität bezogen. Der Begriff H<sub>2</sub>O steht grundsätzlich für *Aqua bidestillata* und wurde entweder von der Firma Invitrogen bezogen (Invitrogen *Life Technologies*, Karlsruhe, Deutschland [D]) oder mittels einer Reinstwasseranlage (Milli Q) der Firma MILLIPORE, Billerica, USA, aufbereitet.

#### Chemikalien, allgemein

**Tabelle 2-1.** Übersicht der verwendeten allgemeinen Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	SIGMA, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Taufkirchen, D
Ethanol (70% v/v)	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) als Tris-Base und Tris-Salzsäure	SIGMA, Taufkirchen, D D SIGMA, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tween 20	SIGMA, Taufkirchen, D

### Chemikalien für die *in vivo*-Versuche

**Tabelle 2-2.** Übersicht der verwendeten Chemikalien für die *in vivo*-Versuche

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Angiotensin I	Sigma Taufkirchen, D
Angiotensin II	Sigma Taufkirchen, D
Buprenorphin	essex pharma, München, D
Chloralhydrat	Sigma Taufkirchen, D
Haltungsfutter	ssnif Spezialitäten GmbH, Soest, D
Isofluran (Florene)	Abbot GmbH & Co Kg, Wiesbaden, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ramipril	Böhringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein, D
Sauerstoff, medizinisch	Hausversorgung
Telmisartan	Böhringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein, D

### Chemikalien und Lösungen für die Nukleotidanalytik

**Tabelle 2-3.** Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen für die Nukleotidanalytik

<b>Chemikalie / Lösung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
5 x M-MLV-Puffer	Promega, Mannheim, D
10 x PCR-Puffer	Promega, Mannheim, D
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP)	Promega, Mannheim, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	Promega, Mannheim, D
ROX	Invitrogen, Karlsruhe, D
SYBR Green RT-PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
Wasser (Ultra-Pure)	PAN Biotech, Aidenbach, D

**Chemikalien und Lösungen für die Immunfluoreszenzzytochemie**

**Tabelle 2-4.** Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen für die Immunfluoreszenzzytochemie

<b>Chemikalie / Lösung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
4',6'-Diamino-2-phenylindol·HCl (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aceton	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Eindeckmedium Hydromount	DiaTec, Hallstedt, D
Entellan <sup>®</sup> -Eindeckmedium	Merck KGaA, Darmstadt, D
Neurotrace <sup>™</sup> Nissl-Färbung	Invitrogen, Karlsruhe, D
Jung Tissue Freezing Medium	Leica-Microsystems, Nussloch, D
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

***SYBR Green<sup>®</sup> Housemix***

**Tabelle 2-5.** Zusammensetzung des *SYBR Green<sup>®</sup> Housemix* (10 ml)

<b>Chemikalie / Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Endkonzentration in der Reaktion</b>	<b>Volumen [ml]</b>
H <sub>2</sub> O, ultra pure	/	/	8,91
KCl, 2,5 M	100 mM	50 mM	0,4
Tris-HCl, 1 M	20 mM	10 mM	0,2
Mg <sup>2+</sup> -Solution, 1 M	13 mM	6,5 mM	0,13
dATP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dCTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dTTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dGTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
<i>SYBR Green<sup>®</sup></i>	0,02 %	0,01 %	0,001
DMSO	4 %	2 %	0,001
Tween 20	0,01 %	0,005 %	0,001
ROX-Solution	2 %	1 %	0,2
NP 40	0,01 %	0,005 %	0,001

### 2.1.1.2. *Primer*

Die Sequenzdaten der *Primer* des entsprechenden Organismus wurden auf der Internetseite <http://www.ensembl.org/index.html> ermittelt, anschließend wurden die Primer mit Hilfe des Programms Primer 3 (<http://biotools.umassmed.edu/>) entworfen und durch TIB-MOLBIOL (TIB-MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, D) hergestellt. Zuvor wurde auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> das gesamte Organismusgenom mit den ausgewählten Primern verglichen, um eine unerwünschte Fragmentamplifikation zu vermeiden. Tabelle 2-6. zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer.

**Tabelle 2-6.** Übersicht der verwendeten Primer

Gen	Sense	Antisense	Anlagerungs- temperatur
BDNF	CTAgCTAgTCgAAgTCgATC	AgCTgATCgATTCgTAgCgT	59°C
TrkB	CgAAgggAAATAgCAAggCA	CTAATgCATgggATACTAg	61°C
IL-6	ATATgTTCTCagggAgATCTTg gAA	AgTgCATCATCgCTgTTCATACA	60
TNF- $\alpha$	TgTCTgTgCCTCAgCCTCTTC	TCCTTgTTgggACCgATCA	60
18 S-rRNA	CCgCAGCTAggAATAATggAA	TCTAgCggCgCAATACgAAT	61°C

### 2.1.1.3. *Enzyme*

**Tabelle 2-7.** Übersicht der verwendeten Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, D
RNasin	Promega, Mannheim, D
Taq-Polymerase	Invitak, Berlin, D

### 2.1.1.4. Antikörper

**Tabelle 2-8.** Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Cy3-konjugierter <i>Donkey anti-Goat</i> IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Cy3-konjugierter <i>Donkey anti-Rabbit</i> IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<i>Goat anti-TNF-<math>\alpha</math></i> IgG ( <i>Anti-Mouse, Rat, Human</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
<i>Goat anti-IL-6</i> IgG ( <i>Anti-Mouse, Rat</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
<i>Rabbit anti-TrkB</i> IgG ( <i>Anti-Mouse, Rat, Human</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

### 2.1.1.5. Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße etc. sowie Glasgeräte wurden über den zentralen Einkauf der Charité bestellt und geliefert.

### Materialien für die *in vivo*-Versuche

**Tabelle 2-9.** Übersicht der verwendeten Materialien für die *in vivo*-Versuche

Material	Bezugsquelle
Bosworth Trim Allzweckkunststoff	Bosworth, Skokie, USA
Kanülen Microlance (verschiedene Größen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Kanülen Sterican (verschiedene Größen)	B. Braun Meisungen AG, Meisungen, D
Nahtmaterial Ethilon, nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon, Norderstedt, D
Nahtmaterial Prolene, nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon, Norderstedt, D
Operationsbesteck	FST, Fine Science tools GmbH, Heidelberg, D
Polyethylene-Schlauch (PE-60, Inside diameter: 0,72. Outside diameter: 1,22)	Aesculap AG, Tuttlingen, D
S-Monovetten Kanülen 22G	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Spritzen Discardit (verschiedene Größen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

## Material und Methoden

---

Spritzen Omnifix 1 ml

B. Braun Meisungen AG, Meisungen, D

---

### Materialien für die Nukleotidanalytik

**Tabelle 2-10.** Übersicht der verwendeten Materialien für die Nukleotidanalytik

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
96-well <i>Multiply</i> PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR <i>Tubes</i> und <i>Caps</i>	Biozym, Hessisch Oldendorf, D

---

### Materialien für die Immunfluoreszenzzytochemie

**Tabelle 2-11.** Übersicht der verwendeten Materialien für die in Immunfluoreszenzzytochemie

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Feuchtkammer	Anfertigung von Bettina Roeder, CCR Berlin, D
Menzel Deckgläschen	Menzel GmbH & CoKg, Braunschweig, D
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, D

---

### Sonstige Materialien

**Tabelle 2-12.** Übersicht der sonstigen verwendeten Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
500 $\mu$ l, 1,5 ml, 2 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
15 ml, 50 ml Zentrifugengefäße (Falcon)	Falcon, Gräfelfing-Lochham. D
10 $\mu$ l-, 100 $\mu$ l-, 1000 $\mu$ l-Eppendorfspitzen	Eppendorf, Hamburg, D

---

### 2.1.2. Geräte

#### Geräte, allgemein

**Tabelle 2-13.** Übersicht der allgemein verwendeten Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Analysenwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Analysenwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, D
Magnetrührer RET basic C	IKA-Werke, Staufen, D
Präzisionswaage SC2	Sartorius, Göttingen, D
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohema, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Micro 20	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

#### Geräte für die *in vivo*-Versuche

**Tabelle 2-14.** Übersicht der verwendeten Geräte für die *in vivo*-Versuche

Gerät	Bezugsquelle
Analyze 5.0 Visualisierungs- und Analysen-Software	AnalyzeDirect, Overland Park, USA
BioTrig <i>Animal Life Monitoring 9M CPL</i>	<i>BioTrig; Bruker, Karlsruhe, D</i>
BioTrig <i>BTI Software</i>	<i>BioTrig; Bruker, Karlsruhe, D</i>
Heizmatten	Anfertigung von Bettina Roeder, CCR Berlin, D
Isofluran-Verdampfer	Völker GmbH, Kaltenkirchen, D
Linux-HP- <i>workstation</i>	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, D
<i>monitoring</i> -System 1025 (MR-kompatibel)	SA Instruments, Stony Brook, USA
NIBP Controller zur Blutdruckbestimmung	ADInstruments GmbH, Spechtbach, D
PeriFlux System 5000 zur Laser-Doppler- basierten Durchflussmessung	Perimed, Järfälla, SE
PharmaScan 70/16 MRT-Gerät (Standort: Neurowissenschaftliches Forschungs-	Bruker Biospin, Ettlingen, D

## Material und Methoden

---

zentrum Berlin)

*ParaVision Software 3.0.1.*

Bruker Biospin, Ettlingen, D

*PowerLab* zur Blutdruckmessung

ADInstruments GmbH, Spechtbach, D

Radiometer ABL 555 zur Blutgasanalyse

Radiometer medical, Kopenhagen, DK

---

### Geräte für die Nukleotidanalytik

**Tabelle 2-15.** Übersicht der verwendeten Geräte für die Nukleotidanalytik

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Inkubationsschüttler Unitron	Infors HAT, Bottmingen, CH
<i>Real-time</i> PCR-System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Spektrophotometer DU 530	Beckman, Fullerton, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

---

### Geräte für die Immunfluoreszenzzytochemie

**Tabelle 2-16.** Übersicht der verwendeten Geräte für die Immunfluoreszenzzytochemie

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2	Leica, Wetzlar, D
Kryostat CM 1900	Leica Microsystems. Wetzlar, D
Software Openlab 3.1.7.	Improvision, Coventry, UK

---

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Methoden der *in vivo*-Versuche

##### 2.2.1.1. Haltung und Pflege der Tiere

Die Tiere, männliche, normotensive Wistar-Ratten (180-230 g), wurden von HARLAN Winkelmann, Deutschland bezogen. Die Haltung unter standardisierten Bedingungen (22 °C, 55 % absolute Luftfeuchtigkeit, 12 h Tag/Nacht-Rhythmus, freier Zugang zu Wasser und Einheitsfutter, 4-5 Tiere pro Käfig) erfolgte in keimarmer (*special pathogen free* [SPF]-) Umgebung mit Genehmigung und unter Aufsicht des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin in der tierexperimentellen Einrichtung des *Center for Cardiovascular Research* (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte.

Die im Folgenden aufgeführten tierexperimentellen Arbeiten zur Induktion eines Schlaganfalls in der Ratte wurden im Rahmen des vom LAGeSo Berlin genehmigten Versuchsvorhabens G0088/04 (22.04.2004 bis 30.03.2006) durchgeführt.

Die operativen Tätigkeiten erfolgten durch Maxim Krikov aus der Arbeitsgruppe Unger, CCR, Campus Charité Mitte.

##### 2.2.1.2. Studiendesign

Vor Beginn der Hauptstudie erfolgte eine Pilotstudie zur Dosisfindung der verwendeten Substanzen. Die äquipotenten Dosierungen von Ramipril und Telmisartan wurden durch die Reversion der durch Ang I- bzw. Ang II-hervorgerufenen Blutdruckanstiege ermittelt.

Nach einer Adaptationszeit von mindestens 5 Tagen nach Eingang in den tierexperimentellen Bereich des CCR wurde im Rahmen der Hauptstudie mit dem Behandlungsprotokoll begonnen; zuvor erfolgte die Randomisierung der Tiere in 6 verschiedene Behandlungsgruppen (Abb. 2-1.). Die Medikation mit Ramipril bzw. Telmisartan wurde, dem Körpergewicht entsprechend dosiert, subkutan ein- (Telmisartan) bzw. zweimal (Ramipril) täglich appliziert. Im Falle der Gabe von 0,9 % NaCl entsprach das Volumen dem, was ein Tier in den anderen Behandlungsgruppen täglich erhielt.

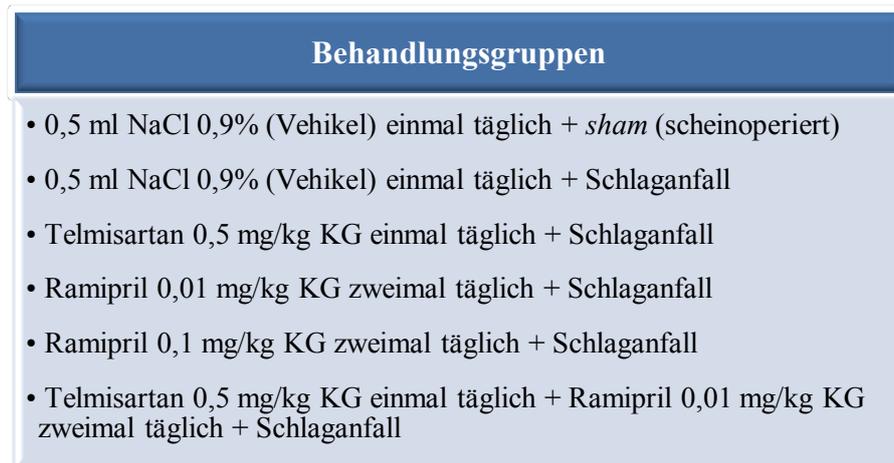


Abbildung 2-1. Studiendesgin-Behandlungsgruppen

3 Tage nach Beginn der Behandlung erfolgte die femoralarterielle Punktion und Katheterisierung im Rahmen der arteriellen Blutdruckmessung. Nach 5 Tagen wurde die *A. cerebri media* mittels Polypropylen-Faden für 90 min temporär verschlossen und währenddessen sowie 30 min danach der Blutdruck und der zerebrale Blutfluss gemessen. 24 und 48 h *post reperfusionem* wurden die neurologischen Funktionen der Tiere evaluiert. Des Weiteren erfolgte nach 48 h mittels Magnet Resonanz Tomografie (MRT) unter Narkose eine Quantifizierung der Infarkt volumina, gefolgt von einer Dekapitation der Tiere und Entfernung der Gehirne für nukleotidanalytische sowie immunhistochemische Untersuchungen (Abb. 2-2).

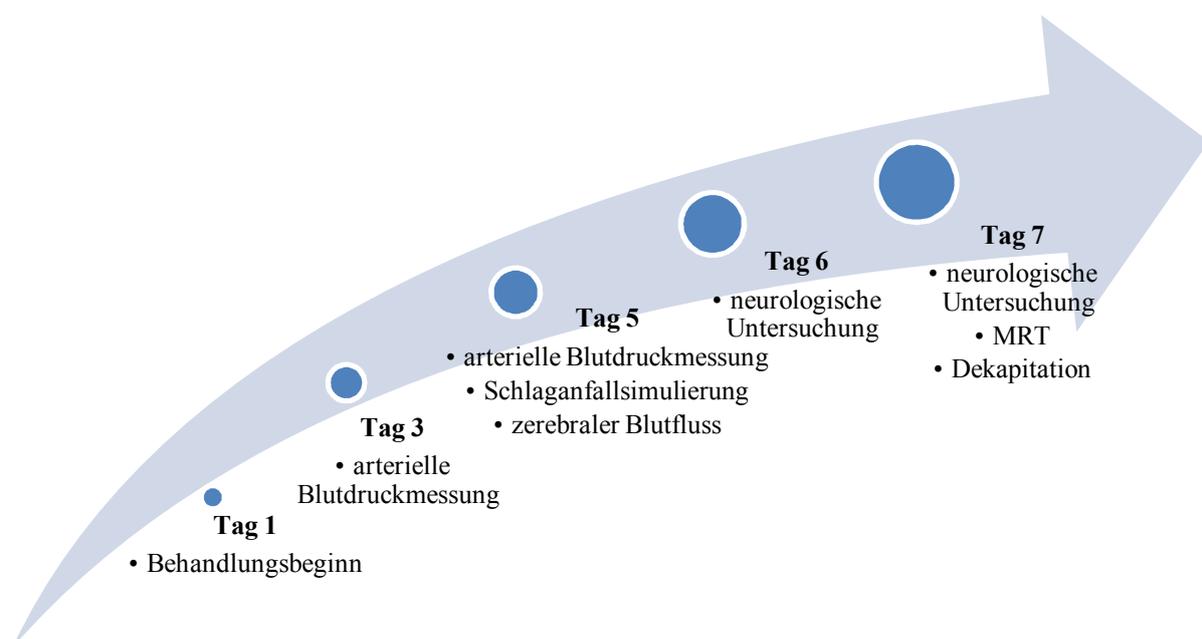


Abbildung 2-2. Studiendesgin-zeitlicher Ablauf der Hauptstudie

### 2.2.1.3. Einbringen der arteriellen und venösen Femoraliskatheter

Zur Möglichkeit der arteriellen Blutdruckmessung und intravenösen Verabreichung von Lösungen bzw. Pharmaka wurde die Inguinalregion 2 Tage vor Beginn der Blutdruckmessungen im Rahmen der Dosisfindung (s. u.) bzw. 2 Tage vor Induktion des Schlaganfalls im Rahmen der Hauptstudie punktiert und je ein Katheter in die *A.* und *V. femoralis* eingeführt. Im Falle der Hauptstudie erfolgte nur die arterielle Katheterisierung. Zu diesem Zweck wurden die Ratten mittels subkutaner Gabe von Chloralhydrat (400 mg/kg Körpergewicht [KG]) narkotisiert und auf einem angewärmten Tisch auf den Rücken gelagert. Nach Desinfektion der Leiste erfolgte eine 2-3 cm lange Inzision dieser Region mittels einer Schere. Die beiden Femoralisgefäße wurden durch Präparation des darunterliegenden Fett- und Bindegewebes dargestellt und die Arterie von der Vene getrennt. Um eine mögliche Vasokonstriktion bzw. einen Gefäßspasmus zu verhindern, wurde die *A. femoralis* mit einer Lidocain-0,9 % NaCl-Lösung beträufelt. Daran anschließend wurde die Arterie proximal (um den Katheter später zu fixieren) und distal der späteren Punktionsstelle ligiert. Nach Abklemmen des Gefäßes mit Hilfe von mikrovaskulären *Clips* und der dadurch erreichten Unterbrechung des Blutflusses erfolgte die Inzision der Arterienwand. Das im abgeklemmten Bereich befindliche Blut wurde mit einer Heparin-0,9 % NaCl-Lösung heraus gespült. Unter Verwendung von Mikrozangen wurde die Punktionsstelle nun gering aufgeweitet und der Katheter (Polyethylen, PP-50) ca. 1,6 cm vorgeschoben, die proximale Ligatur sicherte die Position des Katheters. Zur Prophylaxe entstehender Luftblasen erfolgte eine Spülung des Katheters mit einer Heparin-0,9 % NaCl-Lösung. Nach Verschluss der Punktionsstelle und Lösen der Abklemmung wurde der distale, nicht intravasal liegende, Abschnitt des Katheters über einen subkutan verlaufenden Tunnel auf der Rückseite des Halses nach außen geleitet.

Für das Einbringen des venösen Katheters in die *V. femoralis* wurde das gleiche Protokoll verwendet.

### 2.2.1.4. Bestimmung der Behandlungsdosen im Rahmen der Pilotstudie

2 Tage nach Katheterisierung wurde der arterielle Katheter über einen Signalwandler mit dem Programm *PowerLab* von ADInstruments zur Durchführung der Blutdruckmessungen verbunden und die ermittelten Daten aufgenommen sowie auf dem Computer gespeichert. Anschließend erfolgte mit einer Mikrospritze (Hamilton) die Injektion von 150 ng/kg KG Ang I respektive 50

ng/kg KG Ang II über den venösen Katheter. Nach 10-minütiger Blutdruckmessung wurden subkutan Ramipril (im Falle der vorherigen Ang I-Injektion), Telmisartan (im Falle der vorherigen Ang II-Injektion) oder 0,9 % NaCl-Lösung (sowohl nach Ang I, als auch Ang II-Injektion) appliziert und der Blutdruck nach 5, 15, 30, 60 min sowie 3, 6 und 10 Stunden gemessen.

Darüber hinaus wurde während des künstlich herbeigeführten Schlaganfalls im Rahmen der Pilotstudie der Blutdruck 15, 30 min vor und 30, 60, 120 min nach der Prozedur in den verschiedenen Behandlungsgruppen ebenfalls mit *power lab* gemessen.

### 2.2.1.5. Messung der zerebralen Blutflusses

Zur Messung des CBF nutzte man das Prinzip des Dopplereffekts auf sich bewegende Zellen: durch einen Laser erzeugtes infrarotes Licht wird von der Hautoberfläche in ein Gefäß gelenkt, in dem die Geschwindigkeit von Zellen gemessen werden soll. An ruhendem Gewebe, z. B. der Gefäßwand, wird das Licht reflektiert, ohne, dass sich die Frequenz ändert. Bei sich bewegenden Objekten, z. B. Erythrozyten, ändert sich dagegen die Frequenz des reflektierten Lichts. Diesen Unterschied bezeichnet man als *Dopplershift*, dessen Größe proportional zur Geschwindigkeit der sich bewegenden Objekte ist. Des Weiteren ist die Menge des reflektierten Lichts proportional zum Volumen der Objekte. Mittels Fotodetektor kann das reflektierte Licht in einen Fotostrom umgewandelt und durch Frequenzanalyse, entsprechend dem Dopplergesetz, die Geschwindigkeit bestimmt werden.

Für die experimentelle Herbeiführung des Schlaganfalls und Messung des CBF wurden die Ratten mit Chloralhydrat (400 mg subkutan [s. c.]) narkotisiert und auf den Rücken gelagert. 30 min zuvor erfolgte eine Blutdruckmessung. Eine gleichbleibende Körpertemperatur von 37 °C während des Eingriffes wurde durch Lagerung der Tiere auf einer Heizmatte sichergestellt.

Die frontale Region zwischen den Augen und Ohren sowie der ventrale Halsbereich wurden rasiert und anschließend mit 70 % Alkohol desinfiziert. Zur Durchführung der CBF-Messung erfolgte ein 2-3 cm langer sagittaler Schnitt in der frontalen Mittellinie, zwischen den Augen beginnend und bis in Höhe der Ohren reichend. Das darunter liegende Gewebe wurde bis zum Sichtbarwerden des Schädels frei präpariert. Mit Hilfe von stereotaktischem Instrumentarium wurde ein Polyethylenröhrchen 1 mm dorsal des Bregmas und 6 mm neben der Mittellinie auf die Oberfläche der rechten Hemisphäre platziert und mit Histoacryl<sup>®</sup> - Kleber fixiert. Durch dieses Röhrchen wurde über eine faseroptische Sonde vor, während und nach Okklusion der CBF gemessen.

### 2.2.1.6. *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Die *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) ist ein Modell für die experimentelle Herbeiführung eines temporären ischämischen Infarkts der *A. cerebri media*, welche durch verschiedene Methoden verschlossen werden kann. Durch Aufhebung dieses temporären Verschlusses und konsekutiver Reperfusion des zuvor minderversorgten Gebietes kann ein Schlaganfall, ähnlich wie beim Menschen ablaufend, simuliert werden (131, 208, 209, 210.). Hierfür erfolgte im Anschluss der CBF - Messung eine 2-3 cm lange Inzision entlang der Mittellinie im ventralen Halsgebiet. Nach sorgfältiger Präparation der *Gl. submandibularis* und der *Mm. sternohyoideus, sternothyroideus et omohyoideus* wurde die *A. carotis communis* dargestellt. Nach Ligation der *A. carotis externa* wurde die *A. carotis communis* zum *Canalis caroticus* bis zur Schädelbasis freipräpariert, gefolgt von der Ligation der *A. carotis communis*. Anschließend wurde die *A. carotis communis* oberhalb der Ligatur inzidiert und ein silikonbeschichteter Polypropylen-Faden (Prolene<sup>®</sup> 4-0) ca. 1,7 cm über die *A. carotis interna* bis in die *A. cerebri media* vorgeschoben, bis er auf Widerstand traf. Ein Abfall des CBF mittels Laser-Doppler-Messung von mindestens 75 % nach Verschluss der *A. cerebri media* wurde als erfolgreich gewertet. Nach 90-minütiger Okklusionszeit wurde der Faden gezogen, was eine Reperfusion des zuvor minderdurchbluteten Stromgebietes der *A. cerebri media* ermöglichte. Die Inzisionsstellen der Haut und der *A. carotis communis* wurden nach Entfernung der Gefäßligaturen mithilfe von Einzelknopfnähten chirurgisch verschlossen. Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere auf Heizmatten gelagert, zur postoperativen Schmerzprophylaxe erfolgte eine Applikation von 0,02 mg/kg KG Buprenorphin s. c., die bei Bedarf im Abstand von 12 h wiederholt wurde. Nach vollständigem Erlangen des Bewusstseins wurden die Ratten in die ursprünglichen Käfige mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung zurückverlagert. Scheinoperierte Tiere durchliefen dieselbe Prozedur, ohne, dass ein Faden in die *A. carotis communis* eingeführt wurde.

### 2.2.1.7. Angiografie

Die Angiografie- und MRT-Aufnahmen erfolgten im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) der Charité Universitätsmedizin Berlin, Schumannstraße 21-22, 10115 Berlin, mit freundlicher Unterstützung von Dipl.-Ing. S. Müller.

Exemplarisch erfolgte in Narkose mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG s. c.) die angiografische Darstellung der Perfusionsveränderungen im Rahmen der MCAO 30 min vor und 10 min nach

Okklusion sowie 30 min nach Herausziehen des Fadens. Hierzu nutzte man eine 3D-Gradient *Echo Flow Compensated Sequence* (GEFC-TOMO) ohne Kontrastmittel. Die Bilderfassung erfolgte mit folgenden Parametern: TR = 50 ms, TE = 5,6 ms, Conner = 45°, FOV = 35 x 35 mm mit einer 256 x 192 x 64 Matrix. Die aufgenommenen Daten wurden anschließend mit dem Programm *ParaVision* bearbeitet und in 3D Bilder umgewandelt.

### 2.2.1.8. Quantifizierung der Infarktvolumina

Mittels MRT wurde 2 Tage nach der MCAO das Volumen des Schlaganfalls unter Narkose mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG s. c.) quantifiziert. Dazu wurden ein 7 Tesla Bruker *Scanner* (Pharmascan 70/16 AS, Bruker Biospin, Ettlingen, D) mit einer Resonanzfrequenz von 300 Hz und einem Gradienten von 120 mT/m mit 40 A in Verbindung mit einer Linux HP-*workstation* und dem Programm *ParaVision 3.0.1* verwendet und 35 axiale Schnitte mit einer Schichtdicke von 0,5 mm mit Hilfe einer T2-gewichteten, 2D Turbo-Spin-Echo Sequenz mit Fettunterdrückung (TR 5218,7 ms, TE<sub>eff</sub> 65,2 ms, RARE-Faktor 8 und 6 Mittelungen) aufgenommen. Die Synchronisierung mit der Herz- und Atemfrequenz erfolgte mit BioTrig *Animal Life Monitoring 9M CPL* und der BioTrig *BT1 Software*. Anschließend konnte mit Hilfe des Programms *Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa, USA)* das Volumen berechnet werden. Zu diesem Zweck wurden die hyperintens erscheinenden ischämischen Regionen in jeder Schicht mit Hilfe eines *region of interest-Tools* markiert und zu einem 3D-Objekt zusammengerechnet. Daraus konnte das jeweilige Schlaganfallvolumen automatisch ermittelt werden.

### 2.2.1.9. Beurteilung der neurologischen Defizite

Die Einschätzung der neurologischen Defizite durch einen verblindeten Untersucher erfolgte 24 und 48 h nach der MCAO. Dazu wurde ein 18-Punktesystem nach Garcia *et al.* (211) verwendet, welches 6 Aspekte untersucht, die sich nach einem Schlaganfall verschlechtern. Die niedrigste Punktzahl mit dem numerischen Wert von 3 zeigt ein schwerwiegendes Defizit an, die höchste Punktzahl mit dem numerischen Wert von 18 bedeutet keinen neurologischen Ausfall.

Tabelle 2-16. zeigt eine Übersicht der 6 Tests und die Bedeutung der jeweiligen Punktzahl.

## Material und Methoden

**Tabelle 2-17.** Bedeutung der im Rahmen der neurologischen Untersuchung erhobenen Punktwerte

Test	Score			
	0	1	2	3
Spontanaktivität (im Käfig für 5 min)	Keine Bewegung	Kaum Bewegung	Bewegung, aber erreicht nicht mind. 3 Ecken des Käfigs	Bewegung, erreicht mind. 3 Ecken des Käfigs
Symmetrie der Bewegungen (alle Gliedmaßen)	Linke Seite: keine Bewegung	Linke Seite: geringe Bewegung	Linke Seite: langsame Bewegung	Symmetrische Bewegung auf beiden Seiten
Symmetrie der Vordergliedmaßen (Strecken, während Hochhalten des Schwanzes)	Linke Seite: keine Bewegung, kein Ausstrecken	Linke Seite: leichte Bewegung bis hin zur Streckung	Linke Seite: Bewegung und Streckung schwächer als rechts	Symmetrische Streckung
Klettern an der Wand des Käfigs		Unterlassung des Kletterns	Linke Seite: schwach	Normales Klettern
Reaktion auf Berührung des Rumpfes		Keine Reaktion auf der linken Seite	Schwache Reaktion der linken Seite	Symmetrische Reaktion
Reaktion auf Berührung der Sinushaare		Keine Reaktion auf der linken Seite	Schwache Reaktion der linken Seite	Symmetrische Reaktion

### 2.2.1.10. Tötung der Tiere und Organentnahme

Unmittelbar im Anschluss an die MRT-Untersuchung wurden die narkotisierten Ratten dekapitiert und die Gehirne entnommen. Durch eine Schnittmatrix wurden die Gehirne in Scheiben geschnitten und anschließend mit flüssigem Stickstoff Schock- bzw. in Gefriermedium gefroren und bei -80 °C im Kühlschrank gelagert. Später erfolgte die Aufarbeitung der Proben zur RNA -Isolierung (Bregma: - 2 bis - 4 mm) und Immunhistochemie (Bregma: - 0,5 bis - 2).

### 2.2.2. Methoden der Nukleotidanalytik

#### 2.2.2.1. RNA-Isolation

Für die Isolierung der RNA wurden die Gehirnproben (Bregma -2,0 bis -4,0) in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsergerätes zermahlen. Nach Zugabe von 1 ml TRIzol pro 50-100 mg Gewebe wurden die Proben durch einen Vortexer homogenisiert, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform pro ml TRIzol zugeetzt, die Proben 15 s mit der Hand geschüttelt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 4 °C für 15 min mit 12.000 x g zentrifugiert. Von den dabei entstandenen 3 Phasen (wässrige Phase, Interphase und rote Phase) wird die RNA von der wässrigen Phase repräsentiert. Diese wurde von den anderen Phasen getrennt und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TRIzol vermischt. Daraufhin erfolgten eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 12.000 x g. Das infolgedessen entstandene *Pellet* wurde mit 1 ml 75 % Ethanol pro ml TRIzol gewaschen, kurz gevortext, für 5 min bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugiert sowie nach 5-10-minütiger Lufttrocknung in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben 1:100 verdünnt und deren Extinktion bei 260 nm ultraviolett (UV)-fotometrisch gemessen, woraus die Konzentration ermittelt werden kann. Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm und die Bestimmung des Quotienten beider ermittelter Werte (260/280) kann auf die Qualität der Proben geschlossen werden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Proben mit einem Quotienten > 1,6 verwendet.

#### 2.2.2.3. DNase-Verdau

2 µg der isolierten RNA wurden bis zu einem Volumen von 8 µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 2 µl DNase sowie 1 µl DNase Puffer versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 µl *stop solution* dazugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert sowie im Anschluss auf Eis gelagert.

### 2.2.2.4. Umschreiben der RNA in komplementäre DNA

Für den Schritt des Umschreibens der RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkriptase wurde die 13  $\mu$ l Volumen umfassenden Probe nach dem DNase-Verdau mit 1  $\mu$ l *Random Primer* versetzt und 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz ein Gemisch, bestehend aus 5  $\mu$ l 5x M-MLV-Puffer, 1,25  $\mu$ l 10 mM dNTP's, 0,5  $\mu$ l M-MLV-Reverse Transkriptase, 0,75  $\mu$ l Rnasin und 4,5  $\mu$ l bidestilliertem Wasser hinzugegeben und 60 min bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2.5. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

Die quantitative *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und gestattet die Möglichkeit der Echtzeitquantifizierung. Wie bei einer konventionellen PCR besteht der Vervielfältigungszyklus bei einer RT-PCR aus den Schritten Denaturierung-Anlagerung (*Annealing*)-Verlängerung (*Elongation*): Bei einer Temperatur von 90-95 °C werden doppelsträngige DNA-Fragmente aufgeschmolzen, an die sich bei 55-60 °C zwei synthetische, gegenläufig orientierte Oligonukleotide (*Primer*) an die jeweilige komplementäre Sequenz anlagern. Diese dienen einer, bei ca. 72 °C arbeitenden, hitzestabilen DNA-Polymerase als Startpunkt zur Verlängerung der DNA-Fragmente. Durch 30-40-malige Wiederholung des Zyklus' kann eine exponentielle Amplifikation der Fragmente erreicht werden. Im Rahmen der RT-PCR werden verschiedene Methoden zur Detektion von DNA-Fragmenten verwendet. Neben genspezifischen fluoreszenzmarkierten Hybridisierungs- oder Hydrolysierungssonden kommen unspezifische, mit doppelsträngiger DNA in Wechselwirkung tretende, Farbstoffe zum Einsatz. Ein diesbezügliches Beispiel stellt der Farbstoff *SYBR Green*<sup>®</sup> dar, welcher in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA interkaliert. Mit steigender Anzahl synthetisierter Fragmente nimmt auch das Fluoreszenzsignal zu. Mit Hilfe von Schmelzkurvenanalysen und gelelektrophoretischen Untersuchungen kann eine Falsifikation erhobener Daten infolge unspezifischer *Primerdimere*, in die sich der *SYBR Green*<sup>®</sup>-Farbstoff interkalieren kann, vermieden bzw. dessen Auftreten vermindert werden (212).

Die Auswertung der ermittelten Daten kann u. a. mittels der  $\Delta \Delta$  *cycle threshold* (Ct)-Methode vorgenommen werden. Hierbei erfolgt eine Normalisierung der Expression von Zielgenen mit der eines nicht regulierten *house keeping*-Gens (z. B. 18 S-ribosomale RNA [rRNA]). Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant oberhalb der

Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Zur Berechnung des  $\Delta$  Ct-Wertes zieht man den Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens ab:

$$\Delta \text{ Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$$

Anschließend subtrahiert man den  $\Delta$  Ct-Wert der Kontrollgruppe vom  $\Delta$  Ct-Wert der Behandlungsgruppe und erhält den  $\Delta \Delta$  Ct-Wert:

$$\Delta \Delta \text{ Ct} = \Delta \text{ Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta \text{ Ct}_{\text{Kontrolle}}$$

Durch Berechnung von  $2^{-\Delta \Delta \text{ Ct}}$  erhält man das Verhältnis der Genexpression zwischen beiden Gruppen (213).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der RT-PCR eine 96-Well-Platte verwendet. Pro Well erfolgte die Pipettierung von 10  $\mu\text{l}$  der zuvor auf eine Konzentration von 2 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnten cDNA-Proben. Anschließend wurden pro Well 20  $\mu\text{l}$  des PCR-Mastermixes, bestehend aus 15  $\mu\text{l}$  SYBR Green<sup>®</sup> Housemix (Zusammensetzung s. o.), jeweils 0,6  $\mu\text{l}$  10 mM sense/antisense Primer, 0,075  $\mu\text{l}$  5 U/ $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase und 3,725  $\mu\text{l}$  bidestilliertes Wasser zu einem Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$ /Well hinzugegeben. Als Referenzgen diente bei allen Messungen die Expression der 18 S-rRNA. Im Anschluss wurde die 96-Well-Platte mit einer durchsichtigen Folie beklebt und 4 min bei 4 °C mit 4.000 x g zentrifugiert. Nach Überführung der Platte in den Thermocycler und der Einstellung des folgenden Temperaturprofils erfolgte der Beginn des entsprechenden Reaktionszyklus‘:

94 °C für 5 Minuten

94 °C für 30 Sekunden

60 °C für 30 Sekunden

72 °C für 40 Sekunden

30-40fache Wiederholung

72 °C für 10 Minuten

4 °C bis zur weiteren Bearbeitung

Pro Ansatz erfolgte eine dreimalige Messung. Zusätzlich wurde im Sinne einer Negativkontrolle eine Wasserprobe durchgeführt, die anstelle der cDNA ein entsprechendes Volumen bidestilliertes Wasser enthielt. Zur Auswertung wurde die oben beschriebene  $\Delta \Delta$  Ct-Methode

herangezogen. Nach Berechnung der entsprechenden Expressionsverhältnisse ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) wurden die Werte arithmetisch gemittelt sowie auf einen standardisierten Mittelwert der Kontrolle normalisiert und in Prozent angegeben.

### 2.2.3. Methoden der Immunfluoreszenzzytochemie

#### 2.2.3.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden die bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Proben in einen Schnellschnitt-Kryostaten (Leica CM 1900, Leica Microsystems, Wetzlar, D) überführt und auf eine Objektplatte aufgefroren. Nach Einsetzen in den Probehälter wurden Schnitte (mit einem Abstand zum Bregma von ca.  $-1\text{ mm}$ ) von mit einer Schichtdicke von  $7\text{ }\mu\text{m}$  bei einer Kühlkammertemperatur von  $-17\text{ °C}$  angefertigt und auf einen warmen Objektträger aufgebracht. Hiernach schlossen sich eine Lufttrocknung sowie eine Fixierung der Schnitte für  $10\text{ min}$  in gekühltem Aceton ( $-17\text{ °C}$ ) an. Als letzter Schritt erfolgte die Lagerung der Objektträger bei  $-20\text{ °C}$ .

#### 2.2.3.2. Färbung der Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin

Vor Anfertigung immunfluoreszenzzytochemischer Färbungen wurden Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für jede Probe hergestellt. Als Grundlage diente folgendes Protokoll:

Destilliertes Wasser	15 s
Hämatoxylin	30 s
Wasser	30 s
Wasser	30 s
70 % Ethanol	15 s
Eosin	5 s
95 % Ethanol	15 s
95 % Ethanol	15 s
100 % Ethanol	15 s
100 % Ethanol	15 s

Xylol

60 s

Nach Lufttrocknung erfolgte das Aufbringen eines Deckgläschens unter Verwendung eines Entellan<sup>®</sup>-Tropfens.

### 2.2.3.3. Immunfluoreszenzfärbungen

#### 2.2.3.3.1. Nissl-Fluoreszenzfärbung mittels *NeuroTrace<sup>TM</sup>*

Die Nissl-Substanz, beschrieben durch Franz Nissl, setzt sich aus ribosomaler RNA zusammen, die mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist und befindet sich insbesondere in den neuronalen Perikarya.

Im Allgemeinen basiert die konventionelle Nissl-Färbung auf einer Interaktion zwischen basischen Farbstoffen wie Cresylviolett, Thionin, Toluidinblau, Methylenblau oder Anilin und Nukleinsäuren. Dabei werden sowohl DNA in den Zellkernen, als auch RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums angefärbt. Aufgrund der hochgradigen Proteinsynthese in Neuronen und der damit verbundenen großen Menge an rauem endoplasmatischen Retikulum, können mit Hilfe dieser Methode spezifisch Neuronen angefärbt werden und als Marker vitaler Neuronen sowie deren physiologischen Zustand dienen (214).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll erstellt:

1. Schnitte 40 min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) waschen
2. Schnitte 10 min in PBS + 0,1 % Triton X-100 waschen
3. Schnitte 2 x 5 min in PBS waschen
4. Schnitte mit einem Liquidblocker umranden
5. *NeuroTrace<sup>TM</sup>* 1 : 50 verdünnen und ca. 150 µl/Schnitt geben
6. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
7. Schnitte 10 min in PBS + 0,1 % Triton X-100 waschen
8. Schnitte 2 x 5min in PBS waschen
9. Schnitte 2 h bei Raumtemperatur in PBS waschen

Nach Abschluss des Protokolls wurde auf die Schnitte je ein Tropfen nicht fluoreszierendes Hydromount-Medium gebracht und mit einem Deckgläschen versehen. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

### 2.2.3.3.2. Fluoreszenzfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol

Durch Anlagerung an Adenin-Thymin-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA bildet 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) einen fluoreszierenden Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm und einem Emissionsmaximum bei 461 nm. Bei Anregung mit UV-Licht zeichnet sich DAPI durch eine blaue Farbe aus. Ferner interkaliert dieser Farbstoff mit RNA, jedoch liegt das Emissionsspektrum unter diesen Bedingungen in höheren Wellenlängenbereichen. Zudem ist die entstehende Fluoreszenz wesentlich schwächer als bei der Anregung DNA-gebundenen Farbstoffs (216, 215).

Für die Färbung von Schnitten wurde der bestehende DAPI-Stock 1:1000 verdünnt und anschließend ca. 150 µl auf einen Schnitt gegeben. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Objektträger 3 mal für 10 min in PBS gewaschen und unter der Verwendung von nicht fluoreszierendem Hydromount-Medium mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

### 2.2.3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörpern

Ziel immunhistochemischer Färbungen ist es, Antigene, z. B. in Geweben, durch spezifische Antikörper sichtbar zu machen. Der dabei verwendete Antikörper, zumeist Immunglobulin G (IgG), bindet an das gesuchte Epitop und kann mittels verschiedener Detektormethoden sichtbar gemacht werden. Zu den am häufigsten eingesetzten Mitteln zählen Enzyme, z. B. Peroxidasen, alkalische Phosphatasen oder Glucoseoxidasen, die bei Anwesenheit eines spezifischen Substrates und eines Chromogens die Bildung eines Farbstoffes an der Stelle der Antikörperreaktion katalysieren. Daneben werden fluoreszierende Stoffe und Metalle verwendet. Unterschieden werden 2 Methoden der Detektion: bei der direkten Methode wird der spezifische Antikörper mit einem Reportermolekül gekoppelt. Zur Verfügung stehen u. a. Fluorochrome, Enzyme und Biotin. Demgegenüber steht die indirekte Methode. Dabei wird dem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) ein zweiter, gegen den Primärantikörper gerichteter, Antikörper (Sekundärantikörper) zugesetzt. Letzterer ist wiederum mit einem Reportermolekül gekoppelt. Durch die Verwendung eines gekoppelten Sekundärantikörpers können intensivere Signale generiert werden, da pro gebundenem Primärantikörper zwei Sekundärantikörper binden. Somit ist es möglich auch geringe Mengen an Antigen zu detektieren (217). Für die im Folgenden beschriebene immunhistochemische Methode wurden Sekundärantikörper verwendet, die an das Fluorochrom

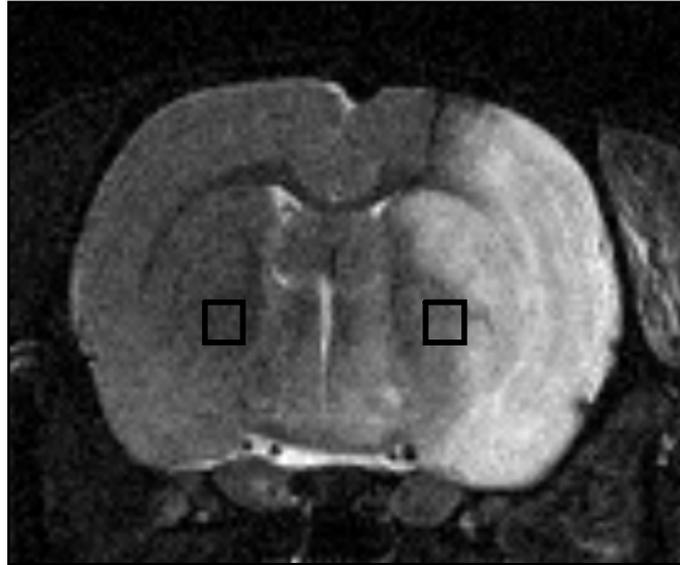
Cy3 (Emissionsmaximum: 571 nm) gekoppelt sind und bei Anregung mit UV-Licht fluoreszieren.

Zu Beginn wurden die Schnitte 3 mal in PBS gewaschen (1 x 10 s, 2 x 5 min) und anschließend mit einem Liquidblockerstift umrandet. Anschließend erfolgte das Aufbringen von 150 µl 5 %-igem *Donkey Blocking Serum* (DBS) pro Schnitt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Primärantikörper in 5 %-igem DBS 1:50 verdünnt und pro Schnitt 150 µl des Primärantikörpers pipettiert. Über Nacht wurden die Schnitte bei 4 °C inkubiert und im Anschluss 3 mal in PBS gewaschen (1 x 10 s, 2 x 5 min). Im Folgenden wurde der Sekundärantikörper 1 : 100 in 5 %-igem DBS verdünnt und je 150 µl auf jeden Schnitt gegeben und 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Rahmen jeder Färbung erfolgte ebenso die Anfertigung einer Negativkontrolle. Hierzu wurden anstelle des Primärantikörpers 150 µl DBS pro Schnitt pipettiert. Die übrigen Schritte glichen dem hier beschriebenen Protokoll.

Nach 3-maligem Waschen in PBS (1 x 10 s, 2 x 5 min) erfolgte auf den gleichen Schnitten die Färbung mittels DAPI gemäß dem oben beschriebenen Protokoll. Sämtliche Inkubationen wurden in einer Feuchtkammer durchgeführt.

### 2.2.3.3.4. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen

Zu Beginn wurden die HE-Färbungen der Schnitte in 5- und 10-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht und die Infarktregionen lokalisiert. In der periventrikulären Penumbra wurde in der Fluoreszenzfärbung mittels *NeuroTrace<sup>TM</sup>* die Anzahl der Neuronen in 10-facher Vergrößerung ermittelt und zuvor das jeweilige Bild gespeichert. In gleicher Weise erfolgte das Prozedere auf der zum Schlaganfall kontralateralen, dem Bereich der periventrikulären Penumbra entsprechenden, Region (siehe Abb. 2-3.).



**Abbildung 2-3.** Repräsentative MRT-Aufnahme eines infarzierten Gehirns. Die untersuchten Areale wurden markiert.

Bei der Auswertung der Antikörper-abhängigen Färbungen wurden 2 Regionen der zum Schlaganfall ipsilateralen periventriculären Penumbra in 20-facher Vergrößerung abfotografiert und im Anschluss sowohl die Antigen-positiven Zellen, als auch die Zellen in der DAPI-Färbung gezählt. In gleicher Weise wurden die Daten in den korrespondierenden Regionen der kontralateralen Seite erhoben. Aus den Summen der beiden ausgezählten Regionen wurde jeweils das arithmetische Mittel bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei jeder Färbung verblindet.

### **2.2.4. Methoden der Statistik**

Alle Werte sind als Mittelwerte (MW) angegeben. Fehlerindikatoren in den Diagrammen geben die Standardfehler der Mittelwerte an (SEM). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des studentischen T-Tests. Verwendet wurden zweiseitige T-Tests vom Typ 2 (ungepaart, gleiche Varianz). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

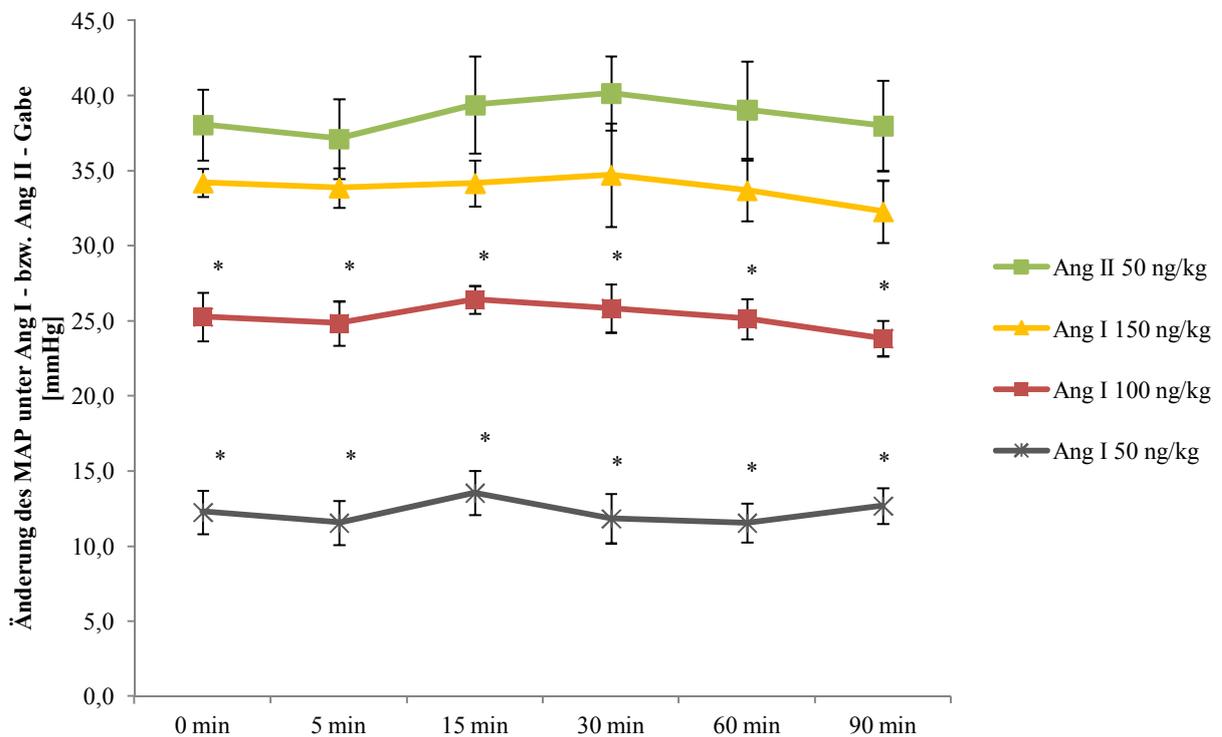
## 3. Ergebnisse

### 3.1. Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche

#### 3.1.1. Ergebnisse der Pilotstudie zur Dosisfindung

##### 3.1.1.1. Bestimmung der Angiotensin I- und Angiotensin II-Konzentrationen

Vor Beginn der eigentlichen Experimente erfolgte im Rahmen der Pilotstudie die Bestimmung jener Ang I- und Ang II-Konzentrationen, die eine äquivalente Aktivierung des RAS und eine damit einhergehende Erhöhung des mittelarteriellen Drucks (MAP) bewirken. Nach intravenöser Gabe von Ang II (50 ng/kg KG) sowie verschiedener Dosen von Ang I (50, 100, 150 ng/kg KG) als Bolus wurde die Änderung des MAP nach 5, 15, 30, 60 und 90 min gemessen.

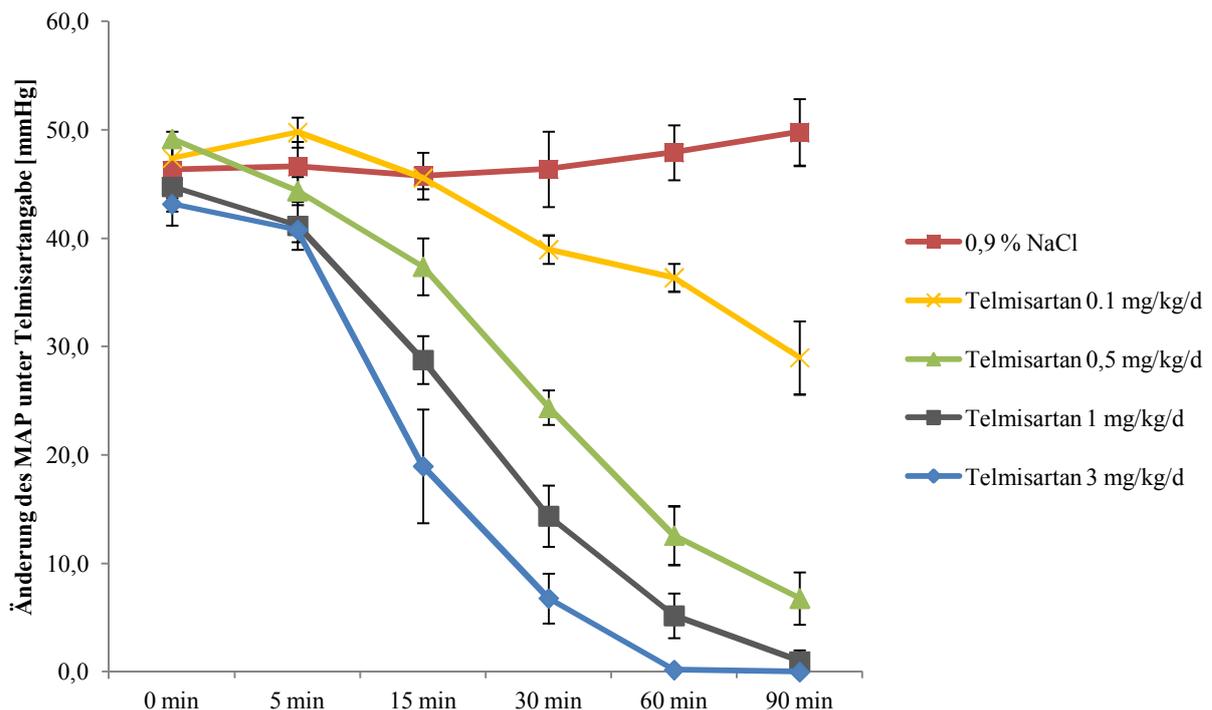


**Abbildung 3-1.** Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Ang I (n = 7 pro Gruppe) und Ang II (n = 7); Angabe in mmHg; \*p < 0,05 vs. Ang II 50 ng/kg

Anhand der Darstellung in Abb. 3-1. ist zu erkennen, dass die Ang I-Konzentration von 150 ng/kg KG eine annähernd gleiche Steigerung des MAP bewirkt, die durch Injektion von 50 ng/kg KG Ang II hervorgerufen wird. Bei Verwendung geringerer Dosen von Ang I zeigen sich signifikant geringere Änderungen des MAP im Vergleich zur Gabe von 50 ng/kg KG Ang II. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden, auf diesen Ergebnissen basierend, mit einer Ang I-Konzentration von 150 ng/kg KG sowie, im Falle der Verwendung von Ang II, mit einer Konzentration von 50 ng/kg KG gearbeitet.

### 3.1.1.2. Bestimmung der Telmisartan-Konzentration

Zur Bestimmung der zu verwendenden Telmisartan-Konzentration wurden verschiedene Dosierungen vor der Injektion von 50 ng/kg KG Ang II subkutan appliziert und die Veränderung des MAP zu den Zeitpunkten 5, 15, 30, 60 und 90 min gemessen.



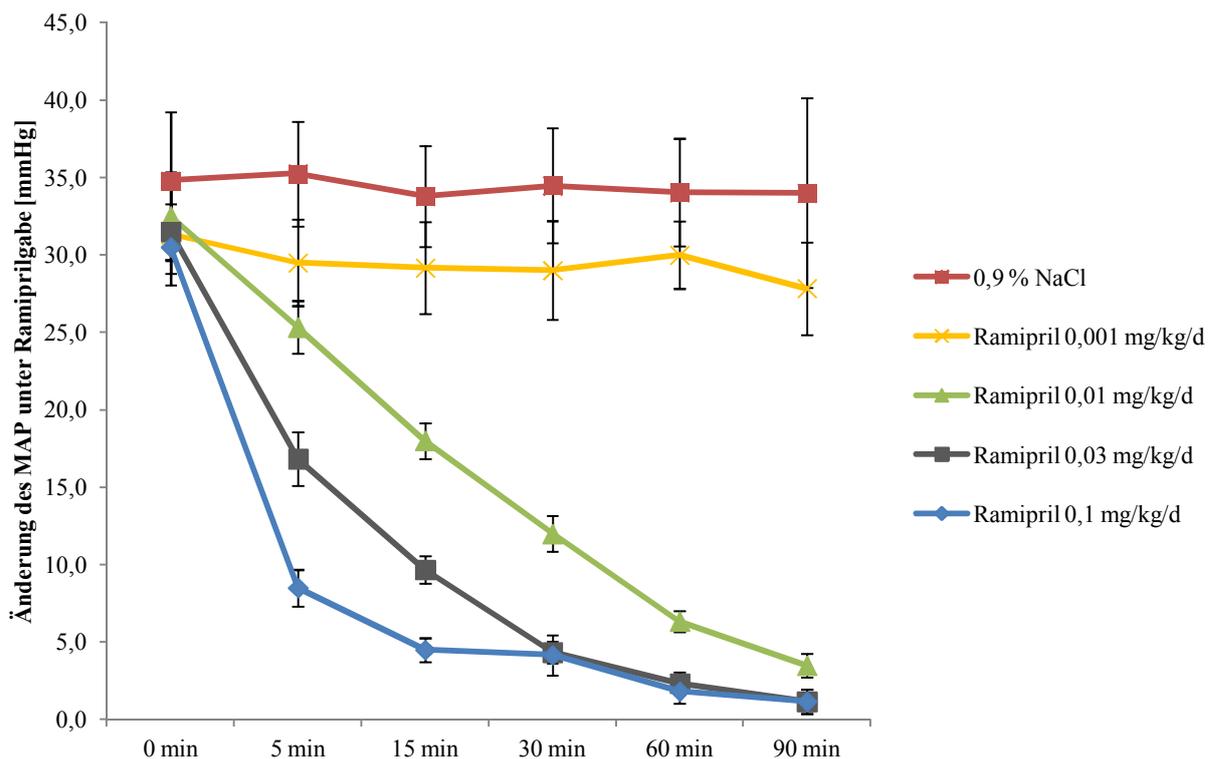
**Abbildung 3-2.** Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Telmisartan (n = 5 pro Gruppe) und 0,9 % NaCl (n = 5) vor Applikation von 50 ng/kg KG Ang II; Angabe in mmHg

In Abb. 3-2. ist unter der Gabe von 3 sowie 1 mg/kg KG Telmisartan eine vollständige Unterdrückung der durch Ang II hervorgerufenen Steigerung des MAP nach 60 respektive 90 min zu

erkennen. Eine nahezu vollständige Aufhebung des MAP-Anstiegs nach Ang II-Gabe kann ebenfalls nach der Testdosis von 0,5 mg/kg KG beobachtet werden. Dagegen zeigt sich bei Injektion von 0,1 mg/kg KG des Pharmakons nur eine unvollständige Unterdrückung. In der Kontrollgruppe finden sich keine Veränderungen des gesteigerten MAP. Für den weiteren Verlauf der Studie wurde die geringste Telmisartan-Testdosis gewählt, die noch eine Unterdrückung hervorrufen kann (0,5 mg/kg KG).

### 3.1.1.3. Bestimmung der Ramipril-Konzentration

Analog zur Bestimmung der Telmisartan-Konzentration erfolgte vor der Gabe von Ang I die Injektion verschiedener Ramipril-Dosierungen mit nachfolgender Bestimmung der Änderung des MAP nach 5, 15, 30, 60 sowie 90 min.



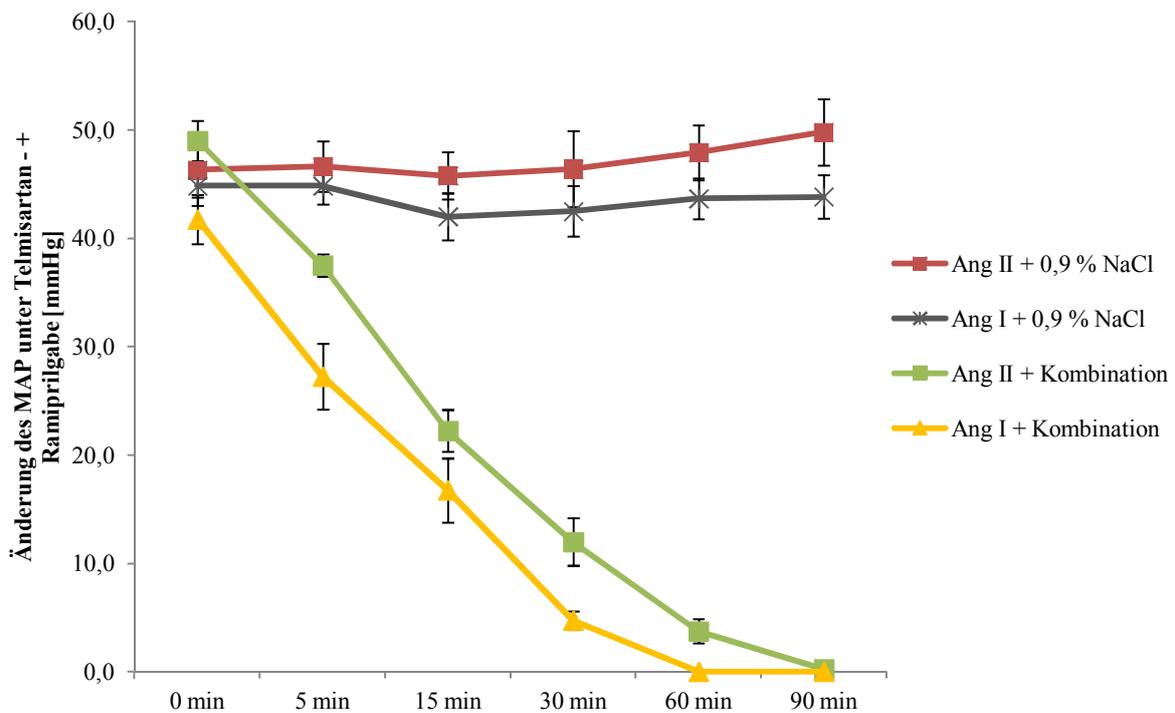
**Abbildung 3-3.** Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Ramipril (n = 6 pro Gruppe) und 0,9 % NaCl (n = 7) vor Applikation von 150 ng/kg KG Ang I; Angabe in mmHg

Nach 90 min ist in Abb. 3-3 eine fast vollständige Unterdrückung der Steigerung des MAP durch Ang I bei der Gabe von 0,1, 0,03 sowie 0,01 mg/kg KG Ramipril festzustellen. Dagegen findet

sich in der Gruppe mit 0,001 mg/kg KG eine unvollständige Normalisierung der Ang I-Antwort. Mit NaCl behandelte Tiere zeigen keine Inhibition des MAP-Anstiegs. Als optimale Behandlungsdosis wurde die geringste, noch einen Effekt auf die Aufhebung des MAP-Anstiegs habende, Konzentration von 0,01 mg/kg KG gewählt.

### 3.1.1.4. Bestimmung der Konzentration in der Kombinationsbehandlungsgruppe

Nach Auswahl der geeigneten Einzeldosen wurde überprüft, ob auch eine Kombinationstherapie mit Telmisartan und Ramipril in den jeweiligen Einzeldosen eine Unterdrückung der Blutdruckantwort nach Ang I-sowie Ang II-Gabe hervorruft. Dazu wurde, den Untersuchungen für die Einzeldosen entsprechend, vorgegangen und die Änderung des MAP nach Applikation des jeweiligen Angiotensins zu verschiedenen Zeiten gemessen.



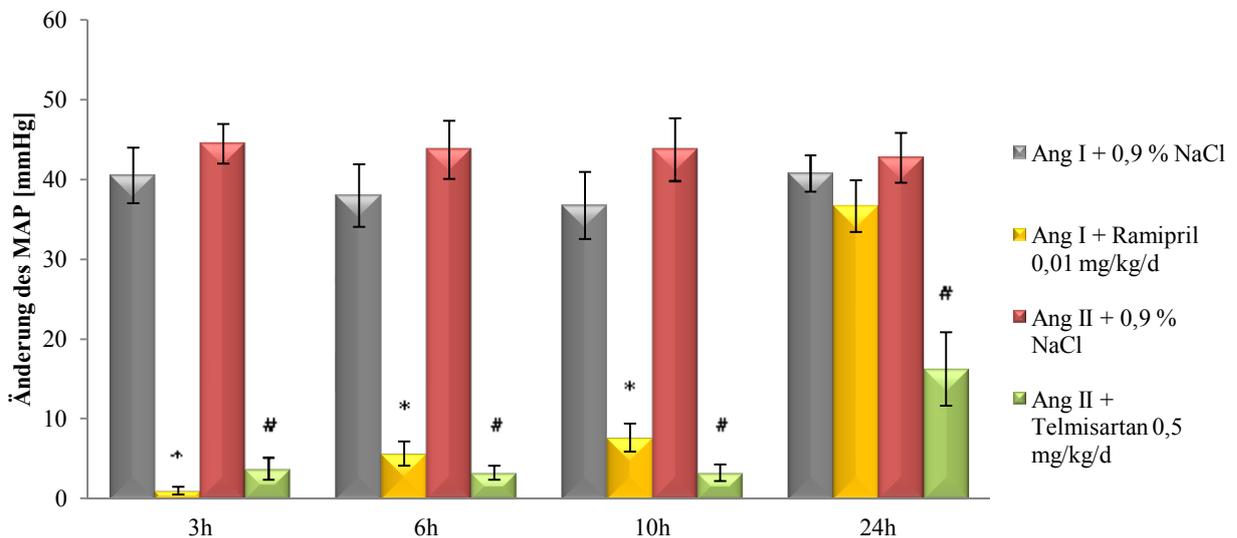
**Abbildung 3-4.** Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von Ang I + 0,9 % NaCl (n = 6), Ang II + 0,9 % NaCl (n = 5), Ang I + 0,5 mg/kg KG Telmisartan + 0,01 mg/kg KG Ramipril (n = 4) und Ang II + 0,5 mg/kg KG Telmisartan + 0,01 mg/kg KG Ramipril (n = 4); Angabe in mmHg

Die Kombinationsbehandlung zeigt in Abb. 3-4. sowohl nach Gabe von Ang I (60 min), als auch nach Ang II (90 min) eine vollständige Unterdrückung der durch die Angiotensine verursachten Anstiege des MAP. Im Vergleich dazu fehlt in den 0,9 % NaCl-Gruppen eine diesbezügliche

Wirkung. Im Rahmen der folgenden Experimente wurde für die Kombinationstherapie eine Dosierung von 0,5 mg/kg KG Telmisartan + 0,01 mg/kg KG Ramipril gewählt.

### 3.1.1.5. Messung der Änderung des mittelarteriellen Drucks nach Renin-Angiotensin-System-Blockade über 24 h

Voraussetzung für die Hauptstudie war eine, über 24 h anhaltende, Blockierung des RAS. Zu diesem Zweck wurden innerhalb der mit den Einzeldosen behandelten Gruppen sowie in den Ang I-bzw. Ang II-Kontrollgruppen die Änderungen des MAP zu den Zeitpunkten 3, 6, 10 und 24 h nach Applikation des jeweiligen Angiotensins ermittelt.

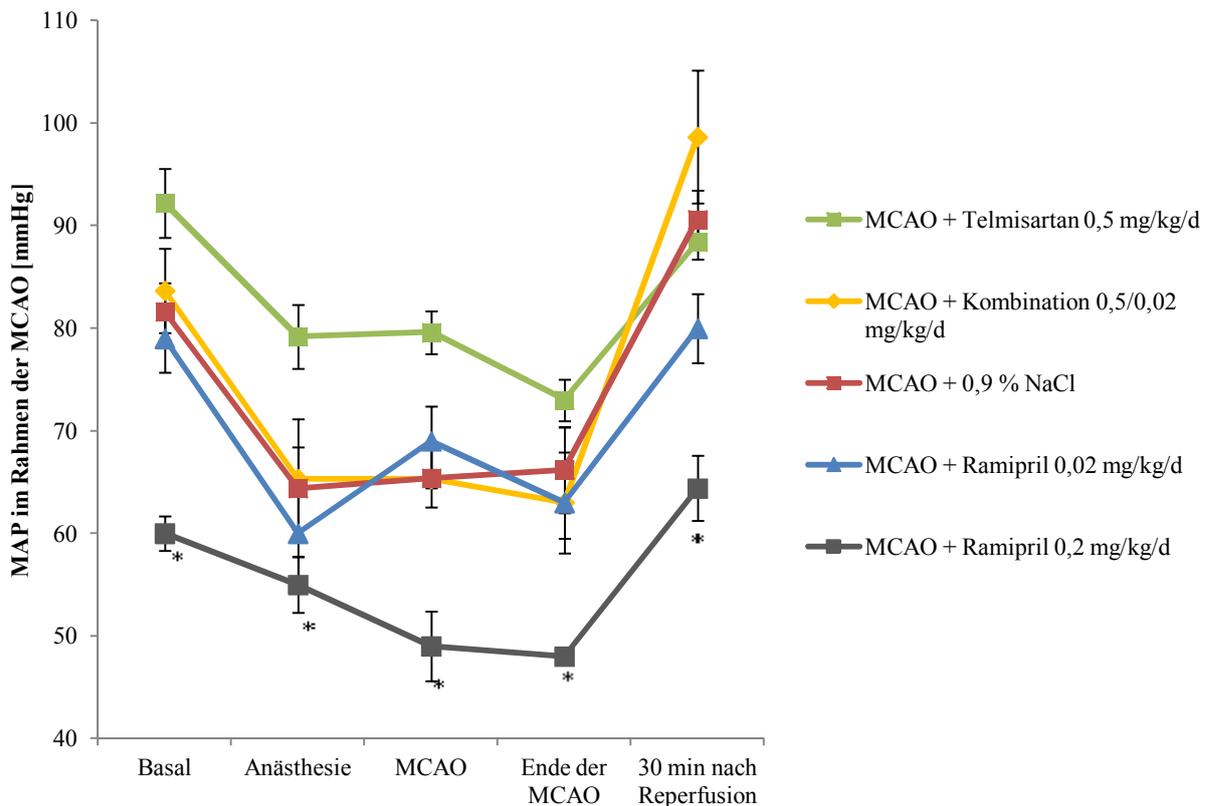


**Abbildung 3-5.** Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von Ang I + 0,9 % NaCl (n = 4), Ang I + Ramipril 0,01 mg/kg/d (n = 3), Ang II + 0,9 % NaCl (n = 4) und Ang II + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4); Angabe in mmHg; \* p < 0,05 vs. Ang I + NaCl, #p < 0,05 vs. Ang II + 0,9 % NaCl

In Abb. 3-5. findet sich in der Telmisartan-Behandlungsgruppe zu jedem der Messzeitpunkte eine signifikante Unterdrückung der MAP-Steigerung. Demgegenüber steigt die Änderung des MAP zum Messpunkt 24 h in der Ramipril-Behandlungsgruppe wieder an, es besteht keine signifikante Inhibition der Blutdruckantwort mehr. Im Folgenden wurde die Dosis von 0,01 mg/kg KG zweimal täglich zu einer Gesamtdosis von 0,02 mg/kg KG gegeben. Ferner wurde eine zweite Behandlungsgruppe mit Ramipril in Äquivalentdosis (0,2 mg/kg KG) eingeführt.

**3.1.1.6. Bestimmung des mittelarteriellen Drucks im Rahmen der *Middle Cerebral Artery Occlusion***

Eine weitere Voraussetzung für die Hauptstudie war eine fehlende Blutdrucksenkung durch die Medikation vor, während und nach der Schlaganfallsimulation. Hierfür wurde der MAP vor der MCAO, während der Narkose, der 90-minütigen Gefäßokklusion der *A. cerebri media* sowie der Reperusionsphase gemessen.



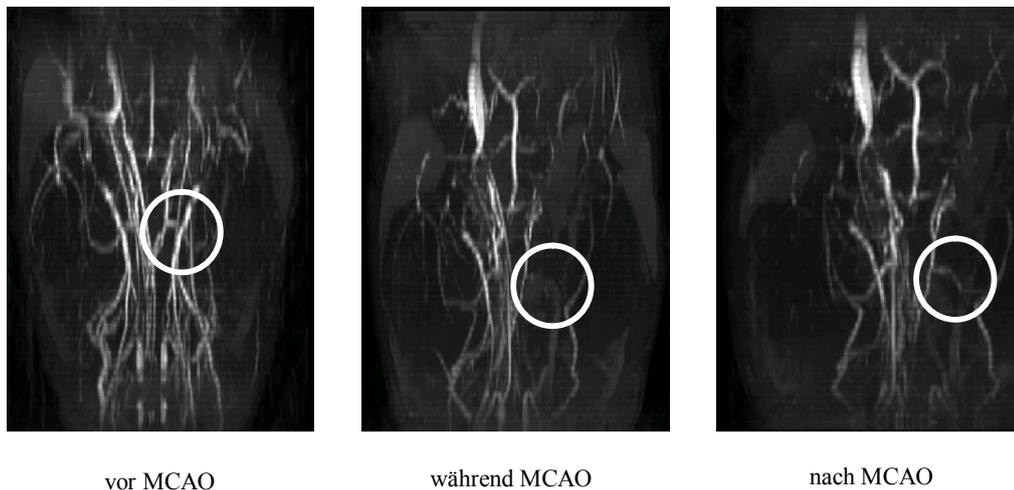
**Abbildung 3-6.** Grafische Darstellung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten der Schlaganfallsimulation. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 5), MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + 0,9 % NaCl (n = 7), MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 5) und MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 5); Angabe in mmHg; \*p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

Wie in Abb. 3-6. ersichtlich, bestehen zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen mit 0,5 mg/kg/d Telmisartan, 0,02 mg/kg/d Ramipril sowie der Kombinationstherapie zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der ermittelten Werte für den MAP. Dagegen zeigt die Kurve der Behandlungsgruppe mit 0,2 mg/kg/d Ramipril zu jedem Zeitpunkt eine signifikante Senkung des MAP im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.1.2. Ergebnisse der Hauptstudie im Rahmen der *Middle Cerebral Artery Occlusion-* Versuche

#### 3.1.2.1. Darstellung der intrakraniellen Gefäße vor, während und nach der *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Zur Darstellung der intrakraniellen, intrazerebralen Gefäße und Visualisierung des Erfolges der Schlaganfallsimulation - der okkludierten *A. cerebri media* - erfolgten Angiografieaufnahmen mittels eines 7-T-Kleintier-MRT. Abb. 3-7. zeigt repräsentative Aufnahmen vor, während und nach der MCAO, das zu verschließende Gefäß (*A. cerebri media*) ist mit einem weißen Kreis markiert.

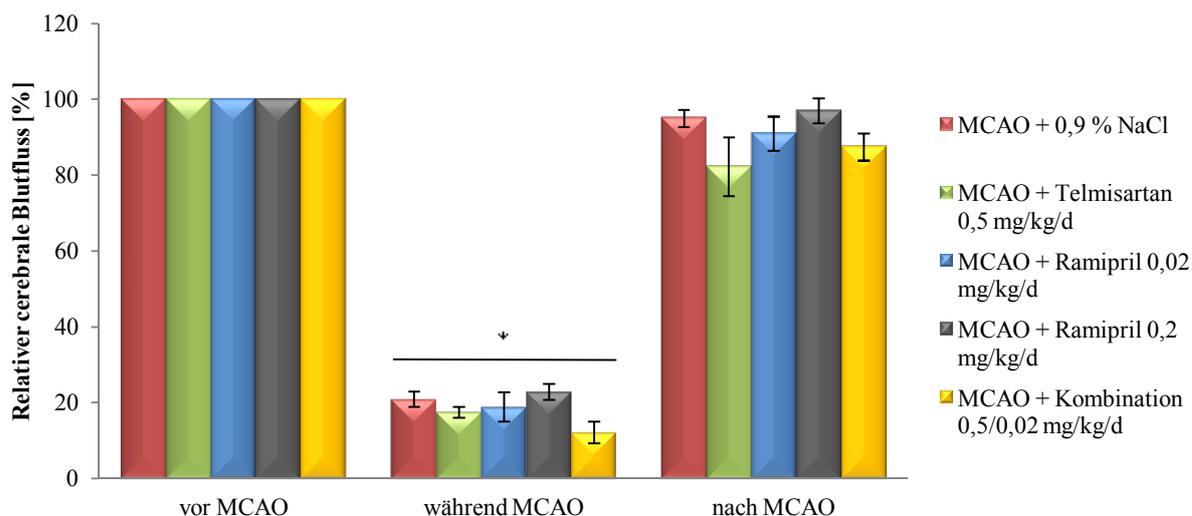


**Abbildung 3-7.** repräsentative Aufnahmen einer MR-Angiografie vor, während und nach MCAO; die weiße Markierung zeigt die *A. cerebri media*; Ansicht von kranial

Auf den Aufnahmen ist vor der MCAO eine regelrecht perfundierte *A. cerebri media* zu erkennen. Während der MCAO ist eine Unterbrechung der Gefäßdarstellung zu sehen und entspricht einem Verschluss dieses Gefäßes. Nach dem Ende der MCAO, bei dem der okkludierende Faden entfernt wurde, ist wieder ein normal perfundiertes Gefäß im Sinne einer erfolgreichen Reperfusion zu sehen.

### 3.1.2.2. Messung des zerebralen Blutflusses

Mit Hilfe einer faseroptischen Sonde wurde im Rahmen der MCAO der zerebrale Blutfluss gemessen. Eine Abnahme auf weniger als 25 % des Ausgangswertes wurde dabei als erfolgreichen Verschluss des Gefäßes gewertet und galt als Ausschlusskriterium. In Abb. 3-8. ist der CBF vor, während und nach der Schlaganfallsimulation dargestellt.



**Abbildung 3-8.** Grafische Darstellung des zerebralen Blutflusses vor, während und nach MCAO. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 12), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 13), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 11), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 11) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 8); Angabe in %, \*p < 0,05 vs. jeweilige Behandlungsgruppe vor MCAO

Innerhalb jeder Behandlungsgruppe ist während des induzierten Gefäßverschlusses eine signifikante Senkung des CBF unter 25 % des Ausgangswertes zu sehen. Nach Reperfusion steigt der CBF wieder auf Werte zwischen 82 und 95 % an. Des Weiteren gibt es zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen in keiner der drei Phasen einen signifikanten Unterschied.

### 3.1.2.3. Perioperative Messung diverser klinisch-chemischer Parameter im gemischt-venösen Blut

Perioperativ erfolgten im Rahmen der MCAO Blutentnahmen aus den retrobulbären Venenplexus der Ratten zur blutgasanalytischen Untersuchung von Sauerstoffpartialdruck (paO<sub>2</sub>), Kohlenstoffdioxidpartialdruck (paCO<sub>2</sub>), pH-Wert, Glucosekonzentration, Hämatokrit, Na<sup>+</sup>-

## Ergebnisse

Konzentration und  $K^+$ -Konzentration. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3-1. zusammengefasst. Dabei zeigt sich bei den untersuchten Parametern weder zwischen den Behandlungsgruppen, die einer MCAO unterzogen wurden, und den scheinoperierten Tieren, noch zwischen den Behandlungsgruppen selbst ein signifikanter Unterschied.

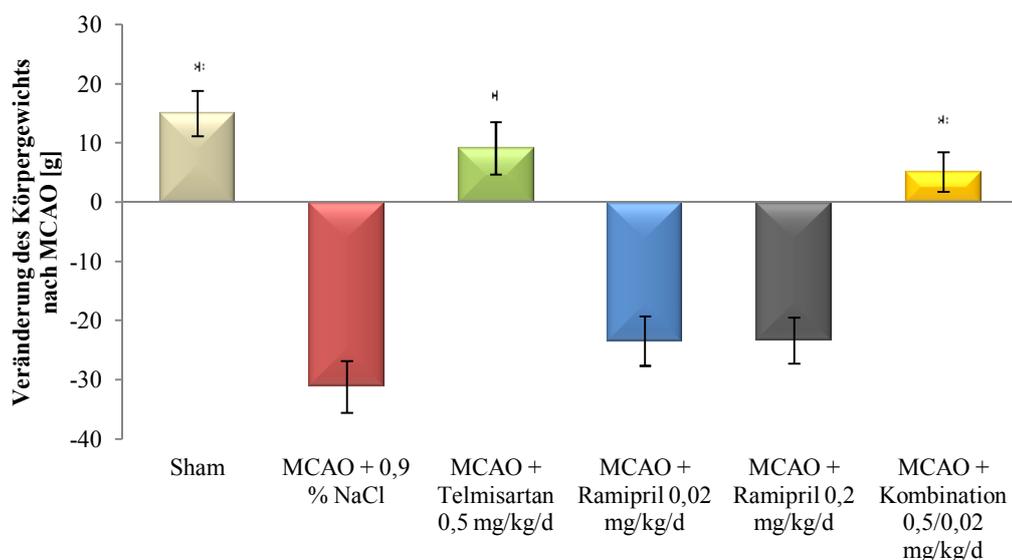
**Tabelle 3-1.** Übersicht über die blutgasanalytisch erhobenen Parameter innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen; n = 8

Parameter	Scheinoperiert	MCAO-Behandlungsgruppen				
		Vehikel 0,9 % NaCl	Telmisartan 0,5 mg/kg KG	Ramipril 0,02 mg/kg KG	Ramipril 0,2 mg/kg KG	Kombination 0,5/0,02 mg/kg KG
paO <sub>2</sub> [mmHg]	79,47	87,55	85,35	81,98	79,21	83,23
paCO <sub>2</sub> [mmHg]	40,62	40,25	40,88	44,54	42,11	41,98
pH-Wert	7,1	7,07	7,05	7,01	7,05	7,03
Glucose [mM]	9,58	9,63	9,86	9,83	10,09	10,25
Hämatokrit [%]	43,17	42,03	40,95	42,33	42,28	42,11
Na <sup>+</sup> [mM]	129,17	130	127,99	130,23	131,1	128,67
K <sup>+</sup> [mM]	5,02	5,3	5,2	4,79	4,9	4,58

### 3.1.2.4. Bestimmung des Körpergewichts 48 h nach *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Vor sowie 48 h nach temporärem Verschluss der *A. cerebri media* wurde das Körpergewicht der Ratten gemessen. Diese Änderungen des Körpergewichts sind in Abb. 3-9. dargestellt, anhand derer festzustellen ist, dass das Gewicht der scheinoperierten Tiere signifikant im Vergleich zur mit 0,9 % NaCl behandelten Gruppe zunimmt, ebenso ist diese signifikante Tendenz in den MCAO-Behandlungsgruppen mit Telmisartan 0,5 mg/kg/d und der Kombinationstherapie zu sehen. Dagegen zeigen die übrigen Behandlungsgruppen mit 0,9 % NaCl und der beiden Ramipril-Dosen einen Gewichtsverlust zwischen 20 und 32 g.

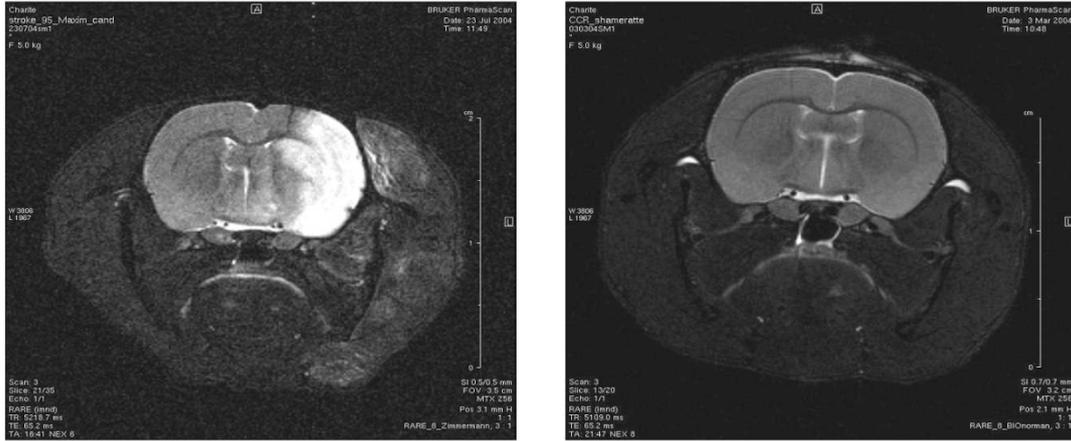
## Ergebnisse



**Abbildung 3-9.** Grafische Darstellung der Körpergewichtsveränderung nach MCAO. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 8) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 11), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 13), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 15), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 7) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 8): Angabe in g; \*p < 0,005 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

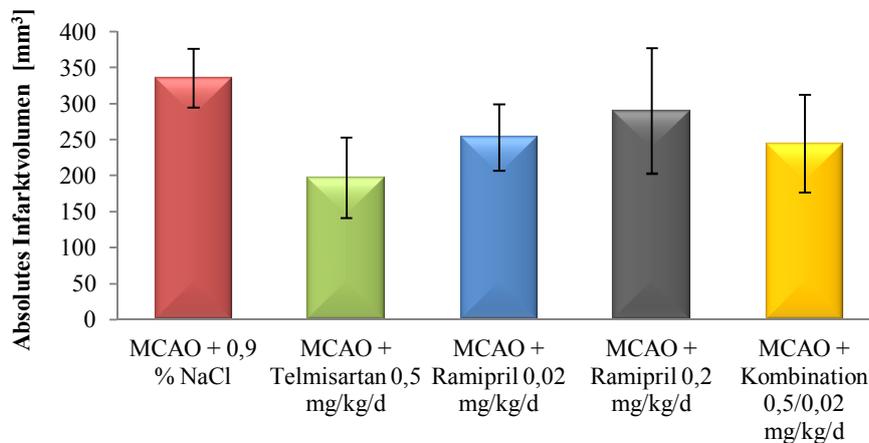
### 3.1.2.5. Darstellung und Bestimmung der absoluten und relativen Infarkt volumina

Mit Hilfe eines 7-T-Kleintier-MRT wurden 48 h nach Induktion des Schlaganfalls die Infarktvolumina gemessen. Abb. 3-10 zeigt repräsentative MRT-Aufnahmen eines Tieres mit Schlaganfall sowie die eines scheinoperierten Tieres. Auf der linken T2-gewichteten Aufnahme stellt sich der Infarkt aufgrund des durch den Schlaganfall hervorgerufenen Begleitödems als hyperintenses Areal dar. Ein derartiges Korrelat eines Infarkts fehlt in der rechten Aufnahme eines scheinoperierten Tieres.



**Abbildung 3-10.** repräsentative Aufnahmen eines MRT des Kopfes bei Ratten mit MCAO-Eingriff (links) und einer Scheinoperation (rechts); Ansicht von kaudal

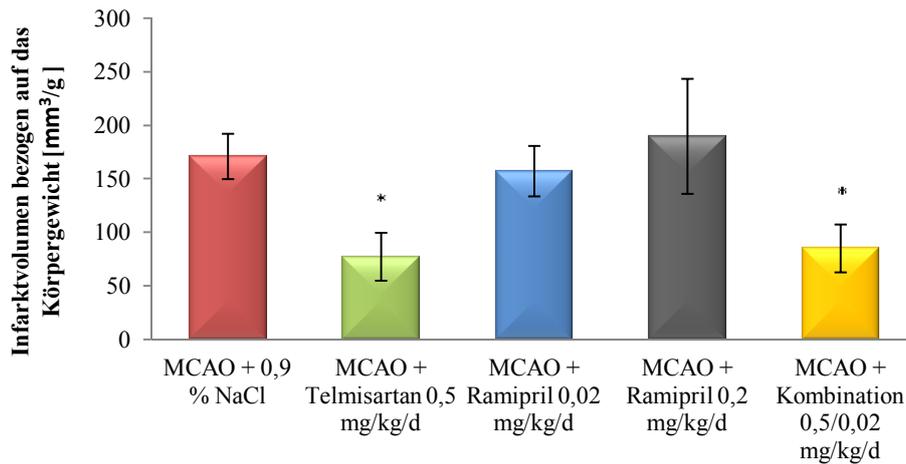
Durch Nutzung der unter 2.2.1.7. beschriebenen *Software* wurde für jedes Tier das Schlaganfallvolumen berechnet. In Abb. 3-11. sind die ermittelten Volumina wiedergegeben.



**Abbildung 3-11.** Grafische Darstellung der absoluten Infarkt volumina nach MCAO. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 11), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 13), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 15), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 7) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 8); Angabe in mm<sup>3</sup>

Dabei findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen allen Behandlungsgruppen. Dennoch lässt sich eine Tendenz der Infarkt voluminreduktion in der Telmisartan- und der Kombinations-therapiegruppe im Vergleich zu der mit dem Vehikel behandelten Gruppe erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die Vorbehandlung mit Telmisartan sowie der Kombination bei Betrachtung der

relativen Schlaganfallvolumina, bezogen auf das Körpergewicht 48 h nach MCAO, eine signifikante Verringerung des Schlaganfallvolumens im Vergleich zur 0,9 % NaCl-Behandlungsgruppe. Dabei ist im Falle der Telmisartan-Behandlung eine Reduktion um ca. 54 %, im Falle der Kombinationsbehandlung eine Verringerung um ca. 50 % zu beobachten. Abb. 3-12. gibt den dargelegten Sachverhalt wieder.

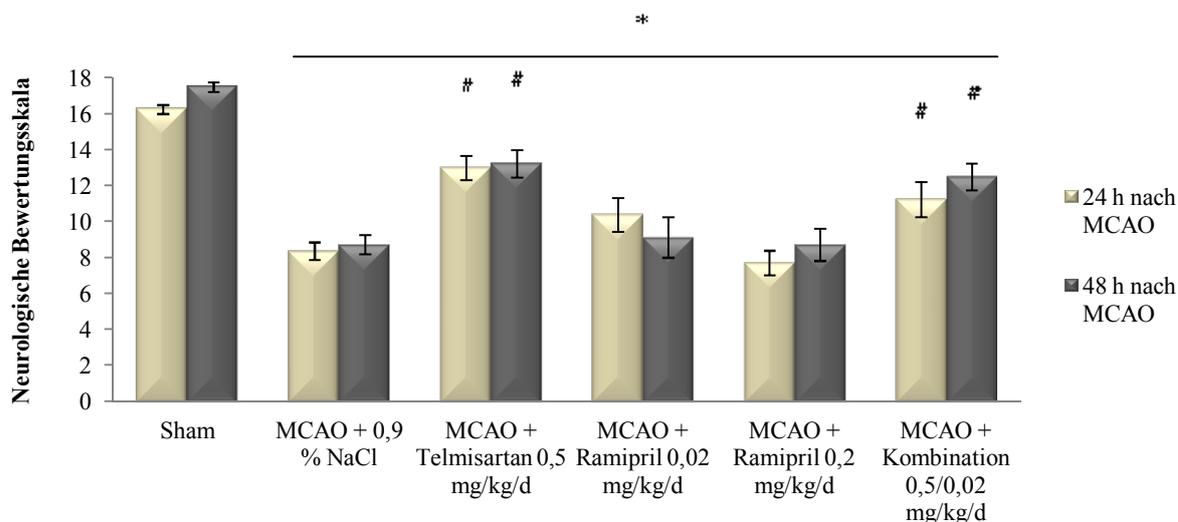


**Abbildung 3-12.** Grafische Darstellung der relativen Infarkt volumina bezogen auf das Körpergewicht nach MCAO. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 11), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 13), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 15), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 7) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 8): Angabe in mm<sup>3</sup>/g %; \*p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

### 3.1.2.6. Evaluierung der neurologischen Defizite

24 und 48 h nach Okklusion der *A. cerebri media* erfolgte die Einschätzung des neurologischen Schadens nach einer von Garcia *et al.* (211) entwickelten Bewertungsskala, die neben der allgemeinen Spontanaktivität die Symmetrie der Gesamtbewegung sowie der Vorderpfoten, das Klettern am Stahlgitter des Käfigs und der Reaktion der Tiere auf Berührung des Rumpfes sowie der Sinushaare untersucht. Der maximal erreichbare Punktwert von 18 impliziert einen fehlenden neurologischen Schaden. Abb. 3-13. stellt die erhobenen Daten dar.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-13.** Grafische Darstellung der Mittelwerte der neurologischen Bewertungsskala 24 und 48 h nach MCAO. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 8) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 11), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 13), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 15), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 7) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 8): Angabe in absoluten Punktwerten; \*p < 0,05 vs. Sham zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt, #p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt

Basierend auf den ermittelten Daten lässt sich feststellen, dass die scheinoperierten Tiere zu beiden Zeitpunkten Punktmittelwerte zwischen 16 und 18 erreichen. Im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zeigen sämtliche MCAO-Behandlungsgruppen signifikant niedrigere Punktwerte. Weiterhin fällt auf, dass durch eine Vorbehandlung mit Telmisartan sowie der Kombination zu beiden Zeitpunkten ein signifikant besserer Punktwert, im Mittel 3-5 Punkte, im Vergleich zu der mit 0,9 % NaCl vorbehandelten Gruppe erreicht wird.

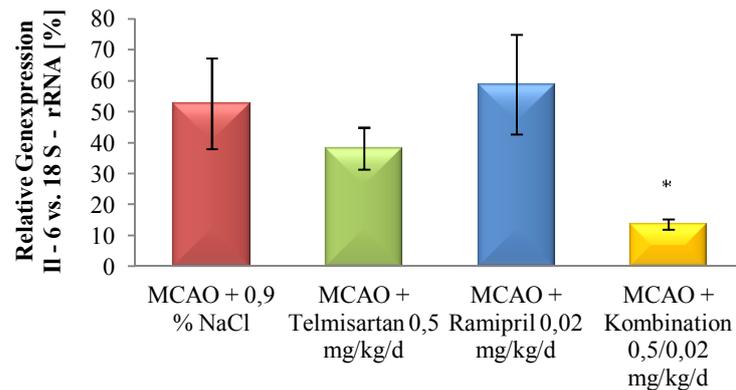
### 3.2. Ergebnisse der *in vitro*-Versuche

#### 3.2.1. Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen mittels *RealTime-Polymerase-Chain-Reaction*

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Marker wurden die Gehirne, wie unter 2.2.1.9 sowie 2.2.2. beschrieben, entnommen und aufgearbeitet. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte die quantitative RT-PCR mit den spezifischen *Primern* und simultaner Messung der 18 S-rRNA. Anschließend wurden die erhobenen Daten auf die Expression der 18 S-rRNA bezogen.

### 3.2.1.1. Untersuchung der Interleukin-6-Expression nach *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Für die Untersuchung proinflammatorischer Marker nach MCAO erfolgte die Bestimmung der Il-6-messenger-RNA (mRNA)-Expression in oben beschriebener Weise. Das Resultat gibt Abb. 3-14. wieder.



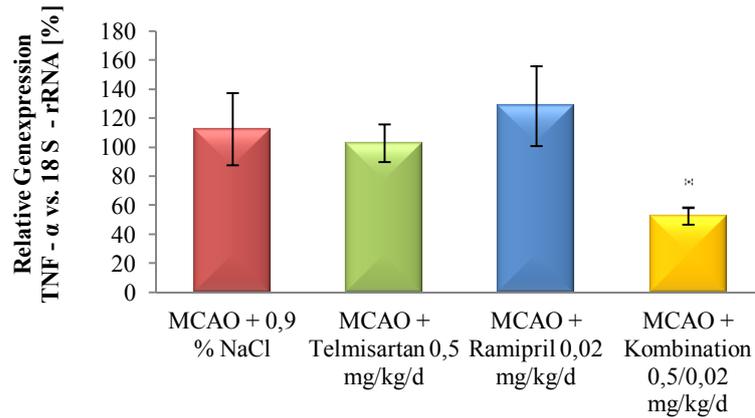
**Abbildung 3-14.** Grafische Darstellung der relativen Genexpression von Il-6, normalisiert auf 18 S-rRNA. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 8), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 8), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 8) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 6): Angabe in %; \*p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

Dabei ist zu erkennen, dass die MCAO-Kombinationstherapiegruppe eine signifikante Verminderung der Il-6-Expression zeigt im Vergleich zu der mit dem Vehikel behandelten Gruppe. Die übrigen Behandlungsgruppen zeigen keine signifikanten Veränderungen.

### 3.2.1.2. Untersuchung der Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ -Expression nach *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Als weiterer proinflammatorischer Marker wurde TNF- $\alpha$  auf dessen Expression untersucht. Wie in Abb. 3-15. zu sehen, ergab die Betrachtung ein ähnliches Expressionsmuster wie das der Il-6-Untersuchung: eine signifikante Verringerung der TNF- $\alpha$ -Expression in der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zu der mit dem Vehikel behandelten Gruppe. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den übrigen Behandlungsgruppen festzustellen.

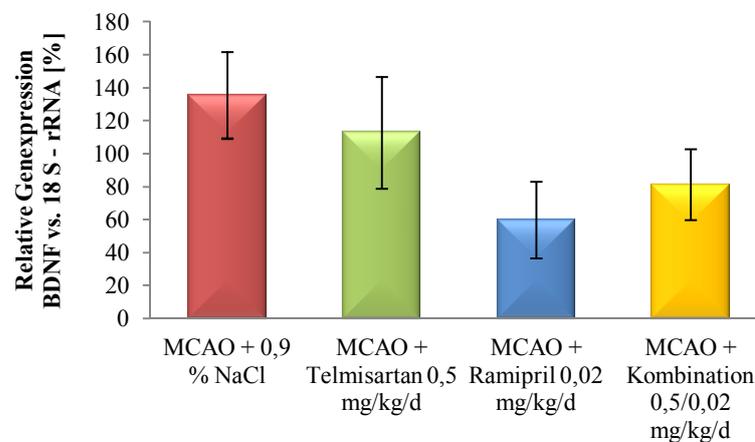
## Ergebnisse



**Abbildung 3-15.** Grafische Darstellung der relativen Genexpression von TNF- $\alpha$ , normalisiert auf 18 S-rRNA. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 8), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 8), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 8) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 6): Angabe in %; p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

### 3.2.1.3. Untersuchung der *Brain Derived Neurotrophic Factor*-Expression nach *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Im Rahmen der Untersuchung neuroprotektiver Marker erfolgte die Bestimmung der Expression von BDNF als einen Vertreter der Neurotrophine. Anhand der in Abb. 3-16. dargestellten Daten ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen seitens der BDNF-Expression gibt.

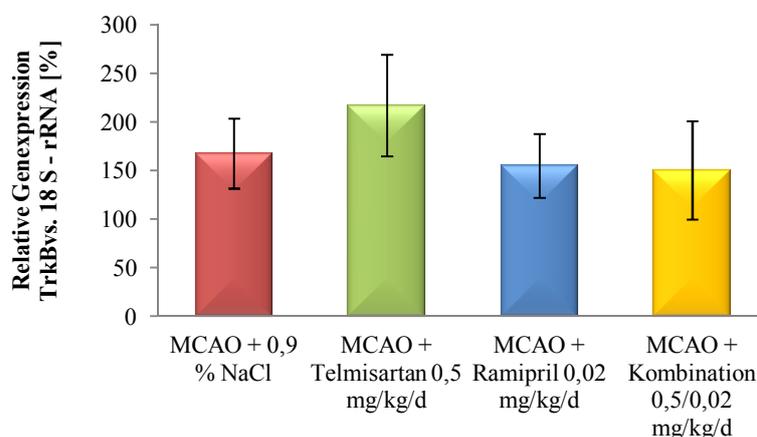


**Abbildung 3-16.** Grafische Darstellung der relativen Genexpression von BDNF, normalisiert auf 18 S-rRNA. Untersuchung innerhalb der Behand-

lungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 8), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 8), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 8) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 6): Angabe in %

### 3.2.1.4. Untersuchung der Tyrosinkinase B-Expression nach *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Einer der Rezeptoren des BDNF, TrkB, wurde als weiterer Bestandteil des Neurotrophinsystems untersucht. Dabei zeigte sich analog zur BDNF-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Abb. 3-17. gibt diesen Sachverhalt wieder.



**Abbildung 3-17.** Grafische Darstellung der relativen Genexpression von TrkB, normalisiert auf 18 S-rRNA. Untersuchung innerhalb der Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 8), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 8), MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 8) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 6): Angabe in %

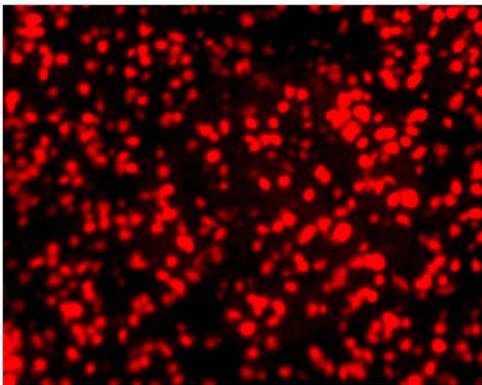
## 3.2.2. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

### 3.2.2.1. Ergebnisse der Nissl-Fluoreszenzfärbung mittels *NeuroTrace<sup>TM</sup>*

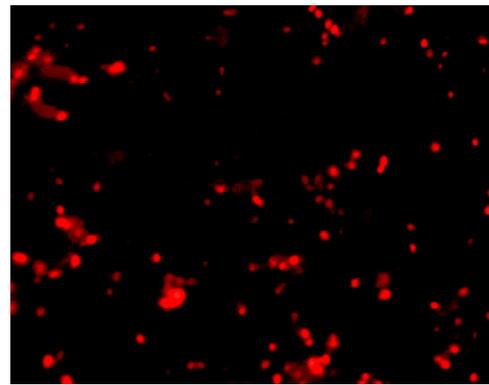
Zur Abschätzung des neurologischen Schadens wurden 7 µm dicke Kryoschnitte der entnommenen Gehirne angefertigt und anschließend mittels Nisslfärbung die vitalen Neuronen sichtbar gemacht. In 10-facher Vergrößerung erfolgte mikroskopisch das verblindete Auszählen der

## Ergebnisse

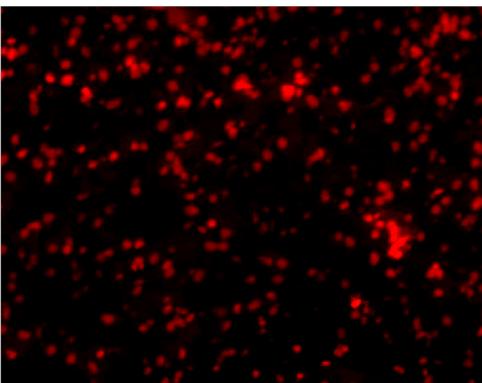
Neuronen zum einen in der zum Schlaganfall ipsilateral gelegenen periventrikulären Region (Penumbra), zum anderen auch in der zum Infarkt kontralateral gelegenen Region. Zuvor wurde die Region mit Hilfe von HE-gefärbten Schnitten lokalisiert. Abb. 3-18. zeigt repräsentative Aufnahmen der ipsilateralen periventrikulären Region der einzelnen Behandlungsgruppen. Auffallend ist dabei eine Verringerung der Neuronenzahl der MCAO-Behandlungsgruppen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Zudem lässt sich innerhalb der MCAO-Behandlungsgruppen ein stärkerer Zellverlust in der mit dem Vehikel behandelten Gruppe im Vergleich zu den übrigen Gruppen vermuten.



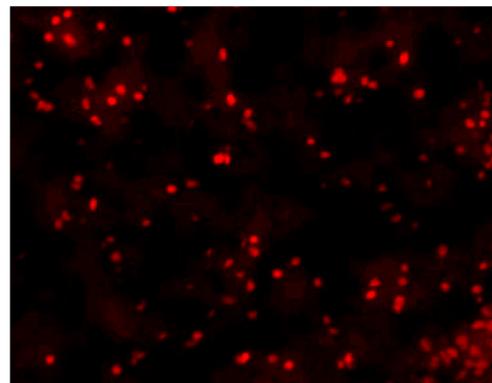
Sham



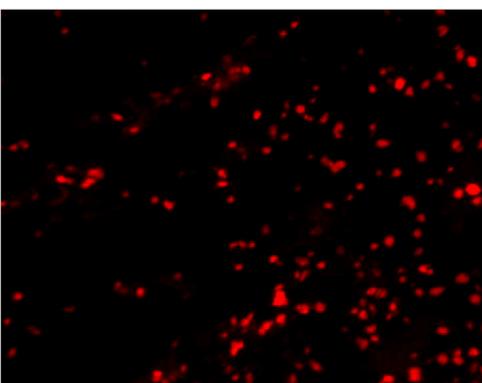
MCAO + 0,9 % NaCl



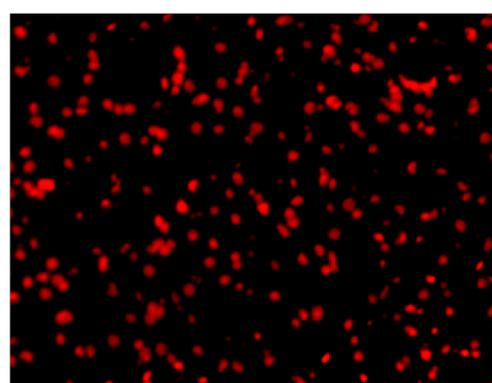
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

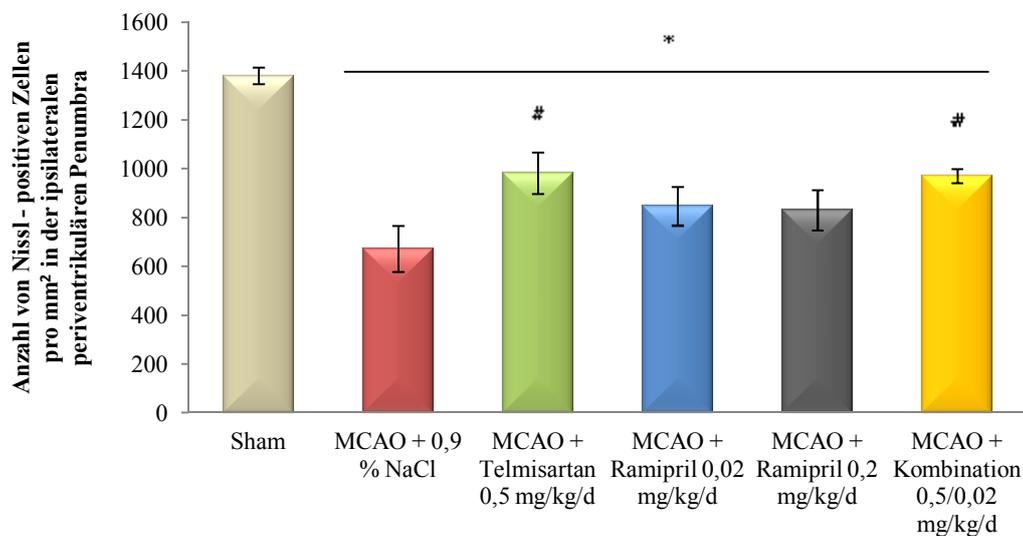


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

## Ergebnisse

**Abbildung 3-18.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Nissl-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

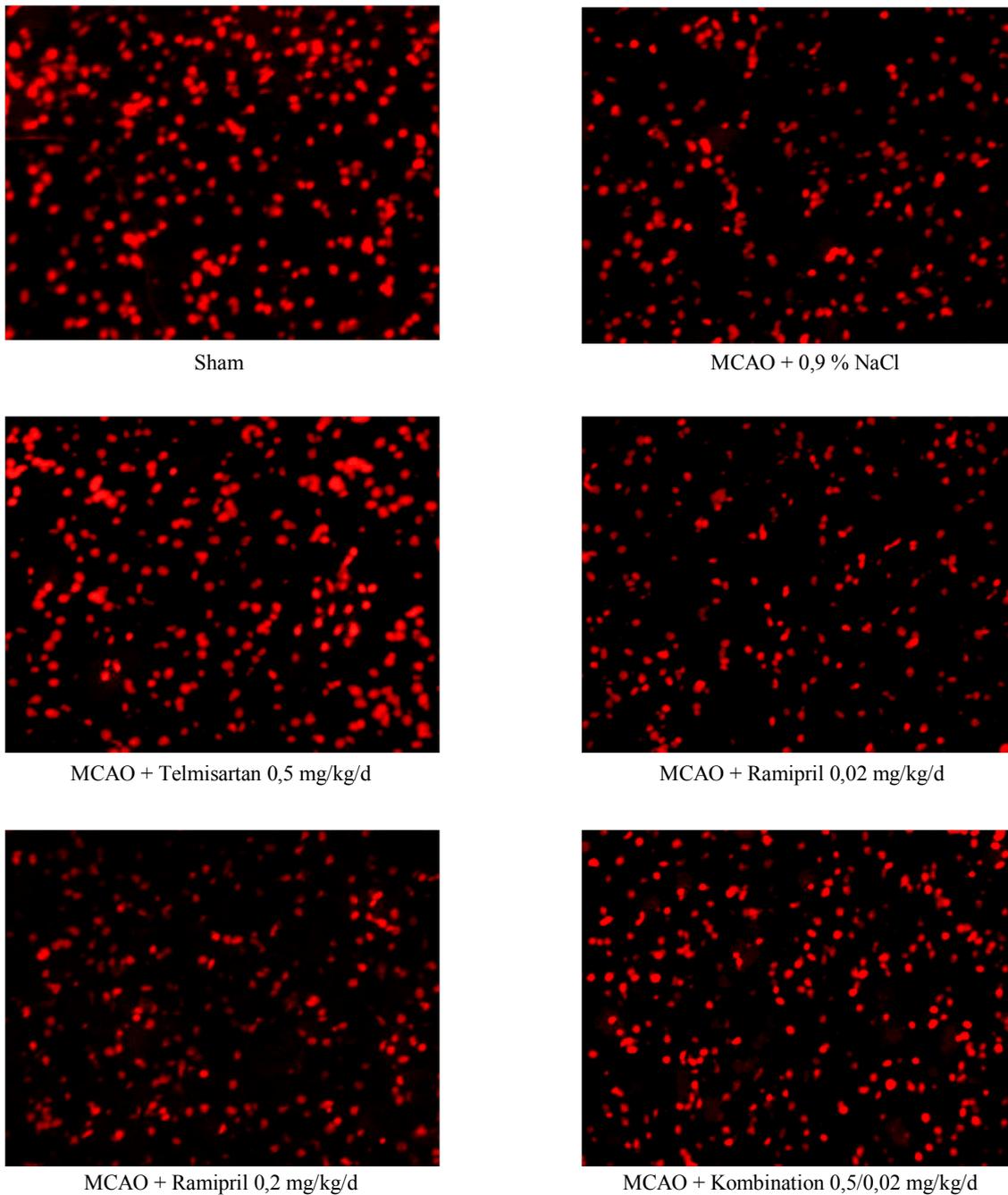
Nach Auszählen der Nissl-positiven Zellen ergab sich zwischen den Behandlungsgruppen untereinander die in Abb. 3-19. dargestellten Beziehungen.



**Abbildung 3-19.** Grafische Darstellung der Anzahl Nissl-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 vs. Sham, #p 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

Dabei findet sich eine signifikante Verminderung der Neuronenzahl in allen MCAO-Behandlungsgruppen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Darüber hinaus lässt sich eine signifikant höhere Neuronenzahl in den Gruppen MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d sowie MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d im Vergleich zur Vehikel-Behandlungsgruppe erkennen. Die mit Ramipril behandelten Tiere zeigen lediglich die Tendenz eines geringfügigeren Zellschadens ohne Signifikanz.

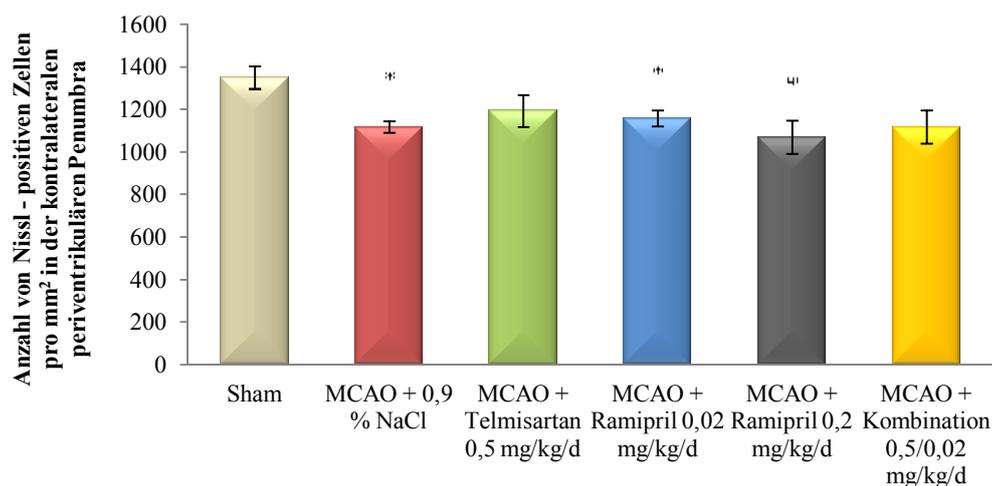
In Abb. 3-20. sind repräsentative Aufnahmen von der zum Schlaganfall kontralateral gelegenen periventriculären Region abgebildet.



**Abbildung 3-20.** repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nissl-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

Auf den Abbildungen ist eine Verminderung der Neuronenzahl in der Vehikel-Behandlungsgruppe gegenüber der Shamgruppe zu sehen. Ferner zeigt sich diese Tendenz auch in den übrigen Behandlungsgruppen, wobei der Zellschaden in der Telmisartan- und der Kombinationsbehandlungsgruppe geringer erscheint. Wie in Abb. 3-21. wiedergegeben, ergibt sich eine signifikante

Verminderung der Neuronenzahl in den Vehikel- und beiden Ramiprilbehandlungsgruppen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Eine ähnliche Tendenz ist auch in den mit Telmisartan und der Kombination behandelten Gruppen zu sehen, jedoch fehlt eine Signifikanz. Weiterhin ist zwischen den einzelnen MCAO-Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen.

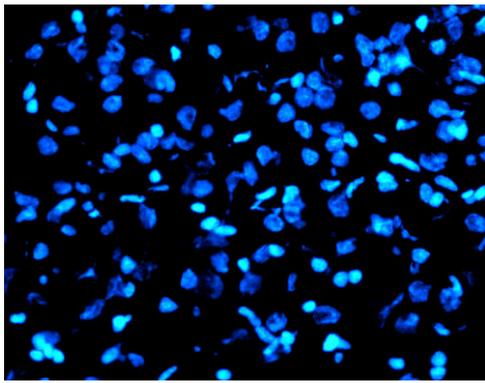


**Abbildung 3-21.** Grafische Darstellung der Anzahl Nissl-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 vs. Sham

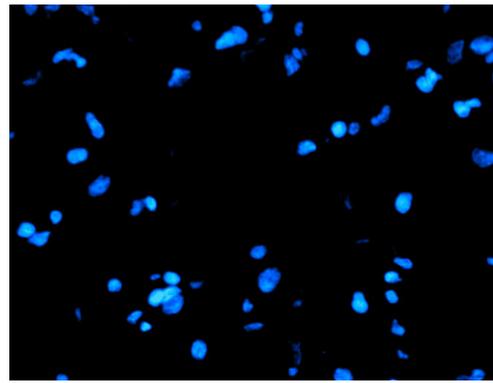
### 3.2.2.2. Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol

Wie unter 2.2.3.3.2. beschrieben, können mit Hilfe des DAPI-Farbstoff DNA und damit Zellkerne gefärbt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Färbemethode zum einen zur Bestimmung der absoluten Zellzahl in 20-facher Vergrößerung genutzt und zum anderen im Rahmen der Antikörper-vermittelten Färbungen zur Berechnung des relativen Anteils Antikörper-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl herangezogen. Für jede der drei Antikörper-Färbungen wurde die Gesamtzellzahl bestimmt, das Ergebnis, die Gesamtzellzahl betreffend, war bei jeder Zählung identisch, sodass im Folgenden nur eine Auswertung dargestellt ist.

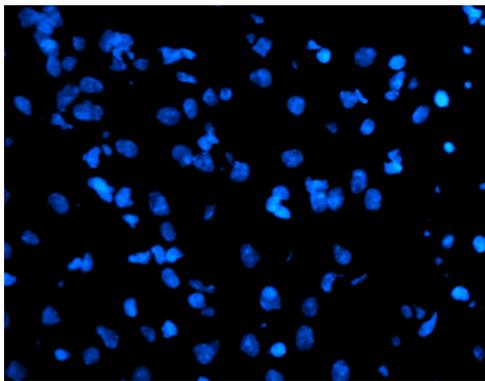
Abb. 3-22. zeigt exemplarisch Ausschnitte der DAPI-Färbung von der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung.



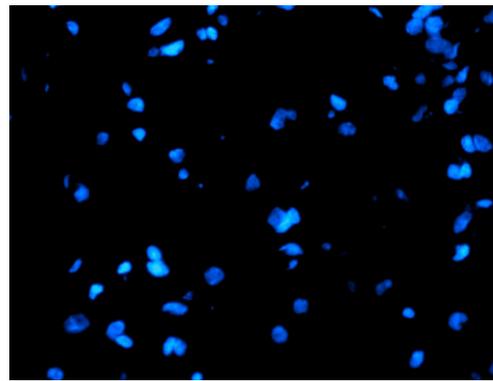
Sham



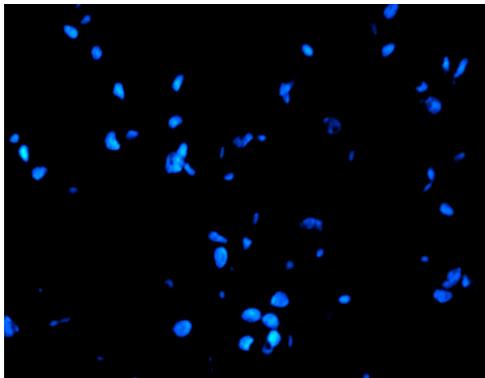
MCAO + 0,9 % NaCl



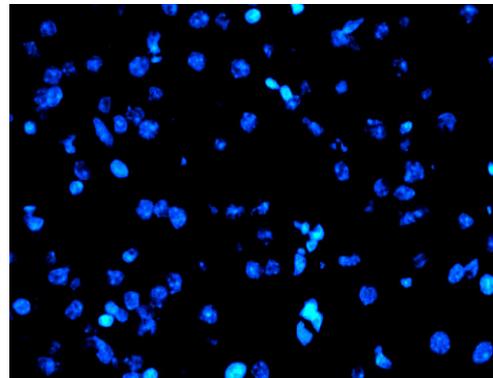
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d



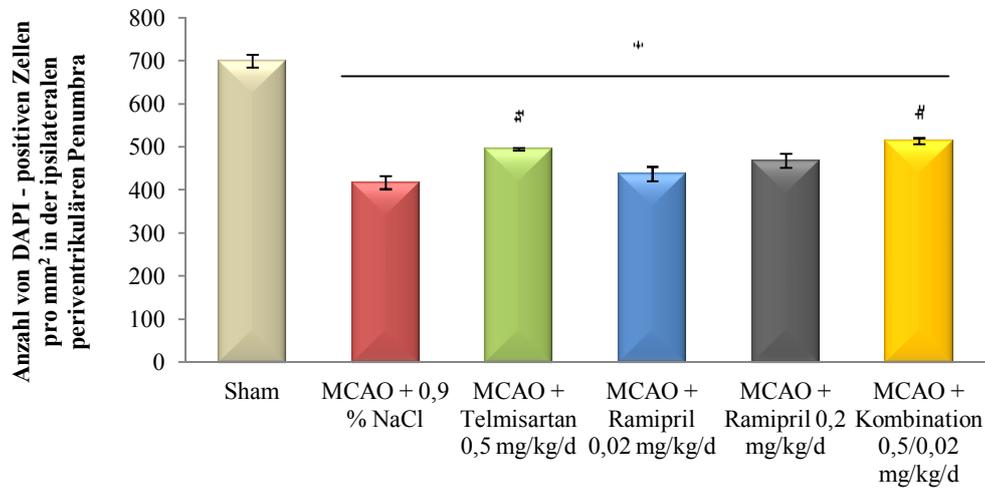
MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-22.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DAPI-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

Anhand der Aufnahmen ist eine deutliche Verminderung der Gesamtzellzahl in den MCAO-Behandlungsgruppen, vor allem in der Vehikel-Gruppe, im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zu erkennen. Ähnlich den Eindrücken der Nissl-Färbung lässt sich auch in dieser Darstel-

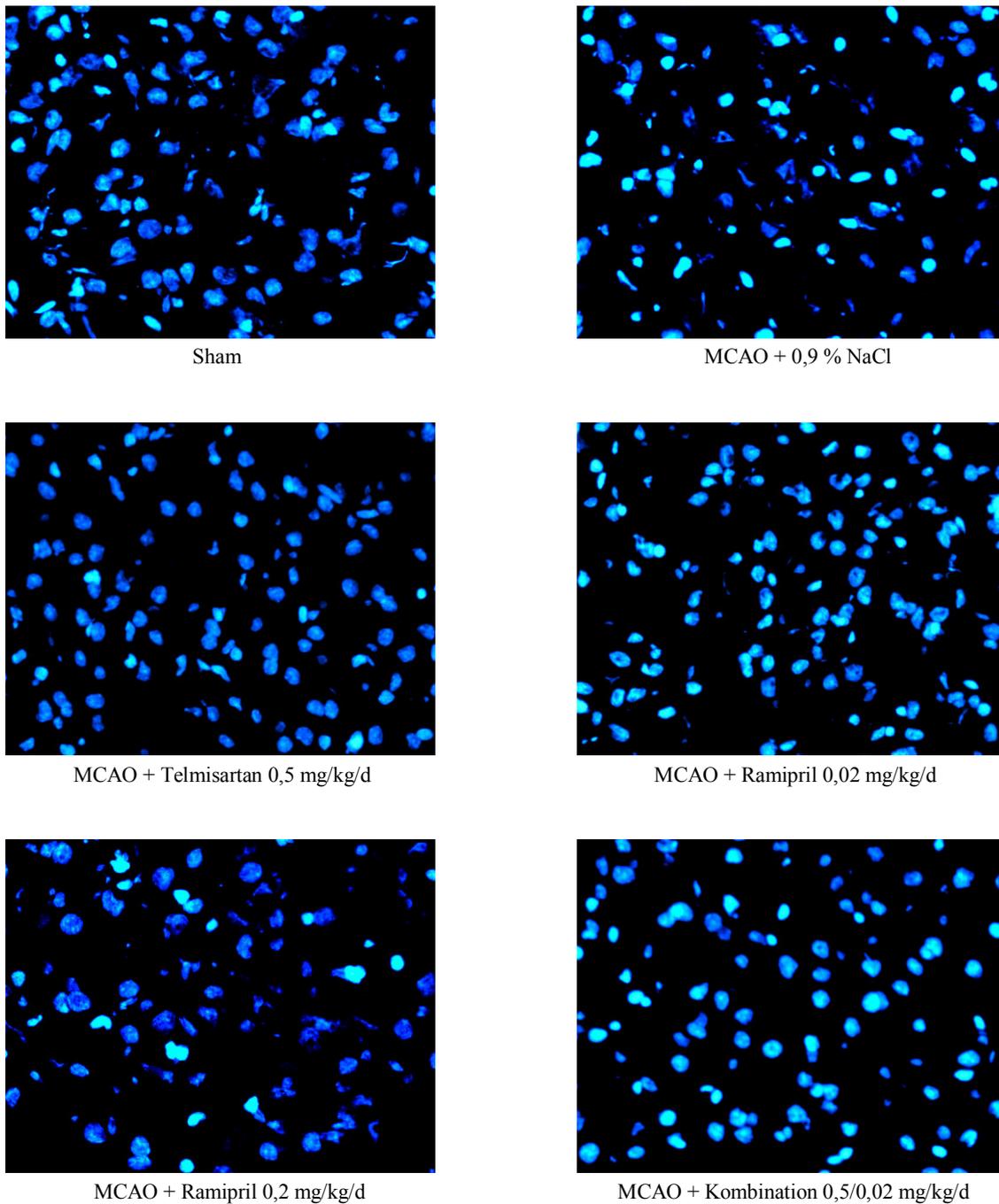
## Ergebnisse

lung ein geringerer Schaden in der Telmisartan- bzw. der Kombinationsgruppe vermuten. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Abb. 3-23. veranschaulicht.



**Abbildung 3-23.** Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 vs. Sham, #p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

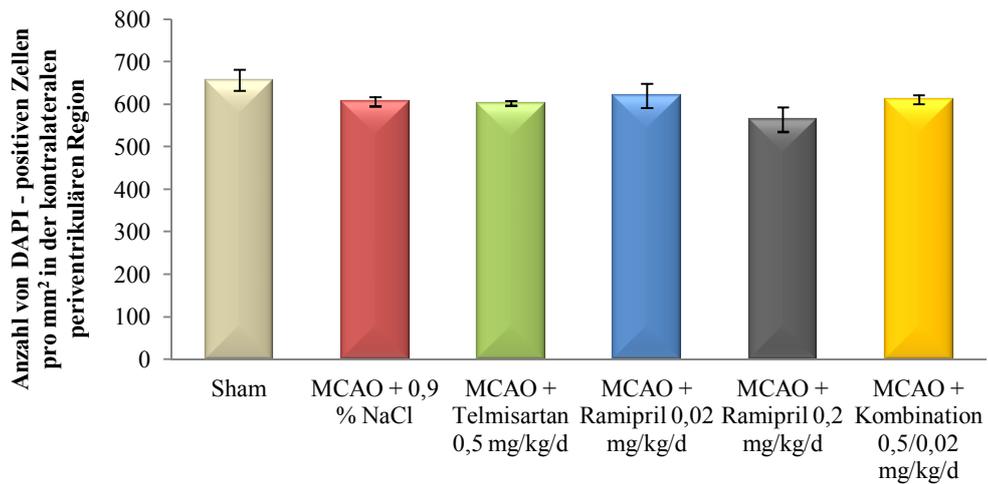
Analog den Ergebnissen der Nissl-Färbung zeigt sich eine signifikante Verminderung der Gesamtzellzahl in allen MCAO-Behandlungsgruppen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Des Weiteren lässt sich ein signifikant geringerer Schaden hinsichtlich der Gesamtzellzahl in der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Vehikel-Behandlungsgruppe feststellen. Die mit Ramipril behandelten Tiere zeigen keine signifikanten Veränderungen. Auf der kontralateralen Seite fällt, wie in Abb. 3-24. illustriert, kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf.



**Abbildung 3-24.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DAPI-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

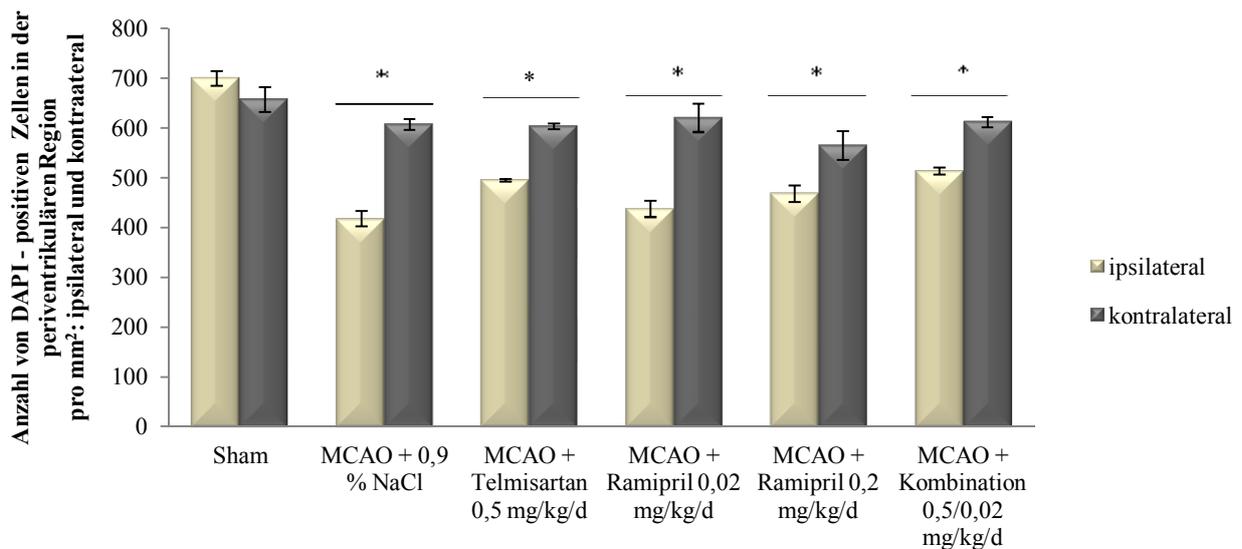
Abb. 3-25. bestätigt diesen Eindruck. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.-3-25.** Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Bei Vergleich der ipsi- und der kontralateralen Seiten ergibt sich, wie in Abb. 3-26. ersichtlich, in jeder MCAO-Behandlungsgruppe ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Seiten, der sich in einer Verminderung der Gesamtzellzahl auf der ipsilateralen im Vergleich zur kontralateralen Seite widerspiegelt. Scheinoperierte Tiere zeigen keinen Unterschied.

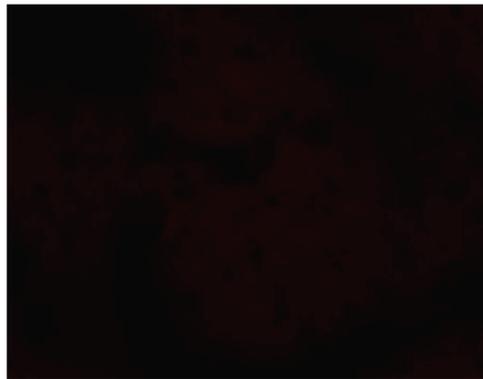


**Abbildung 3-26.** Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den

Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 innerhalb der Behandlungsgruppe

### 3.2.2.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörpern

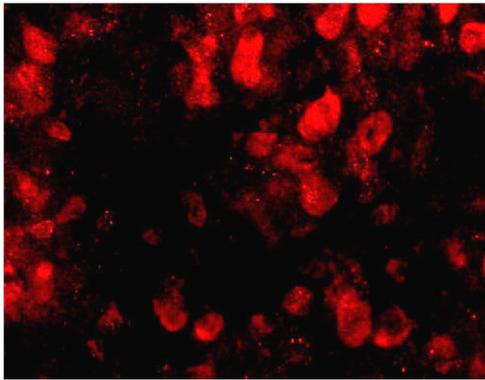
Für die Untersuchung proinflammatorischer und neuroprotektiver Marker wurden 7 µm dicke Kryoschnitte mittels Antikörpern nach oben beschriebenem Protokoll (2.2.3.3.3.) angefertigt. Unter 20-facher Vergrößerung erfolgte mikroskopisch die Quantifizierung der Antikörper positiven Zellen. Zudem wurde im Rahmen jeder angefertigten Färbung eine Negativkontrolle durchgeführt, in der anstelle des Primärantikörpers eine entsprechende Menge DBS pipettiert wurde. Abb. 3-27. zeigt exemplarisch einen repräsentativen Ausschnitt der Negativkontrollen.



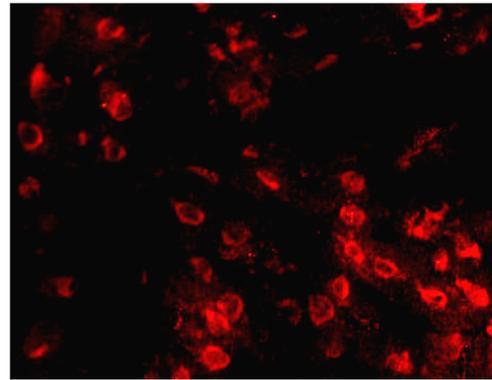
**Abbildung 3-27.** repräsentativer Ausschnitt einer Negativkontrolle

#### 3.2.2.3.1. Ergebnisse der Interleukin-6-Immunfluoreszenzfärbung

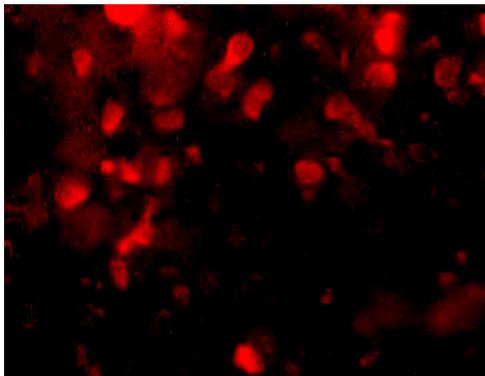
Neben der Bestimmung der Il-6-Expression durch nukleotidanalytische Methoden erfolgte die immunfluoreszenzzytochemische Anfärbung der Schnitte mit Il-6-spezifischen Antikörpern. Repräsentative Ausschnitte dieser Färbung sind für die ipsilaterale periventriculäre Region in Abb. 3-28. dargestellt.



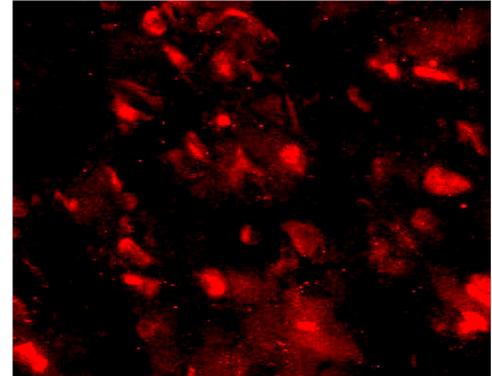
Sham



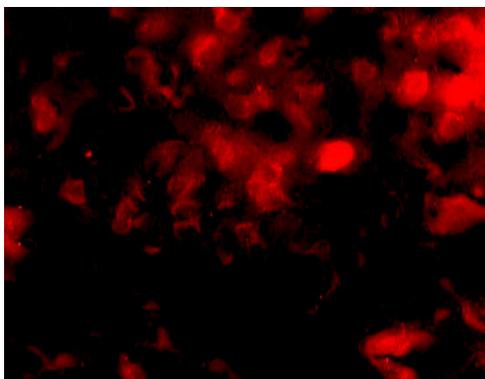
MCAO + 0,9 % NaCl



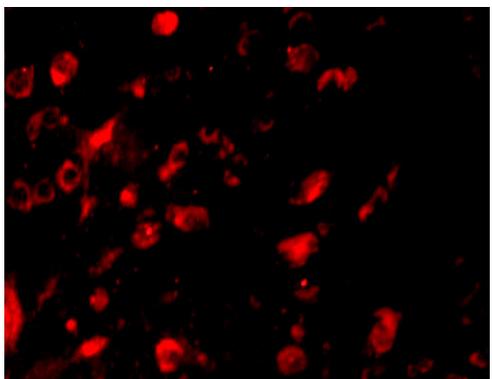
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

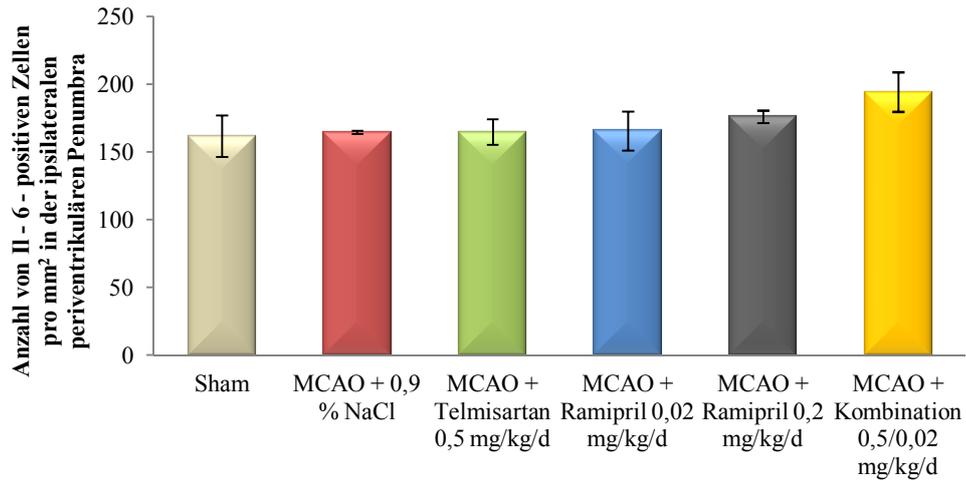


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-28.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten Il-6-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

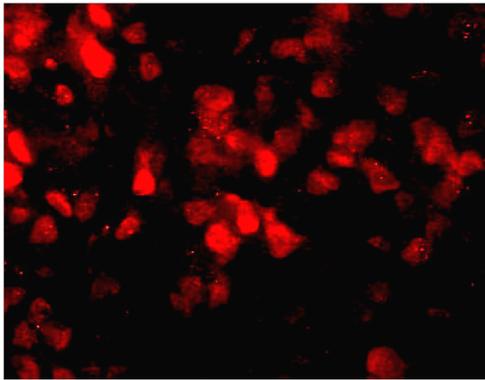
Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht erkennbar. Abb. 3-29. gibt das Resultat der Auszählung wieder. Ebenfalls lassen sich hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

## Ergebnisse

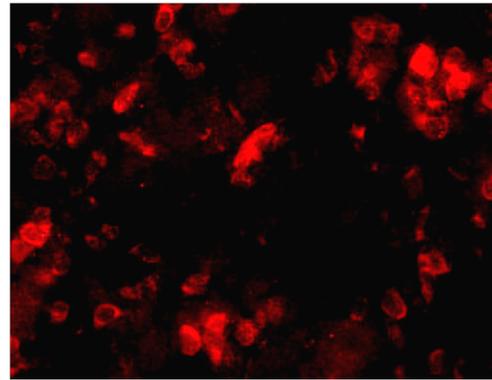


**Abbildung 3-29.** Grafische Darstellung der Anzahl IL-6-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

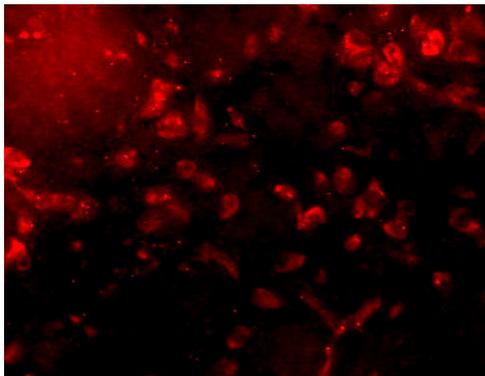
Die Aufnahmen der kontralateralen periventriculären Region, sichtbar in Abb. 3-30., zeigen ebenso keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.



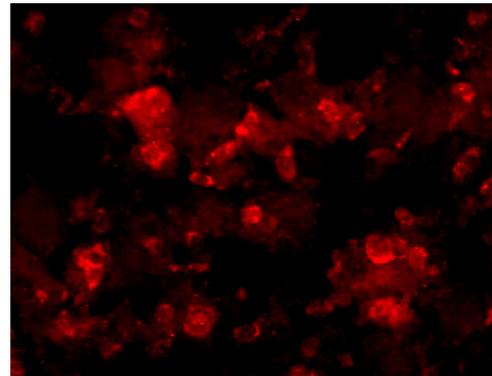
Sham



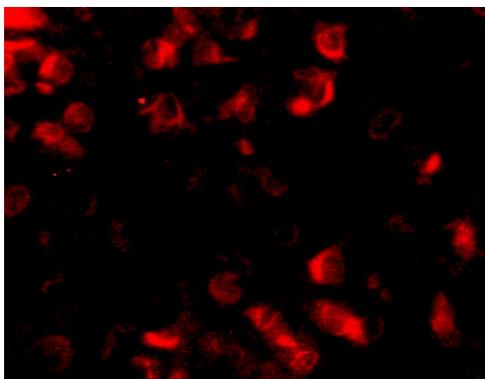
MCAO + 0,9 % NaCl



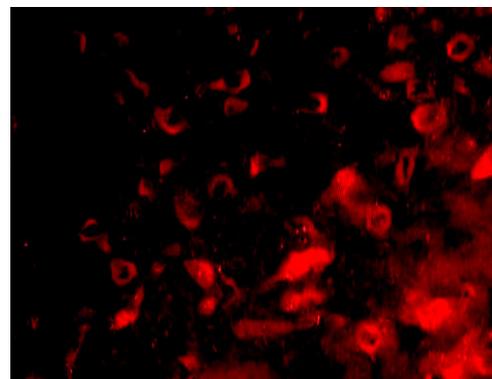
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

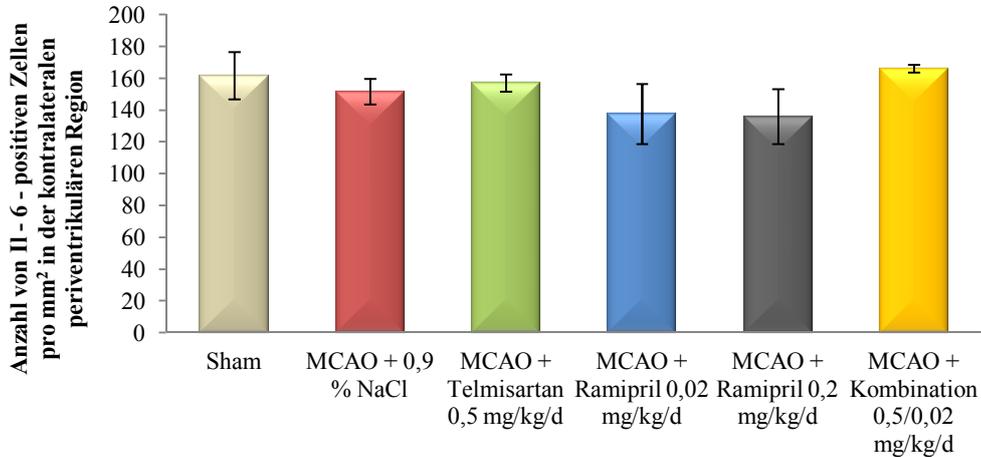


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-30.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten Il-6-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

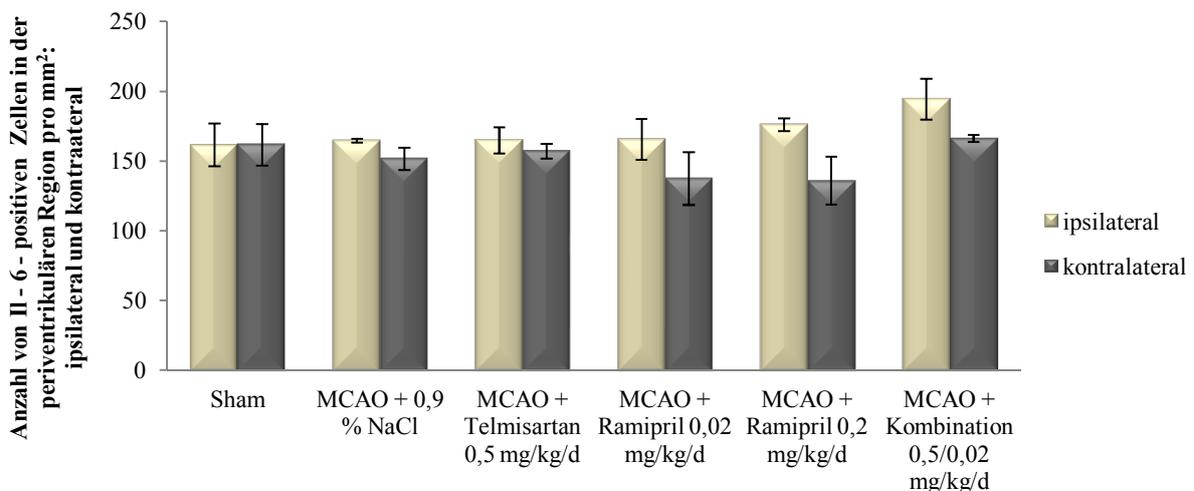
## Ergebnisse

Zu dem gleichen Ergebnis kommt man bei Betrachtung der Abb. 3-31, aus der hervorgeht, dass es zwischen den verschiedenen Gruppen keinen Unterschied bezüglich der Anzahl Il-6-positiver Zellen auf der kontralateralen Seite gibt.



**Abbildung 3-31.** Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Vergleicht man die Ergebnisse der ipsi- und kontralateralen Seite miteinander, so lassen sich, wie in Abb. 3-32. zu sehen, keine signifikanten Unterschiede feststellen.

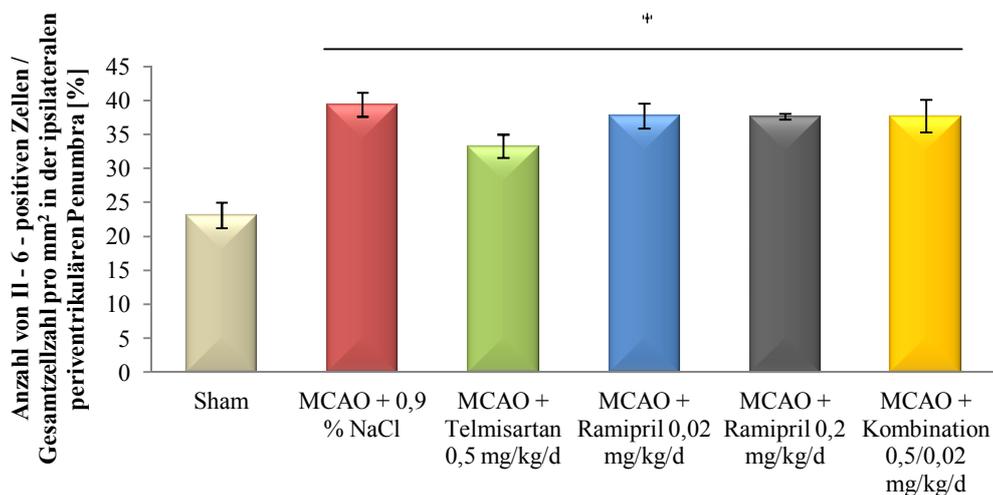


**Abbildung 3-32.** Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie

## Ergebnisse

den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

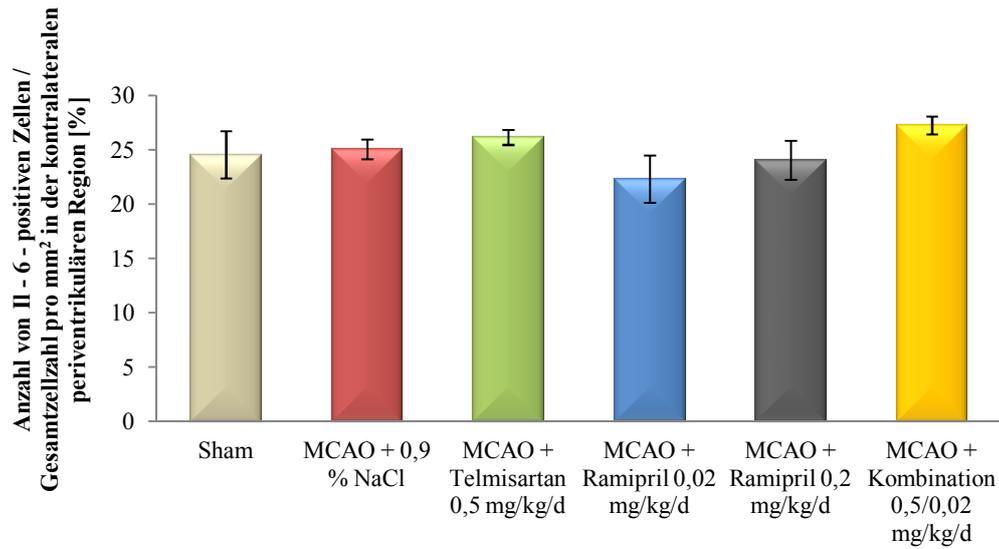
Nach Bestimmung der absoluten Zahl Il-6-positiver Zellen wurden die ermittelten Werte auf die Gesamtzellzahl bezogen, die mit Hilfe der jeweiligen DAPI-Färbung des Schnittes erhoben wurde. Das Ergebnis für die ipsilaterale Seite ist in Abb. 3-33. dargestellt. Dabei zeigt sich in allen MCAO-Behandlungsgruppen eine höhere Anzahl Il-6-positiver Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Zwischen den einzelnen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. Allenfalls eine Tendenz der Reduktion der relativen Zellzahl ist in der mit Telmisartan behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zu sehen.



**Abbildung 3-33.** Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 vs. Sham

Abb. 3-34. zeigt die relative Zahl Il-6-positiver Zellen in der zum Infarkt kontralateral gelegenen Seite. Hier ergibt sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.

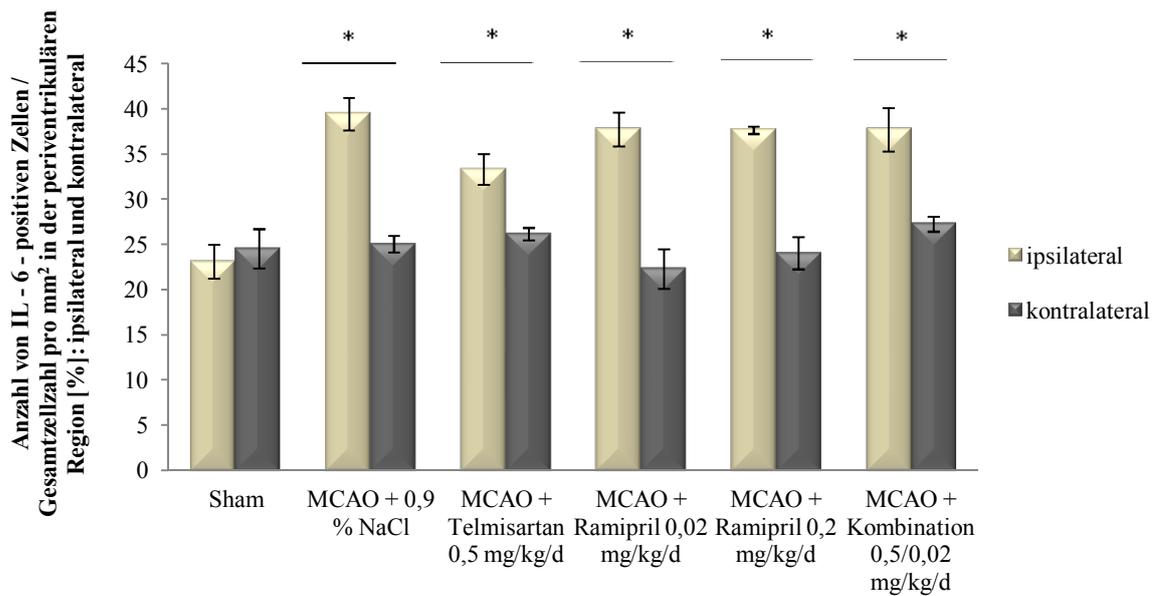
## Ergebnisse



**Abbildung 3-34.** Grafische Darstellung der Anzahl IL-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %

Die relativen Zellzahlen der ipsi- und kontralateralen Seite gegenüber stellend, findet sich in allen MCAO-Behandlungsgruppen auf der ipsilateralen Seite eine signifikant höhere relative Zahl IL-6-positiver Zellen im Vergleich zur kontralateralen Seite. Bei scheinoperierten Tieren tritt ein derartiger Unterschied nicht auf. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 3-35. veranschaulicht.

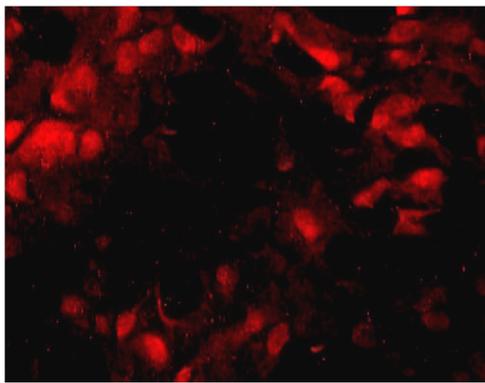
## Ergebnisse



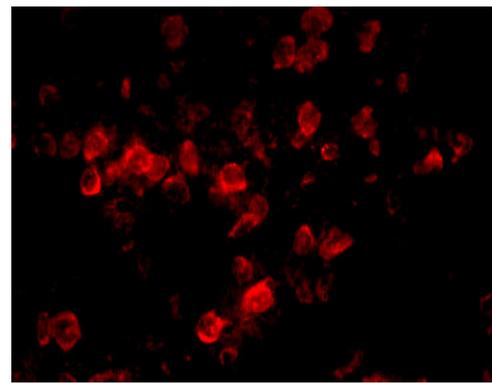
**Abbildung 3-35.** Grafische Darstellung der Anzahl IL-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 innerhalb der Behandlungsgruppe

### 3.2.2.3.2. Ergebnisse der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Immunfluoreszenzfärbung

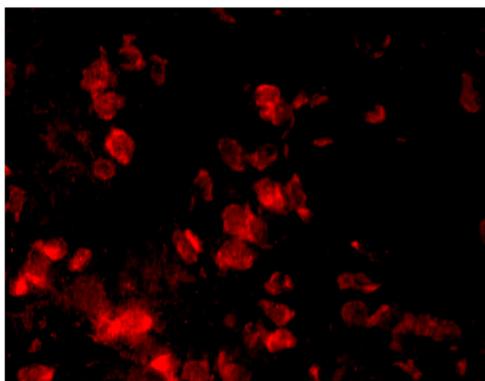
Als weiterer proinflammatorischer Marker wurde TNF- $\alpha$  immunfluoreszenzzytochemisch in gleicher Weise wie IL-6 untersucht. In Abb. 3-36. sind Ausschnitte aus der Färbung der ipsilateralen Seite zu sehen.



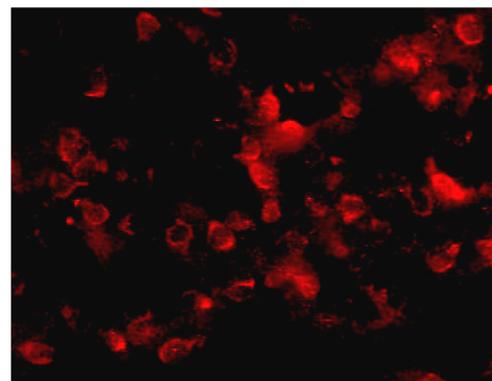
Sham



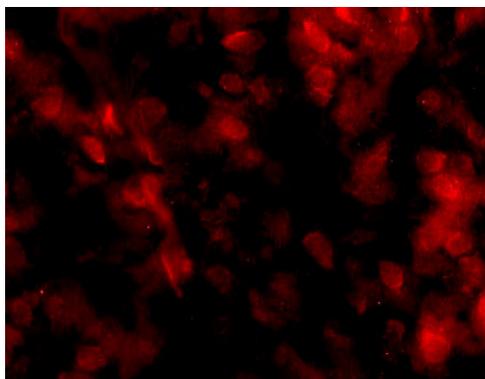
MCAO + 0,9 % NaCl



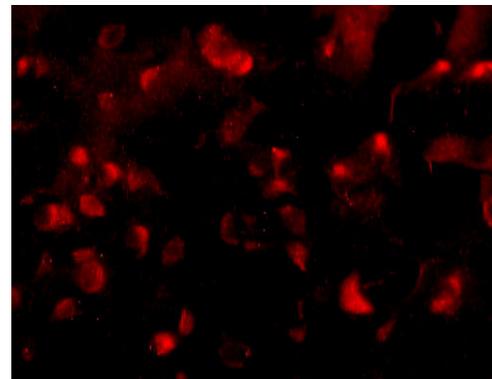
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

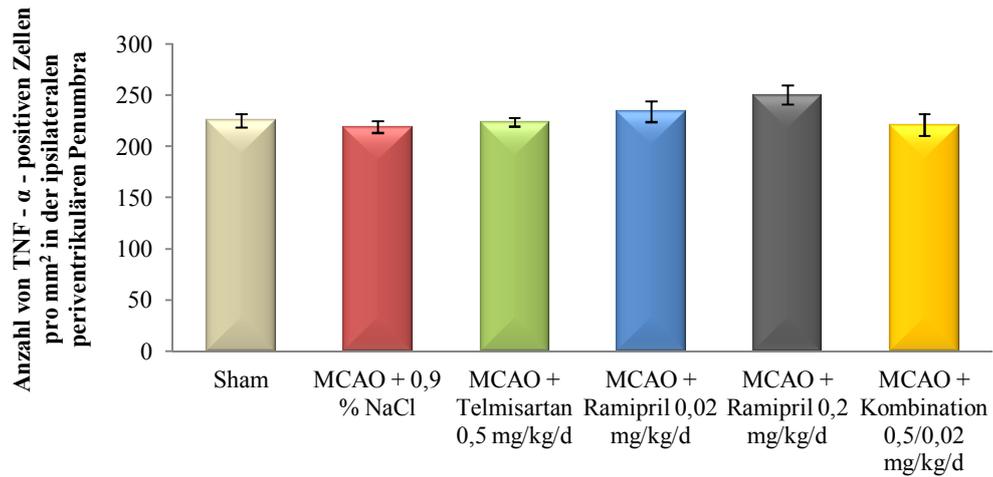


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-36.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TNF- $\alpha$ -Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

Auf den abgebildeten Aufnahmen sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu erkennen. Nach Auszählung der TNF- $\alpha$ -positiven Zellen lassen sich die Ergebnisse wie in Abb. 3-37 darstellen.

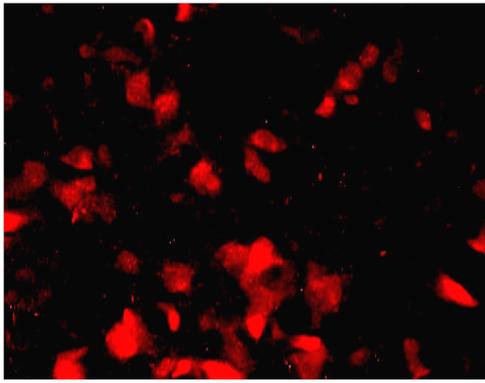
## Ergebnisse



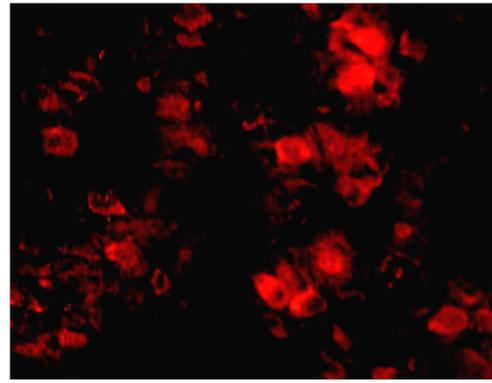
**Abbildung 3-37.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Anhand des Diagramms zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

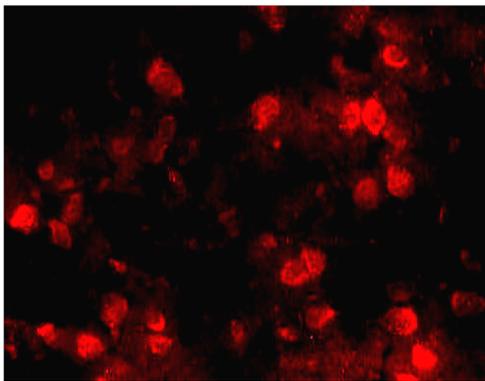
Analog zur Untersuchung der ipsilateralen Seite, wurde die kontralaterale Seite betrachtet. In Abb. 3-38 sind Ausschnitte von Aufnahmen der kontralateralen Seite dargestellt. Wie auch auf der ipsilateralen Seite sind keine Unterschiede erkennbar.



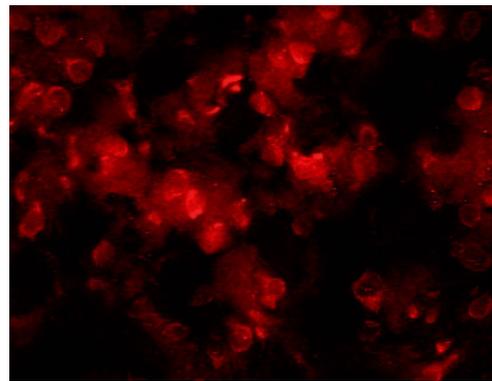
Sham



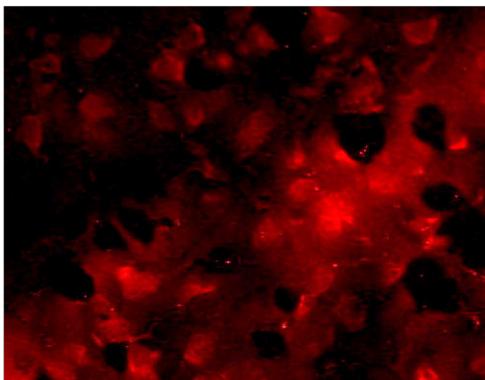
MCAO + 0,9 % NaCl



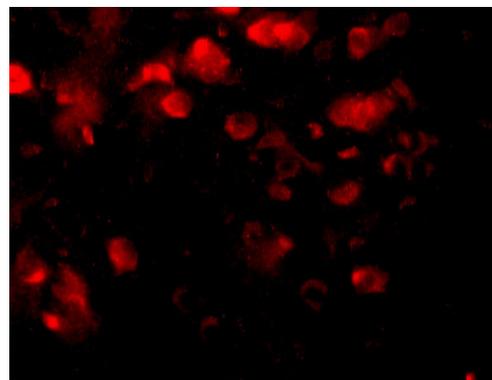
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

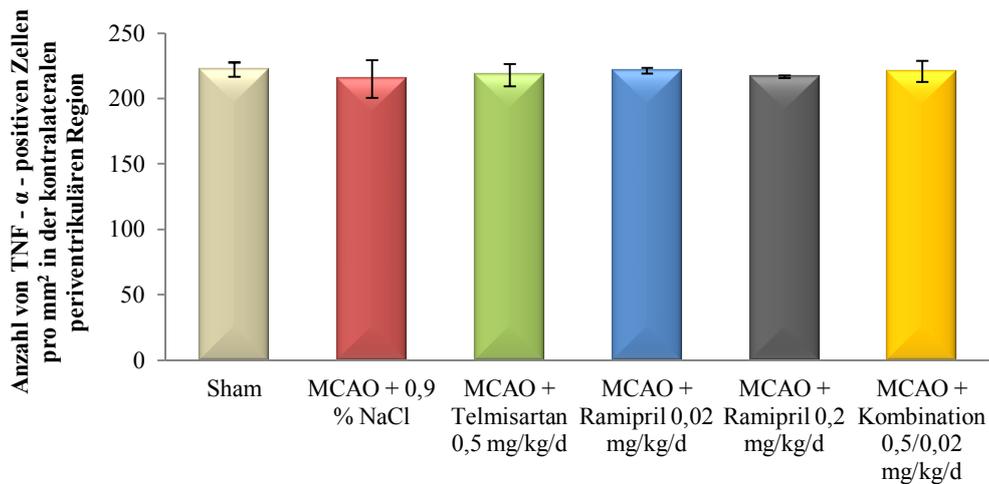


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-38.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TNF- $\alpha$ -Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

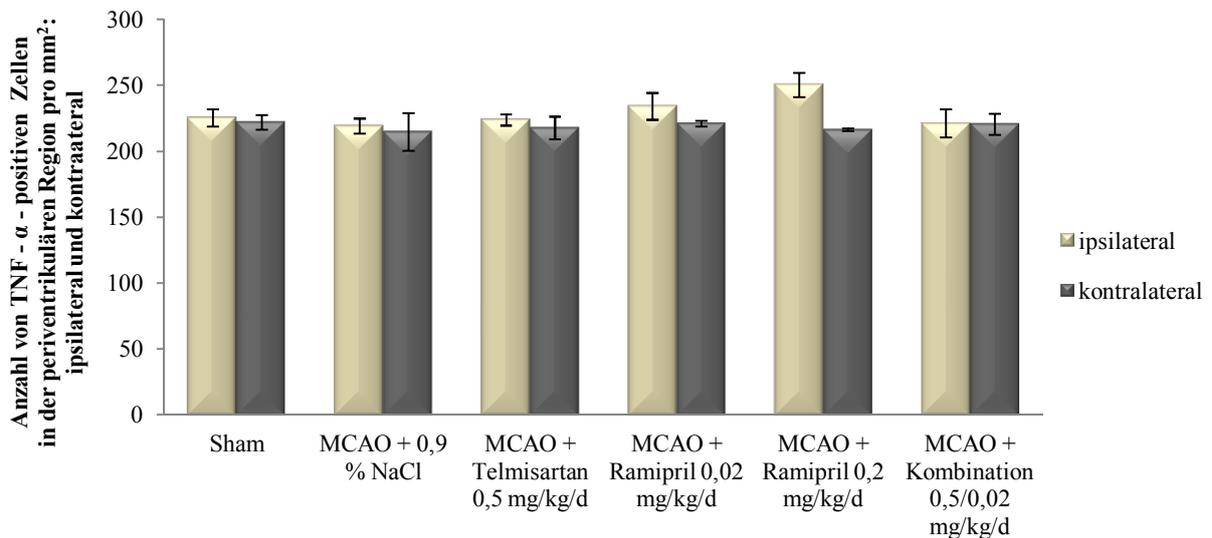
Das gleiche Ergebnis liefert die Auswertung der Abb. 3-39., in der sich gleichermaßen kein signifikanter Unterschied feststellen lässt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-39.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Beim Vergleich beider Seiten miteinander lässt sich, wie in Abb. 3-40. veranschaulicht kein signifikanter Unterschied feststellen.

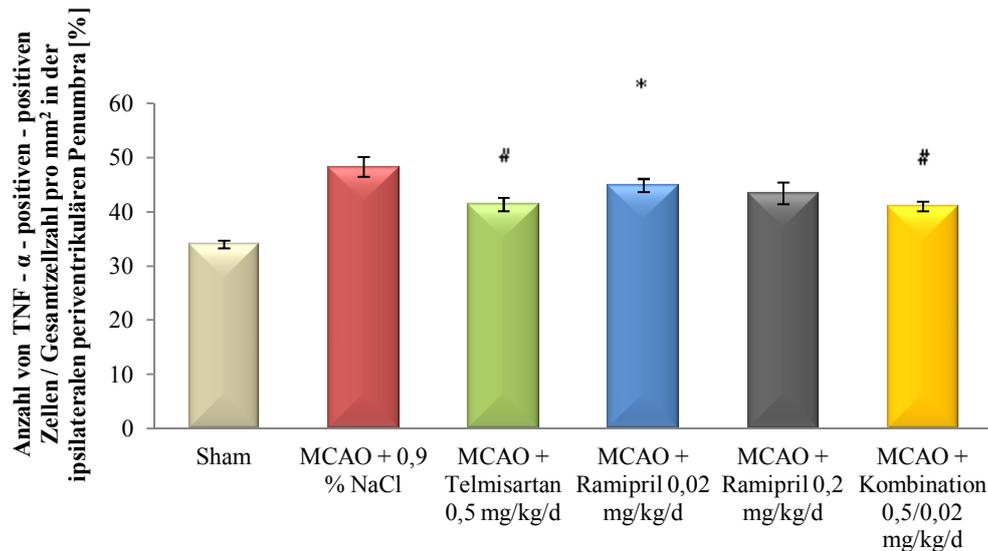


**Abbildung 3-40.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n =

## Ergebnisse

3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Auch im Rahmen der TNF- $\alpha$ -Färbung wurde die absolute Zahl Antikörper positiver Zellen auf die Gesamtzellzahl bezogen. Abb. 3-41. gibt das Resultat für die ipsilaterale Seite wieder.

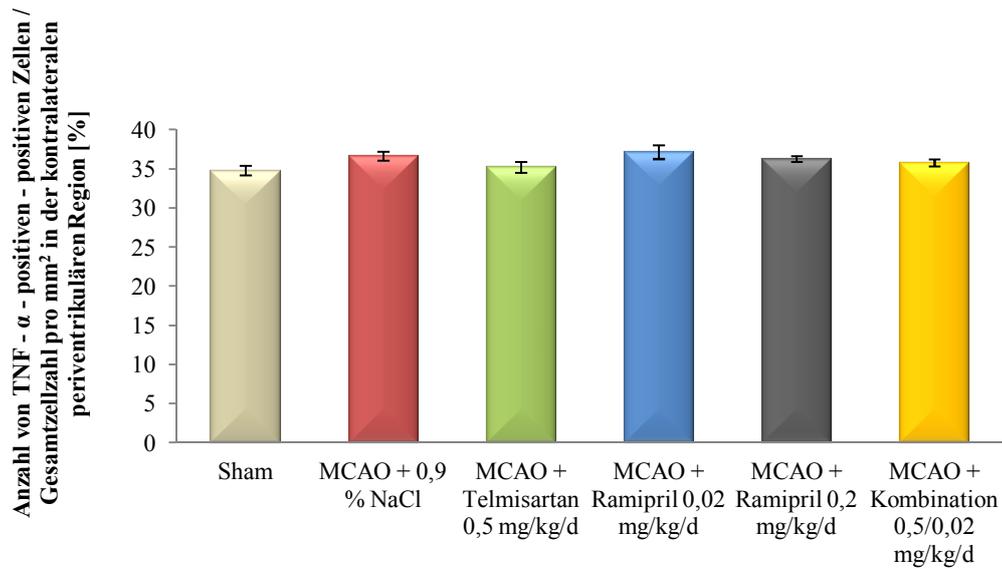


**Abbildung 3-41.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 vs. Sham, #p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

Anhand der Daten ist ersichtlich, dass alle MCAO-Behandlungsgruppen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe eine signifikant höhere relative Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen aufweisen. Darüber hinaus zeigen die Vorbehandlungen mit Telmisartan sowie der Kombination im Vergleich zur Vehikel-Gruppe signifikant niedrigere relative Zellzahlen.

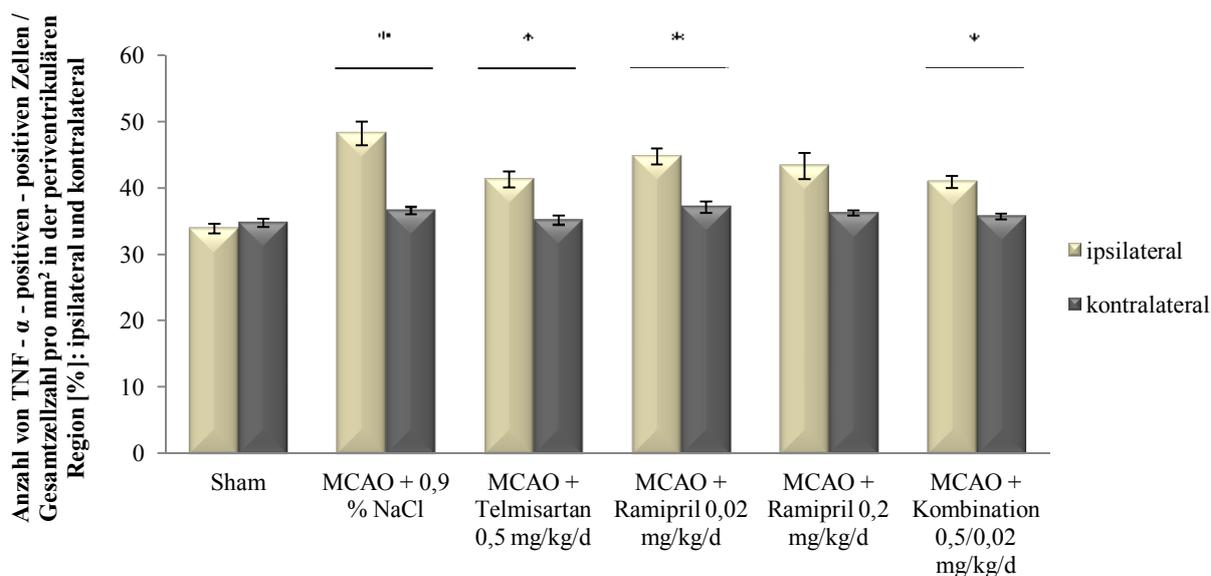
Demgegenüber finden sich auf der kontralateralen Seite, dargestellt in Abb. 3-42., keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-42.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %

Des Weiteren wurden beide Seiten miteinander verglichen. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abb. 3-43. zu sehen. Dabei zeigen die MCAO-Behandlungsgruppen, mit Ausnahme der mit der höheren Dosis Ramipril behandelten Tiere, signifikant höhere relative Zellzahlen auf der ipsilateralen als auf der kontralateralen Seite. In der Gruppe scheinoperierter Tiere lässt sich kein Unterschied feststellen.

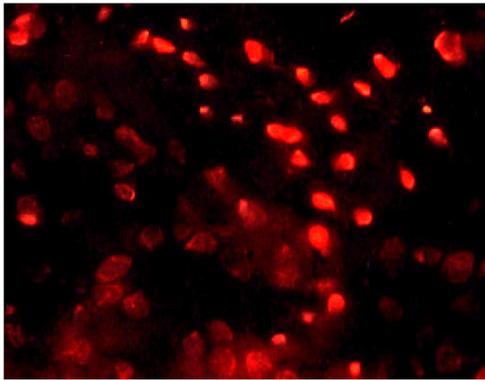


**Abbildung 3-43.** Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 innerhalb der Behandlungsgruppe

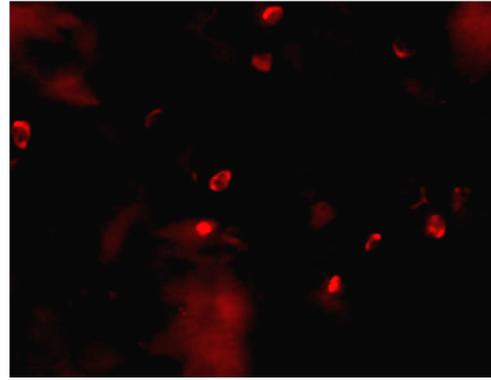
### 3.2.2.3.3. Ergebnisse der Tyrosinkinase B-Immunfluoreszenzfärbung

Ein wichtiger Vertreter unter den Neurotrophinen ist die Tyrosinkinase B, welche als ein Rezeptor des Liganden BDNF dessen neuroprotektive Wirkungen vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die 7  $\mu$ m dicken Schnitte immunfluoreszenzzytochemisch auf diesen Marker untersucht.

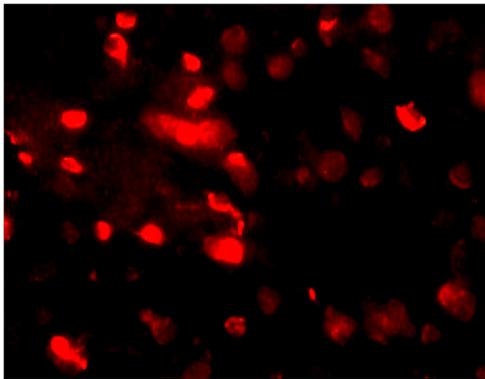
In der Abb. 3-44. ist für jede Behandlungsgruppe ein dementsprechendes, repräsentatives Bild der ipsilateralen Seite dargestellt. Daraus ersichtlich ist, dass innerhalb der Sham-, Telmisartan- und der Kombinationsbehandlungsgruppen eine höhere Anzahl TrkB-positiver Zellen im Vergleich zu den übrigen Gruppen vorhanden ist. Weiterhin scheint innerhalb der scheinoperierten Gruppe die Anzahl am höchsten zu sein.



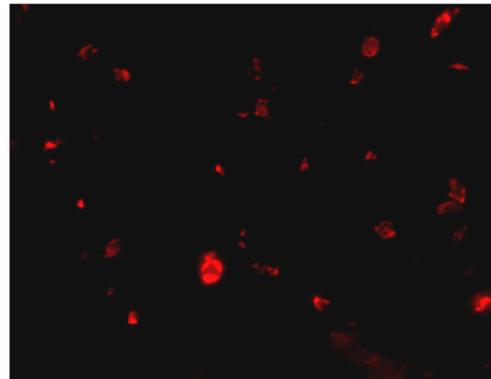
Sham



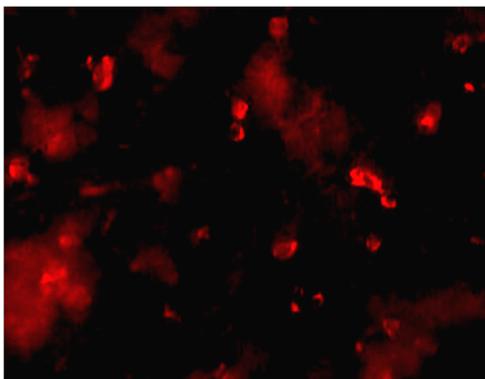
MCAO + 0,9 % NaCl



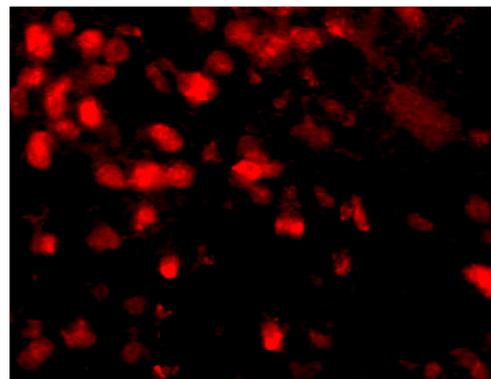
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d



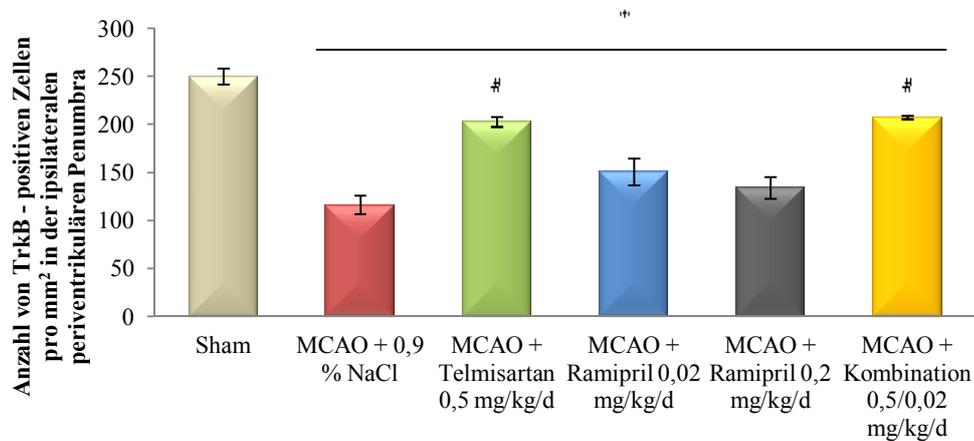
MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-44.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TrkB-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

Stellt man die ermittelten Werte, wie in Abb. 3-45. in einem Diagramm dar, so zeigen sich die gleichen Ergebnisse. Bei den scheinoperierten Tieren ist die Zahl TrkB-positiver Zellen im Ver-

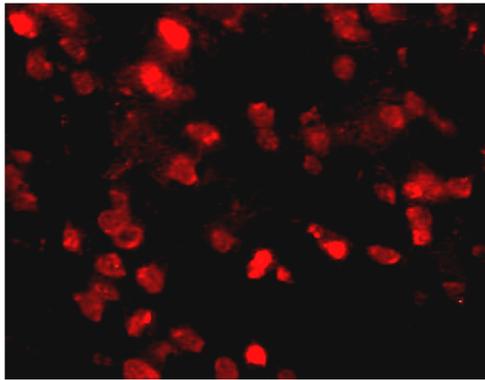
## Ergebnisse

gleich zu den übrigen Gruppen signifikant höher. Innerhalb der MCAO-Behandlungsgruppen ergeben sich im Vergleich zur Vehikel-Gruppe signifikant höhere Werte in der Telmisartan- sowie in der Kombinationsgruppe.

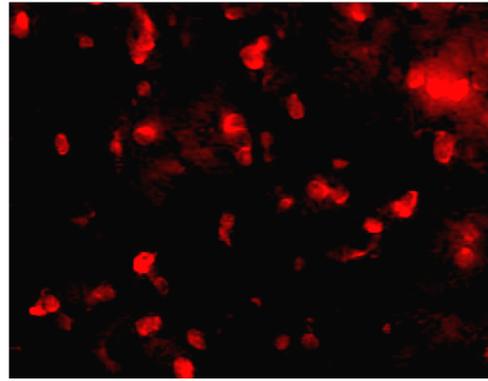


**Abbildung 3-45.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 vs. Sham, #p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

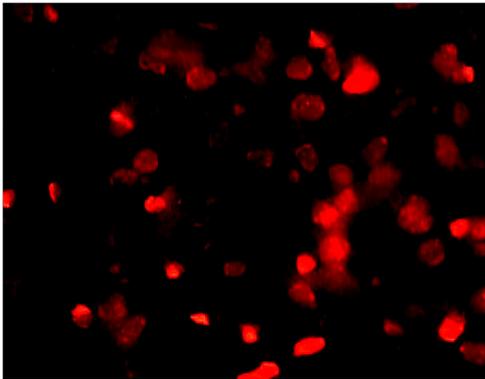
In den Ausschnitten fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der kontralateralen Seite, wie in Abb. 3-46. zu erkennen, finden sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.



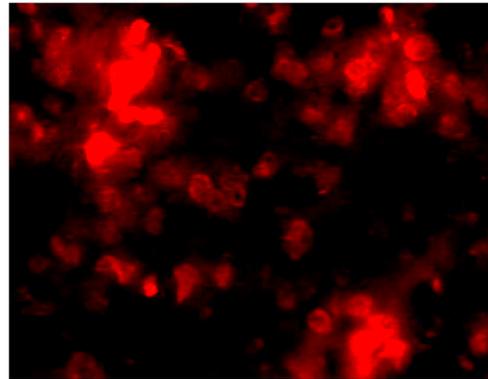
Sham



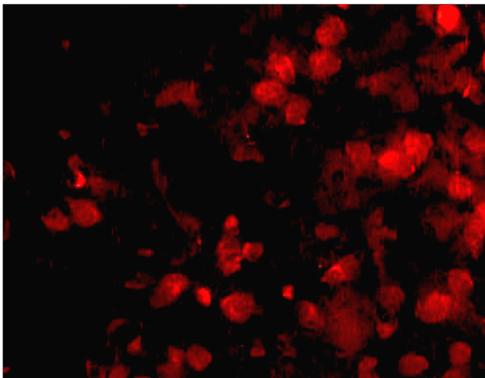
MCAO + 0,9 % NaCl



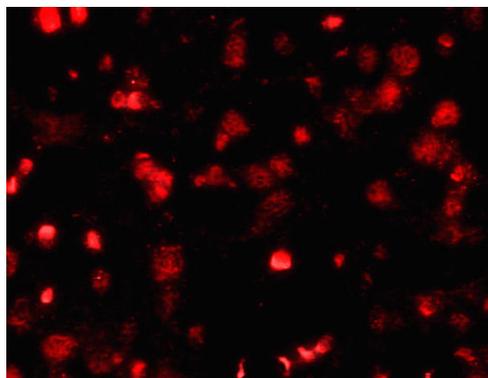
MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,02 mg/kg/d



MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d

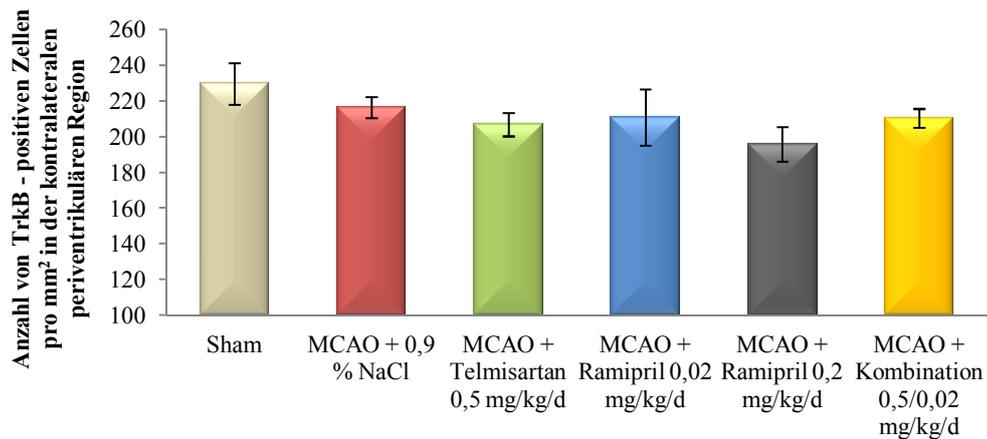


MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d

**Abbildung 3-46.** repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TrkB-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3)

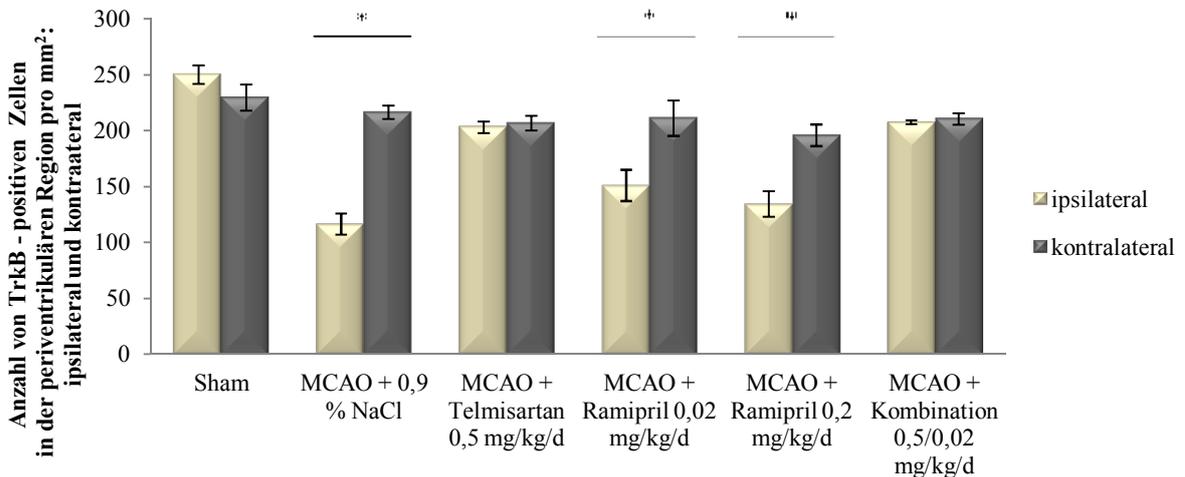
Die Auszählung der Zellen erbrachte das gleiche Resultat; zwischen allen Behandlungsgruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Abb. 3-47. gibt die Ergebnisse wieder.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-47.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse beider Seiten in Abb. 3-48. gegenüber gestellt.

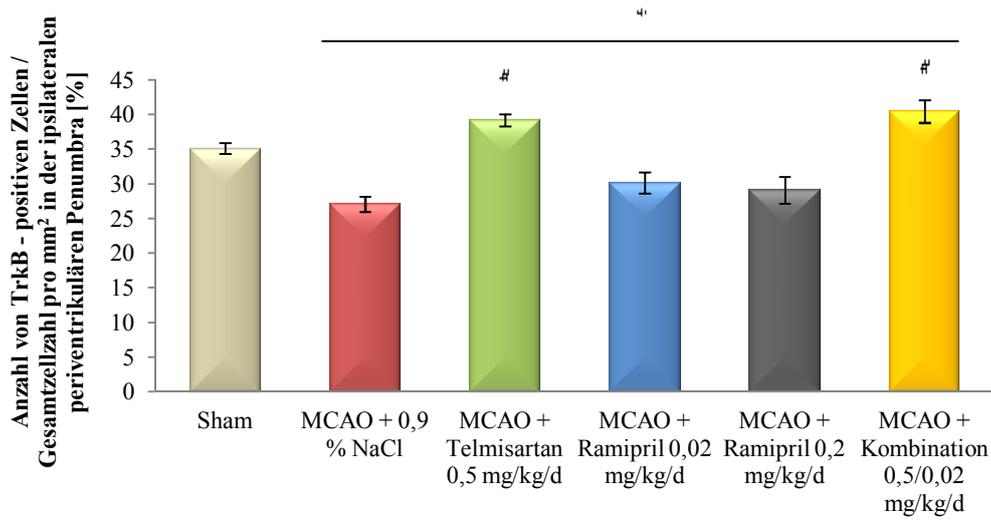


**Abbildung 3-48.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in absoluten Werten; \*p < 0,05 innerhalb der Behandlungsgruppe

## Ergebnisse

Basierend auf diesen Daten fehlt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Seiten bei den scheinoperierten sowie bei den mit Telmisartan und der Kombination behandelten Tieren. Dagegen ist in der Vehikel- und beiden Ramipril-Gruppen eine signifikant niedrigere Zahl TrkB-positiver Zellen auf der ipsilateralen im Vergleich zur kontralateralen Seite zu erkennen.

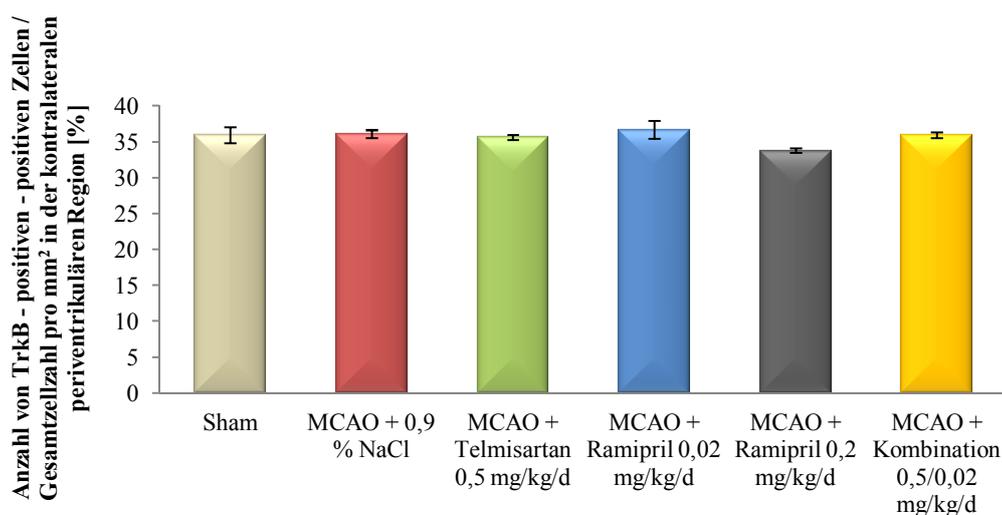
Bezieht man die ermittelte absolute Zahl TrkB-positiver Zellen der ipsilateralen Seite auf die Gesamtzahl, zeigt sich das in Abb. 3-49. dargestellte Bild.



**Abbildung 3-49.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 vs. Sham, #p < 0,05 vs. MCAO + 0,9 % NaCl

Während die Vehikel-sowie die Ramipril-Behandlungsgruppen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren signifikant niedrigere Werte aufweisen, lassen sich bei der Telmisartan-sowie der Kombinationsbehandlung signifikant höhere relative Zellzahlen im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe feststellen. Überdies zeigen die Vorbehandlungen mit Telmisartan und der Kombination eine signifikant höhere Zahl TrkB-positiver Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl im Vergleich zur Vehikel-Gruppe.

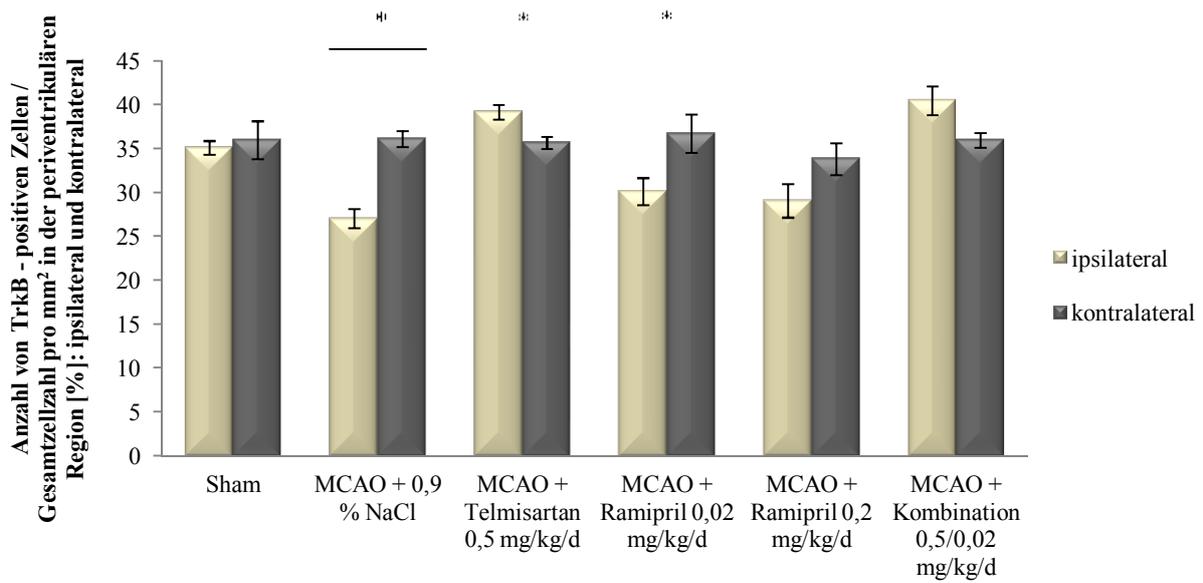
Für die kontralaterale Seite lassen sich, wie in Abb. 3-50 erkennbar, keine signifikanten Unterschiede eruieren.



**Abbildung 3-50.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %

Vergleicht man wiederum diesbezüglich beide Seiten miteinander, ergeben sich in den MCAO-Behandlungsgruppen mit 0,9 % NaCl, Telmisartan und Ramipril in der niedrigeren Dosis signifikante Unterschiede. Während die Vorbehandlung mit dem Vehikel sowie Ramipril in niedriger Dosierung in einer signifikant niedrigeren relativen Zellzahl resultiert, ruft die Medikation mit Telmisartan eine signifikant höhere Zahl TrkB-positiver Zellen in der ipsilateralen periventriculären Region im Vergleich zur kontralateralen Seite hervor. In der Kombinationsgruppe sowie der höher dosierten Ramipril-Gruppe zeigen sich nur Tendenzen einer (im Falle der Kombinationsbehandlung,  $p = 0,057$ ) höheren bzw. (im Falle der höheren Ramiprildosierung,  $p = 0,09$ ) niedrigeren relativen Zellzahl auf der zum Schlaganfall ipsilateral gelegenen Seite. Zwischen ipsi- und kontralateraler Seite der scheinoperierten Tiere ist kein Unterschied festzustellen. Abb. 3-51. veranschaulicht diese Ergebnisse.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-51.** Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in der ipsi- und kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung. Untersuchung innerhalb der scheinoperierten Tiere (n = 4) sowie den Behandlungsgruppen MCAO + 0,9 % NaCl (n = 3), MCAO + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4), Ramipril 0,02 mg/kg/d (n = 3), MCAO + Ramipril 0,2 mg/kg/d (n = 3) und MCAO + Kombination 0,5/0,02 mg/kg/d (n = 3); Angabe in %; \*p < 0,05 innerhalb der Behandlungsgruppe

### 4. Diskussion

#### 4.1. Pilotstudie zur Dosisfindung

Der Schlaganfall erlangt sowohl durch die individuellen gesundheitlichen Einschränkungen, als auch durch seine sozio- und gesundheitsökonomischen Folgen Bedeutung. Infolgedessen nimmt die Prävention dieser Herz-Kreislauf-Erkrankung eine besondere Stellung ein. ARBs und ACE-Inhibitoren erweisen sich in zahlreichen klinischen Studien im Rahmen der Primär- und auch Sekundärprävention als wirksame Therapeutika (70, 72, 73, 75, 146, 167, 168, 169, 170). Darüber hinaus lassen sich aufgrund von verschiedenen experimentellen Studien Blutdruck-unabhängige Wirkungen seitens der ARBs vermuten, die neben der Blutdruck-senkenden Eigenschaft dieser Substanzklasse zur Senkung der Inzidenz und Beeinflussung der Schlaganfallfolgen führen könnten (131, 161, 162, 163, 166).

Vor Beginn der Hauptstudie dieser Arbeit wurde eine Pilotstudie zur Dosisfindung durchgeführt. Zum einen sollte eine gleichermaßen wirksame, ca. 90 %-ige Blockierung des RAS durch den ARB Telmisartan und den ACE-Inhibitor Ramipril gewährleistet sein, zum anderen durfte der systemische Blutdruck vor, während und nach der Schlaganfallsimulation nicht beeinflusst werden.

Für die Dosisfindung von Telmisartan und Überprüfung dessen Fähigkeit, das RAS *in vivo* zu blockieren, wurde Ang II mit einer Dosis von 50 ng/kg KG i. v. injiziert. Diese Dosierung führte im Rahmen anderer Arbeiten zu einer Zunahme des MAP von rund 40-50 mmHg (166, 218). Zur Ermittlung der optimalen Ramipril-Dosis erfolgte die intravenöse Injektion von Ang I. Um einen annähernd gleichen Anstieg des MAP mit Hilfe der Angiotensine zu erreichen, wurde die Wirkung von 50 ng/kg KG Ang II mit den Wirkungen verschiedener Dosierungen von Ang I verglichen (siehe Abb. 3-1.). Dabei zeigte sich, dass die Gabe von 150 ng/kg KG Ang I einen annähernd gleichen Anstieg des MAP (von 30-40 mm Hg) wie 50 ng/kg KG Ang II hervorruft. Nach Gabe verschiedener Dosierungen von Telmisartan konnte der Anstieg des MAP, hervorgerufen durch Ang II, abgeschwächt werden. Die Dosierung von 0,5 mg/kg KG zeigte sich dabei als jene der getesteten Dosierungen, die gerade noch eine ca. 90 %-ige Abschwächung des MAP-Anstiegs bewirkte (siehe Abb. 3-2.). In den nachfolgenden Untersuchungen konnte mittels dieser Dosis eine 24-stündige Blockierung des RAS erreicht werden (siehe Abb. 3-5.). Zudem war kein Einfluss auf den Blutdruck vor, während und nach der Schlaganfallsimulation nach einer 5-tägigen Vorbehandlung festzustellen (siehe Abb.3-6.). Um Blutdruck-unabhängige Wirkungen im Gehirn vermitteln zu können, müsste Telmisartan in der Lage sein, die BBB zu überwinden.

Gohlke *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass die systemische Gabe von Telmisartan Ang II-vermittelte Wirkungen im Gehirn blockiert. Ein weiterer Beleg für den Übertritt über die BBB war eine Erhöhung der Telmisartan-Konzentration im *Liquor* (219). Die geringste getestete Ramipril-Dosis, die gerade noch den Ang I-induzierten MAP-Anstieg zu rund 90 % abschwächte, war 0,01 mg/kg KG (siehe Abb. 3-3.). Jedoch zeigte diese Dosierung keine 24 h-anhaltende Blockierung des RAS, sodass die Dosis 2-mal täglich appliziert wurde (siehe Abb. 3-5.). Des Weiteren ergaben sich keine Blutdrucksenkungen vor, während und nach der Schlaganfallsimulation (siehe Abb. 3-6.). Bislang existieren noch keine Daten, die einen Übertritt von Ramipril über die BBB im Rahmen einer transienten, fokalen zerebralen Ischämie belegen. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Ramipril in einer antihypertensiven Dosierung die BBB überwinden kann (166). Aufgrund dessen, dass die gewählte Ramipril-Dosis um eine Zehnerpotenz kleiner als die gewählte Telmisartan-Dosis war und, um die Wahrscheinlichkeit einer BBB-Penetration zu erhöhen, wurde eine weitere Dosierung von Ramipril (2-mal täglich 0,1 mg/kg KG) untersucht, wobei jedoch während der Schlaganfallsimulation ein signifikanter Blutdruckabfall im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zu sehen war. Ebenfalls wurde die Kombination der beiden Substanzgruppen auf deren Einfluss auf die Ang I- bzw. II-vermittelten Wirkungen sowie auf den Blutdruck im Rahmen der MCAO untersucht. Dabei war sowohl eine ca. 90 %-ge Unterdrückung der MAP-Anstiege, als auch ein fehlender Blutdruckabfall zu beobachten (siehe Abb. 3-4. und 3-6.). Somit wurden die oben genannten Bedingungen für alle Behandlungsgruppen, bis auf die Ramipril-Gruppe mit 0,2 mg/kg KG, vollkommen erfüllt, sodass Wirkungen jenseits der Blutdrucksenkung untersucht werden konnten.

#### 4.2. Einfluss der Vorbehandlungen auf die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen

Die Blockade des RAS, insbesondere durch ARBs, kann das Auftreten von Schlaganfällen durch viele Mechanismen beeinflussen, als Beispiele seien die Blutdrucksenkung, Verlangsamung der Atheroskleroseentstehung oder Verbesserung der zerebralen Perfusion genannt (220). Eine wichtige Rolle unter diesen Beispielen spielt die Blutdrucksenkung. So verhindert die Langzeitbehandlung mit ACE-Inhibitoren oder ARBs das Auftreten eines Schlaganfalls bzw. erhöht die Lebenserwartung in zu Schlaganfall-neigenden SHR (SHR-SP) (221, 222). Letztlich ist diese neuroprotektive Wirkung auf die antihypertensiven Eigenschaften der beiden Substanzgruppen zurückzuführen. Jedoch zeigen zahlreiche Studien, dass Losartan und andere Vertreter der Sartane Infarkte und konsekutive Hirnödeme verhindern sowie die Überlebensrate in SHR-SP erhöhen können, ohne den Blutdruck zu beeinflussen. So vermittelte die Gabe von 0,3 mg/kg KG

Telmisartan in SHR-SP eine Verzögerung der Schlaganfallentstehung und eine verlängerte Überlebenszeit ohne gleichzeitige Blutdrucksenkung (220).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer 5-tägigen Vorbehandlung mit Telmisartan, Ramipril und der Kombination aus beiden Substanzen, in jeweils subantihypertensiver Dosierung, auf Infarktverhalten, neurologische Defizite und weitere klinische Parameter nach MCAO untersucht. Dementsprechend sollten, anders als bei den oben beschriebenen SHR-SP-Studien, Blutdruck-unabhängige Wirkungen im Rahmen einer fokalen zerebralen Ischämie untersucht werden, nicht dagegen der Einfluss auf die Inzidenz von Schlaganfällen. Der Erfolg der Gefäß-okklusion wurde mit Hilfe von MRT-Untersuchungen und Laser-Doppler-gestützten Messungen des CBF gewährleistet. Bei Betrachtung der relativen, auf das Körpergewicht bezogenen, Infarktvolumina (siehe Abb. 3-12.) zeigten sich Telmisartan und die Kombinationsbehandlung wirksamer in der Reduktion des Volumens als beide Ramipril-Gruppen im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Ebenso ließ sich ein signifikant verbesserter neurologischer Status 24 und 48 h nach der MCAO in der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe erheben (siehe Abb. 3-13.). Beide Ramipril-Gruppen zeigten keinen Unterschied zur Vehikel-Gruppe. Daneben fiel auf, dass die scheinoperierten Tiere nicht die zu erwartende Maximalpunktzahl in der Bewertungsskala erreichten. Als mögliche Ursache könnten die Nachwirkungen der Allgemeinanästhesie und der postoperativen Analgesie gesehen werden. Hinsichtlich der Behandlungsschemata lässt sich demnach eine verbesserte Erholung nach Ischämie innerhalb der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe konstatieren. Gestützt wird dies durch die Tatsache, dass die Tiere in beiden Gruppen nach der Schlaganfallsimulation, wie auch die Sham-Gruppe, an Gewicht zunahmten, während man in der Vehikel- und den Ramipril-Gruppen Gewichtsverluste erkennen konnte.

Diese gewonnenen Daten stehen in Einklang mit verschiedenen *in vivo*-Studien, welche die neuroprotektiven Eigenschaften der ARBs in Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie untersuchten. Beispielsweise führte die intrazerebrovaskuläre Infusion von Irbesartan 5 Tage vor der MCAO zu einer signifikanten Verminderung neurologischer Defizite und zu einer verminderten Expression von c-Fos und c-Jun. (209). Dagegen konnten diese Ergebnisse bei peripherer Applikation von Irbesartan nicht reproduziert werden. Für Candesartan wurden diesbezüglich andere Daten erhoben. So führte eine 5-tägige systemische Vorbehandlung in niedriger Dosierung vor der MCAO zu einem kleineren Infarktverhalten und einer beschleunigten Erholung. Darüber hinaus bewirkte eine postischämische Gabe von Candesartan in ähnlich niedriger Dosierung ebenfalls einen verbesserten neurologischen Status und ein vermindertes Infarktverhalten (220). Ursache dieses Unterschieds zwischen den beiden Sartanen könnte in der unter-

schiedlichen Fähigkeit zur Überwindung der BBB sein, die im Falle von Candesartan weitaus größer ist. Zudem ist die Bindungsaffinität zum AT<sub>1</sub>-R. größer als die von Irbesartan (219). Telmisartan erwies sich in Studien als fähig, nach peripherer Applikation Ang II-induzierte zerebrale Wirkungen wie MAP-Anstieg, ADH-Freisetzung und verstärktes Trinkverhalten abzuschwächen. Dabei waren geringere Dosierungen notwendig als für Irbesartan oder Losartan. Als ursächlich wird aber nicht eine stärkere Bindungsaffinität wie bei Candesartan angenommen, sondern der größere Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von Telmisartan im Vergleich zu Irbesartan oder Losartan. Infolgedessen soll die Fähigkeit Telmisartans, die BBB zu passieren, größer sein als die der beiden anderen Sartane. Dennoch lässt sich ein Unterschied zwischen der vorliegenden und der mit Candesartan durchgeführten Studie feststellen. In der letzteren waren auch die absoluten Infarkt volumina in der Candesartan-Gruppe signifikant kleiner als die der Vehikel-Gruppe (166). Grund dieser Tatsache könnte die stärkere Bindung an den AT<sub>1</sub>-R. durch Candesartan sein.

Für Telmisartan selbst gibt es bisher kaum Studien, die wie in der vorliegenden Arbeit den Einfluss einer Vorbehandlung in subantihypertensiver Dosierung auf Infarktvolumen etc. untersuchten. Kobayashi *et al.* betrachteten den Einfluss verschiedener Dosierungen auf das Infarktvolumen und auf neurologisch fassbare Defizite. Dabei zeigte sich nur bei der höchsten getesteten Dosis (1 mg/kg KG) eine Beeinflussung des Schlaganfallvolumens, welches in dieser Gruppe signifikant niedriger war als in der Vehikel-Gruppe. Auch hinsichtlich der neurologischen Defizite fand sich lediglich in der Gruppe mit 1 mg/kg KG eine signifikante Verbesserung. Die anderen getesteten Dosierungen von 0,25 bzw. 0,5 mg/kg KG zeigten in keiner Untersuchung eine Veränderung im Vergleich zum Vehikel. Vergleicht man diese Studie und die hier vorliegende miteinander, lassen sich durchaus Gemeinsamkeiten finden. So konnten beide Studien zeigen, dass eine Telmisartan-Vorbehandlung in der Lage ist das Infarktvolumen zu verringern und neurologische Defizite zu verbessern. Weiterhin wurde der Blutdruck während der Schlaganfallsimulation in beiden Studien arteriell gemessen. Allerdings bestehen auch z. T. erhebliche Unterschiede im Studiendesign. Beispielsweise handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um die Simulation einer fokalen, transienten Ischämie, die eine Reperfusion nach 30-minütiger Okklusionszeit erlaubt. Im Gegensatz dazu nutzten Kobayashi *et al.* ein Modell des permanenten Gefäßverschlusses mittels Elektrokoagulation der *A. cerebri media*. In Anbetracht einer endogenen Thrombolyse oder von Interventionen im Rahmen der Akuttherapie des Schlaganfalls, erscheint das in der vorliegenden Arbeit genutzte Modell der transienten Ischämie weitaus besser auf den Menschen übertragbar. Auch hinsichtlich der Ergebnisse bestehen Unterschiede. So konnten positive Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bereits bei einer geringeren

Dosis von 0,5 mg/kg KG erzielt werden. Darüber hinaus war die Vorbehandlungszeit mit 5 Tagen um 2 Tage kürzer als in der Studie von Kobayashi *et al.*. Des Weiteren wurden die Infarkt-volumina 24 h nach der MCAO ermittelt, d. h. 24 h früher als in der vorliegenden Arbeit. Eine wichtige Voraussetzung zur Überprüfung Blutdruck-unabhängiger Wirkungen war die fehlende Blutdrucksenkung vor, während und nach der MCAO. Zwar wird in der Studie von Kobayashi *et al.* erwähnt, dass sich der MAP vor und kurz nach Beginn der Ischämie nicht änderte und auch zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede bestanden, es werden jedoch keine Werte angegeben. Zudem fehlen Daten für den zeitlichen Verlauf des Blutdruckes, wie sie in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Ebenso mangelt es an einer Vergleichsgruppe, bei der die Gefäßokklusion nicht vollzogen wurde. Hervorzuheben ist weiterhin, dass die Studie die Ergebnisse der Telmisartan-Gruppen nicht mit anderen RAS-blockierenden Pharmaka vergleicht. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der Telmisartan-Gruppe, sowohl mit Ramipril als Vertreter der ACE-Inhibitoren, als auch mit der Kombination beider Substanzen verglichen. In der Studie von Kobayashi *et al.* war das absolute Infarktvolu-men signifikant niedriger und nicht nur das relative, wie die erhobenen Daten dieser Arbeit zei-gen. Somit stehen die Daten der Studie teilweise sogar im Widerspruch mit denen der vorliegen-den Arbeit. Auch die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit bereits die Telmisartan-Dosierung von 0,5 mg/kg KG eine Verbesserung der neurologischen Defizite bewirkte, macht den direkten Vergleich beider Studien schwerer. Zwar kann bezüglich der Volumina spekuliert werden, dass durch die Verwendung der höheren Dosierung von 1 mg/kg KG und die um 2 Tage längere Vorbehandlung eine stärkere Blockade zentraler AT<sub>1</sub>-R. hervorgerufen hatte und damit letztlich auch die absoluten Schlaganfallvolumina signifikant gesenkt werden konnten. Dennoch muss in Anbetracht der oben beschriebenen Unterschiede und Mängel in der Studie von Kobayashi *et al.* im Vergleich zu der hier vorgestellten Studie die Validität der Ergebnisse hinterfragt werde, u. a. fehlen Daten, die eine fehlende Blutdrucksenkung belegen. So kann man nicht sicher von Blutdruck-unabhängigen Wirkungen ausgehen, die von Kobayashi *et al.* erhoben wurden (223).

Verantwortlich für die Überlegenheit des ARBs Telmisartan und der Kombination gegenüber der beiden Ramipril-Dosierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist vermutlich die vermehrte Aktivierung von unbesetzten AT<sub>2</sub>-R.. Als Resultat der Telmisartan-Medikation wird der AT<sub>1</sub>-R. blockiert, infolgedessen die typischen Ang II-vermittelten Wirkungen abgeschwächt werden und die Ang II-Konzentration im Plasma durch ein fehlendes, da ebenfalls blockiertes, negatives *Feedback* ansteigt. Die vermehrten Ang II-Moleküle können somit den AT<sub>2</sub>-R. aktivieren und durch ihn vermittelte, neuroprotektive Wirkungen entfalten. Diese These der vermehrten AT<sub>2</sub>-R.-

Aktivierung als Ursache der Überlegenheit wird durch die Tatsache unterstützt, dass eine gleichzeitige Blockade des AT<sub>2</sub>-R. zu einer Reversion der beobachteten Effekte in einer anderen Studie zur Folge hatte (220). Wird das ACE dagegen durch Ramipril blockiert, verringert sich die Plasmakonzentration von Ang II, welches wegen einer fehlenden Rezeptorblockade, an beide AT-R. binden kann. Wahrscheinlich liegt auch hier die Ursache dafür, weshalb die Kombinationstherapie gegenüber der Telmisartan-Behandlung keinen Vorteil erbringt. Die zusätzliche ACE-Inhibition bewirkt zwar eine stärkere Blockierung des RAS, jedoch wird jene Ang-II-Konzentration vermindert, die durch die AT<sub>1</sub>-Blockade erhöht wurde. Netto scheinen sich die zusätzliche ACE-Hemmung und die zugleich verminderte Ang II-Konzentration im Rahmen der Kombinationsbehandlung aufzuheben. Eine weitere Ursache für die Unterlegenheit Ramiprils könnte der ungewisse BBB-Übertritt sein. Bisher untersuchten nur wenige Studien diesen ACE-Inhibitor auf dessen Fähigkeit die BBB zu passieren (224, 225). Dabei konnte man zeigen, dass eine 7-tägige orale Applikation von 10 mg/kg KG Ramipril in Ratten zu einer Hemmung des ACE in Großhirnrinde, Hypothalamus und Hirnstamm führte. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass der BBB-Übertritt in Abhängigkeit von der Lipophilie passiere (225). Diese Fragestellung wurde in einer anderen Studie untersucht, welche die Beziehung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten verschiedener ACE-Inhibitoren und deren Fähigkeit zur BBB-Passage gegenüberstellte. Dabei zeigte sich, dass eine steigende Lipophilie mit einem besseren BBB-Übertritt verbunden ist. Des Weiteren wurde ein *Carrier*-vermittelter Mechanismus für hydrophilere Vertreter der Substanzgruppe postuliert (226). Experimente an Ratten ergaben außerdem, dass ein, durch Ang-I hervorgerufenen, gesteigertes Trinkverhalten durch die periphere Gabe von Ramipril, Enalapril und Captopril abgeschwächt wurde (224). Diese Daten sprechen dafür, dass das, im Vergleich zu seinen anderen Vertretern der Substanzgruppe lipophilere, Ramipril die BBB überwinden kann, jedoch hohe Konzentrationen notwendig sind. Dies wirft die Frage auf, inwieweit die subantihypertensive Dosierung von 0,02 mg/kg KG in der Lage war, die BBB zu passieren und Blutdruck-unabhängige Effekte zu entfalten. In der von Krikov *et al.* durchgeführten Studie, die ähnliche Bedingungen wie die vorliegende Arbeit voraussetzte, war Ramipril in gleicher Dosierung ebenfalls dem Sartan bezüglich des Infarktolumens und des neurologischen Status unterlegen (166). Das Gleiche galt auch für die höhere Dosis von 0,2 mg/kg KG, welche ebenso in der vorliegenden Arbeit der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe unterlegen war. Eine Erklärung dafür könnte zum einen sein, dass auch diese Konzentration zu gering für einen BBB-Übertritt war. Zum anderen könnten im Falle einer erfolgreichen Passage der BBB die potentiellen neuroprotektiven Effekte durch den Blutdruckabfall während der MCAO aufgehoben worden sein.

### 4.3. Einfluss der Vorbehandlungen auf die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen

Neben Veränderungen hinsichtlich Infarktgröße, Gewichtsverhalten oder in der neurologischen Beurteilung wurde im Rahmen von *in vitro*-Untersuchungen nach weiteren Effekten einer Vorbehandlung sowie nach möglichen Ursachen für Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gesucht. Zum einen wurde der Einfluss auf proinflammatorische, zum anderen auf neuroprotektive Mechanismen betrachtet. Dazu wurden nukleotidanalytische sowie immunfluoreszenzzytochemische Methoden herangezogen. Mittels RT-PCR erfolgte die Untersuchung der Genexpression von TNF- $\alpha$ , Il-6, BDNF und TrkB. Weiterhin wurden angefertigte Kryoschnitte auf histologische Veränderungen bezüglich Gesamtzellzahl, Neuronenzahl, TNF- $\alpha$ -, Il-6- und TrkB-positiver Zellen untersucht. Für die Auswertung der gefärbten Kryoschnitte wurde die periventrikuläre Penumbra respektive die zum Schlaganfall kontralateral gelegene, periventrikuläre Region in jeder Behandlungsgruppe betrachtet. Die Wahl der Region erfolgte zum einen aufgrund der bekannten Verteilung von AT<sub>1</sub>-R. in der periventrikulären Region (227), zum anderen aus dem Grund, dass die Betrachtung der jeweils gleichen Region eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen bietet.

Wie unter 1.4. beschrieben, korrelieren hohe Werte von TNF- $\alpha$  mit einer Verschlechterung neurologischer Defizite sowie mit einem erhöhten Infarktvolumen (199). Dabei kann TNF- $\alpha$  u. a. durch die Potenzierung der Glutamat-Toxizität und die gesteigerte Expression von ICAM-1, VCAM-1, COX-2, iNOS sowie MMPs zu einer Schädigung neuronalen Gewebes führen (202). Studien zeigten, dass sich die Expression von TNF- $\alpha$  und die des AT<sub>1</sub>-R. gegenseitig bedingen. So führte TNF- $\alpha$  in einer von Peng *et al.* durchgeführten Studie zu einer Steigerung der AT<sub>1</sub>-R.-Expression (228). Ferner war in einer anderen Studie mit glatten, humanen Gefäßmuskelzellen die Aktivierung des AT<sub>1</sub>-R. durch Ang II mit einer Erhöhung der Proteinkonzentration des TRAF-2 verbunden (229). Demgegenüber zeigten Studien, dass die Blockierung des AT<sub>1</sub>-R. eine Herunterregulierung der Genaktivität von TNF- $\alpha$  zu Folge hat. Beispielsweise führte der ARB Candesartan zu einer Verminderung einer Stress-induzierten TNF- $\alpha$ -Expression in Ratten (230). Ebenso rief der ARB Olmesartan in Mäusen eine Inhibierung der TNF- $\alpha$ -Expression hervor (231). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mittels der ACE-Inhibitoren Captopril, Enalapril und des ARB Losartan die TNF- $\alpha$ -induzierte VEGF-Expression in mesothelialen Zellen abnimmt (232). In einer anderen Studie führte der ARB Losartan zu einer Abnahme des Hypoxie-induzierten Zellschadens in Astrozyten und der TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Dabei wurde dieser Effekt durch eine zusätzliche Blockade des AT<sub>2</sub>-R. nicht aufgehoben, was für eine AT<sub>2</sub>-R.-unabhängige Wirkung des ARB spricht (233). Für Irbesartan, als weiteren ARB, konnte eine

durch ihn vermittelte Verminderung der Expression des löslichen TNFR-2 in Patienten mit frühzeitiger Atherosklerose gezeigt werden (234). Neben diesen Studien, die einen Zusammenhang zwischen  $AT_1$ -R. und TNF- $\alpha$ -Expression belegen, wurde in einer Studie bei Patienten mit unkomplizierter Hypertonie gezeigt, dass Losartan keinen Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Spiegel im Plasma hat (235). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Expressions-vermindernde Wirkung der Sartane abhängig vom Grad des pathologischen Zustands der verschiedenen Gewebe sein könnte und, dass nicht-erhöhte TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel von einer  $AT_1$ -R.-Blockade unbeeinflusst bleiben. Wie für TNF- $\alpha$  gibt es für Il-6 ebenfalls Hinweise darauf, dass hohe Werte mit einem größeren Infarkt volumen assoziiert sind (6). Daneben korreliert eine hohe Plasmakonzentration mit einem erhöhten Risiko eines Reinfarkts (207). Bekannt ist, dass Ang II zu einer erhöhten Il-6-Freisetzung führt (229, 236). Umgekehrt bewirkt Il-6 in glatter Gefäßmuskulatur der Ratte eine gesteigerte Genexpression und Proteinsynthese des  $AT_1$ -R. (237). Dass der  $AT_1$ -R. eine wesentliche Rolle in der Ang II-vermittelten Hochregulierung der Il-6-Expression spielt, wurde durch verschiedene Studien belegt. Beispielsweise führte die  $AT_1$ -R.-Blockade in menschlichen Adipozyten durch Candesartan zu einer Abschwächung bzw. Inhibition des stimulierenden Effekts auf die Il-6-Expression durch Ang II (238). In gleicher Weise wurde die Ang II-medierte Expressionssteigerung durch die  $AT_1$ -R.-Blockade in mesangialen Zellen der Maus in einer anderen Studie inhibiert (239). In diesem Zusammenhang konnte durch weitere Studien gezeigt werden, dass die ARBs Candesartan und Losartan zu einer Verminderung einer Lipopolysaccharid-vermittelten Il-6-Sekretion in menschlichen Monozyten, Ratten und Nagetieren führen (240, 241, 242) oder im Rahmen einer experimentellen Ischämie der Niere in Ratten eine Senkung der Il-6-Expression hervorrufen (243). Dagegen fehlte ein derartiger Effekt in einer Studie, die den Einfluss von Telmisartan auf T-Zellen in stabilen Patienten mit arterieller Hypertonie oder KHK auf die Il-6-Expression untersuchte. Jedoch kann spekuliert werden, dass die fehlende Expressionsminderung spezifisch für T-Zellen ist oder der fehlende Effekt auf den guten Zustand der Patienten zurückzuführen ist, wodurch pathologische Werte der Il-6-Konzentration im betrachteten Patientengut nicht vorhanden waren (244).

Bei Betrachtung der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und Il-6 zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass lediglich die Kombinationsbehandlung gegenüber der Vehikel-Behandlung eine signifikante Senkung der Expression hervorrief (siehe Abb. 3-14. und 3-15.). Zwar fand sich für Telmisartan bezüglich der Il-6-Expression auch ein geringerer Wert, jedoch verfehlte die Behandlung das Signifikanzniveau. Bezüglich der TNF- $\alpha$ -Genexpression fand sich in der Telmisartan-Gruppe keine Tendenz; stattdessen waren vergleichbare Werte im Vergleich zur Vehikel-Gruppe festzustellen. Während die Genexpression der 2 untersuchten

proinflammatorischen Marker im Bereich des Schlaganfalls und der Umgebung demnach nur durch die Kombinationsbehandlung beeinflusst wird, zeigt sich bei der Auswertung der immunfluoreszenzzytochemischen Färbungen ein anderes Bild. Berücksichtigt man ausschließlich die absolute Zahl Il-6-positiver Zellen in der Penumbra, so findet sich zwischen allen Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 3-29). Diese Tatsache scheint auf den ersten Blick zu überraschen. In Studien ergab sich ein signifikanter Anstieg von Il-6 mit Erreichen eines Plateaus innerhalb von 10 h bis 3 Tagen nach einem Schlaganfall (33). Dabei ist anzunehmen, dass in der scheinoperierten Gruppe keine erhöhten bzw. niedrigere Werte als in den Schlaganfallgruppen zu finden sein sollten. Dennoch lässt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Die Tötung der Tiere erfolgte 2 Tage nach der Schlaganfallsimulation, sodass die Wahrscheinlichkeit sehr hoch sein müsste, dass erhöhte Werte für Il-6 vorgefunden werden. Zieht man aber die Gesamtzahl aller Zellen hinzu und berechnet den relativen Anteil Il-6-positiver Zellen (siehe Abb. 3-33.), zeigt sich das erwartete Bild. In sämtlichen Schlaganfallgruppen ist eine signifikant höhere Anzahl Il-6-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl zu sehen. Die Ursache der annähernd gleichen absoluten Zellzahlen und des Unterschieds bei Auswertung der relativen Zellzahlen könnte darin liegen, dass in den Schlaganfallgruppen mehr Il-6-negative Zellen zu Grunde gehen als Il-6-positiv Zellen. In der Folge unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich der absoluten Zellzahl nicht. Wird der Sachverhalt dagegen relativ betrachtet, wird dieser Umstand mit einbezogen. Zwischen den einzelnen Schlaganfallgruppen findet sich darüber hinaus auch kein Unterschied hinsichtlich der relativen Zahl Il-6-positiver Zellen. Jedoch ist tendenziell eine höhere Zahl in der Kombinations-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zu sehen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Kombinationsbehandlung mit einer höheren Gesamtzellzahl in der Penumbra verbunden ist und sich somit auch mehr Zellen positiv für Il-6 anfärben lassen. Letztlich ist dieser Befund aber nicht signifikant. Auf der kontralateralen Seite des Schlaganfalls würde man keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erwarten, sowohl für die absolute, als auch für die relative Anzahl positiv gefärbter Zellen, da eine ischämische Schädigung hier nicht vorlag. Diese Erwartung bestätigte sich bei der Überprüfung der gewonnenen Daten (siehe Abb. 3-31. und 3-34.). Ferner würde man beim Vergleich der absoluten Zellzahl von ipsi- und kontralateraler Seite einen höheren Wert auf der ipsilateralen Seite erwarten, jedoch sind keine Unterschiede festzustellen (siehe Abb. 3-32.). Begründen könnte man diesen Umstand ebenfalls damit, dass im Ergebnis mehr Il-6-negative Zellen in der Penumbra im Rahmen des Infarkts zu Grunde gegangen sind und sich die Werte beider Seiten annähern. Relativ gesehen, findet sich auf der kontralateralen Seite kein Unterschied zwischen allen Gruppen, was der oben beschriebenen Vorstellung entspricht (siehe Abb. 3-34.).

Ebenso zeigt der Vergleich der relativen Zellzahl zwischen beiden Seiten, dass ipsilateral prozentual mehr Zellen positiv für Il-6 sind. Innerhalb der Sham-Gruppe findet sich, wie anzunehmen war, kein Unterschied (siehe Abb. 3-35.). Während die Vorbehandlung mit einem RAS-blockierenden Medikament keinen Einfluss auf die absolute sowie relative Zellzahl Il-6-positiver Zellen hat, können für TNF- $\alpha$  andere Schlüsse gezogen werden. Zwar findet sich bei Betrachtung der absoluten Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen auf der ipsilateralen Seite analog zur Il-6-Auswertung ebenfalls kein Unterschied zwischen den Schlaganfallgruppen (siehe Abb. 3-37), berücksichtigt man jedoch die Gesamtzellzahl in der Penumbra, so zeigt sich zum einen, dass alle Schlaganfallgruppen im Vergleich zur Sham-Gruppe erhöhte relative Zellzahlen aufweisen und zum anderen, dass die Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination zu einer signifikanten Abnahme der TNF- $\alpha$ -positiven Zellen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe führte (siehe Abb. 3-41.). Die höheren Werte in allen Interventionsgruppen stehen in Einklang mit der Vorstellung, dass die TNF- $\alpha$ -Konzentration nach einem Schlaganfall steigt (33). Die niedrigeren Werte in der Telmisartan- bzw. Kombinationsgruppe scheinen mit der AT<sub>1</sub>-R.-blockierenden Wirkung zusammenzuhängen. Passend zu dieser Annahme ist die Tatsache, dass die Vorbehandlung mit einem ACE-Inhibitor keine diesbezügliche Wirkung erkennen lässt, wobei eine Tendenz auch in diesen Gruppen zu sehen ist. Kontralateral war sowohl die absolute, als auch die relative Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen betreffend kein Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen, was den Vorstellungen entspricht, dass die fehlende Ischämie auf der kontralateralen Seite zu keiner Veränderung führt (siehe Abb. 3-39. und 3-42.). Beim Vergleich zwischen beiden Seiten war ebenfalls kein Unterschied bezüglich der absoluten Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen festzustellen (siehe Abb. 3-40.). Wahrscheinlich beruht dieser Fakt wiederum auf der Annahme eines umfassenderen Zelluntergangs seitens der TNF- $\alpha$ -negativen Zellen. Untersucht man die relative Zellzahl beider Seiten fällt auf, dass innerhalb der Ramipril-Gruppe mit der höheren Dosierung ein signifikanter Unterschied fehlt, auch wenn eine Tendenz zu erkennen ist (siehe Abb. 3-43.). Ursächlich könnte die hohe Standardabweichung sein, die unter Verwendung einer höheren Anzahl von Tieren das Signifikanzniveau weniger beeinflussen könnte. Wie auch bei Il-6 besteht innerhalb der scheinoperierten Gruppe kein Unterschied, welcher auch nicht zu erwarten war.

Zusammenfassend zeigten sich auf mRNA-Ebene im Gebiet des Schlaganfalls und der Penumbra eine Abnahme der Il-6- und TNF- $\alpha$ -Expression unter der Vorbehandlung mit der Kombination sowie eine Abnahme der relativen Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen in der Penumbra nach Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination. Damit stehen die Daten teilweise in Einklang mit anderen Ergebnissen verschiedener Studien. Wie oben beschrieben, konnten viele Studien

ebenfalls zeigen, dass eine AT<sub>1</sub>-R.-Blockade zu einer Verminderung der TNF- $\alpha$ - sowie Il-6-Expression führt. Jedoch gibt es diesbezüglich kaum Daten für Telmisartan. Den oben genannten Studien entsprechend war in der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe die relative Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen in der Penumbra geringer, dagegen fehlt diese Beobachtung bei der Untersuchung von Il-6. Ferner überrascht es, dass die Genexpression der beiden Marker nur durch die Kombination und nicht durch Telmisartan allein verringert wurde. Ohne Hinterfragen der Ursachen könnte man schlussfolgern, dass Telmisartan allein seine Blutdruck-unabhängigen Wirkungen primär in der Penumbra entfaltet und nicht in der Schlaganfallregion allgemein, deren Fläche bei der Quantifizierung der mRNA ebenfalls mit einbezogen wurde. In diesem Areal scheint die RAS-Blockade durch die Kombinationsbehandlung hinsichtlich der Expression von TNF- $\alpha$  und Il-6 der alleinigen Telmisartan-Gabe überlegen zu sein. Daher ist anzunehmen, dass in dieser Schlaganfallregion die Stärke der RAS-Blockierung eine größere Rolle spielt, da diese in der Kombinationsgruppe stärker bzw. umfassender war und mit der AT<sub>1</sub>-R.-Blockade allein nicht zu erklären ist. Ursache des fehlenden Einflusses der AT<sub>1</sub>-R.-Blockierung auf die Zahl Il-6-positiver Zellen in der Penumbra bleibt spekulativ; so könnte die Dosierung für eine derartige Beeinflussung nicht hoch genug gewesen sein. Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen ergab keinen Unterschied zwischen der Telmisartan- und der Kombinationsbehandlung. Insofern ist es fraglich, dass die verminderte Expression der beiden proinflammatorischen Marker in der gesamten Schlaganfallregion einen großen Einfluss auf Infarkt volumina oder die neurologischen Defizite hat. Vielmehr scheint die Beeinflussung dieser Vorgänge in der Penumbra entscheidend.

Neben den proinflammatorischen Markern Il-6 und TNF- $\alpha$  wurde die Genexpression der neurotrophischen Faktoren BDNF und TrkB sowie die Zahl TrkB-positiver Zellen untersucht. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von BDNF in der akuten Phase nach einem Schlaganfall zu einer Verkleinerung des kortikalen Infarktvolumens führt (193, 245); die verzögerte Applikation dieses Neurotrophins vermittelt dagegen vor allem die Verbesserung sensorimotorischer Funktionen (245).

Da im Allgemeinen nach einer Ischämie neuronalen Gewebes eine Expressionssteigerung von Neurotrophinen beobachtet wird (246), stellt diese Reaktion des Körpers eine Form der endogenen Neuroprotektion dar. Viele Studien, die in Tiermodellen eine Steigerung der BDNF-Genexpression hervorriefen, konnten bisher nicht auf den Menschen übertragen werden. Denkbar wäre die periphere Applikation von BDNF im Rahmen einer zerebralen Ischämie, jedoch wird dies durch die schlechte Passage von BDNF durch die BBB sowie die kurze Halbwertszeit

von weniger als 10 min erschwert (247). Daher wäre ein weiterer Ansatz, die Bildung von endogenem BDNF durch Einsatz anderer Pharmaka zu erhöhen.

Studien, die den Einfluss des RAS auf die Bildung von Neurotrophinen beschreiben, wurden bislang kaum publiziert und sind überdies nicht widerspruchsfrei. Während man zeigen konnte, dass Ang II die Expression von BDNF in Zellen der Nebennierenrinde steigert (248) und die Konzentration von NGF erhöht (249), demnach durchaus neuroprotektive Eigenschaften vermitteln kann, ist die Datenlage hinsichtlich der ARBs uneindeutig. Beispielsweise führte Losartan in einer Studie zu einer Abnahme der NGF-Konzentration, welche zuvor durch mechanische Nervenverletzung erhöht wurde (250). Demgegenüber wurde nach Olmesartan eine verbesserte Regeneration des *Nervus ischiadicus* in diabetischen Ratten beobachtet, welche mit einer Expressionssteigerung von NT-3 verbunden war (251). Krikov *et al.* zeigten in einer Studie, dass die Vorbehandlung mit Candesartan in einem Schlaganfallmodell mit fokaler Ischämie der *A. cerebri media* zu einer Steigerung der TrkB-Genexpression und zu einer erhöhten Proteinsynthese von TrkB führt. Die BDNF-Expression blieb durch die Vorbehandlung unbeeinflusst (166).

In der vorliegenden Studie fanden sich auf Genexpressionsebene bei den Markern BDNF und TrkB keine Unterschiede zwischen allen Gruppen, d. h. die Vorbehandlung mit einem RAS-blockierenden Medikament, unabhängig von dessen Pharmakodynamik, hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentration (siehe Abb. 3-16. und 3-17.). Dass die BDNF-Expression durch die RAS-Blockade unbeeinflusst bleibt, wurde ebenso in der Studie von Krikov *et al.* beobachtet (166). Ferner war in jener Studie die BDNF-Expression in allen Interventions-Gruppen im Vergleich zur Sham-Gruppe größer. Aufgrund dessen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Daten für die Sham-Gruppe hinsichtlich der Expression erhoben wurden, kann ein Vergleich diesbezüglich nicht durchgeführt werden. Des Weiteren fand sich in jener Studie eine erhöhte TrkB-Expression nach der Candesartan-Vorbehandlung. Für Telmisartan konnte in der vorliegenden Arbeit keine Wirkung auf die TrkB-Expression gezeigt werden. Ursache dieser fehlenden Wirkung auf die Expression beider neurotrophischer Marker könnte wiederholt die stärkere Affinität Candesartans für den AT<sub>1</sub>-R. und somit eine stärkere Blockade des RAS auf Rezeptorebene sein.

Für TrkB wurden auch immunfluoreszenzzytochemische Untersuchungen vorgenommen. Betrachtet man die absolute Zahl TrkB-positiver Zellen fällt auf, dass alle Interventions-Gruppen eine geringere Zahl positiver Zellen im Vergleich zur Sham-Gruppe aufweisen. Darüber hinaus führte die Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination zu einer signifikanten Zunahme der Zahl positiver Zellen im Vergleich zur Vehikel-Behandlung (siehe Abb. 3-45.). Kontralateral

war kein Unterschied festzustellen (siehe Abb. 3-47.). Die Tatsache, dass in allen Schlaganfallgruppen eine verringerte Zahl TrkB-positiver Zellen zu finden war, ist überraschend und steht damit nicht in Einklang mit den Beobachtungen, dass eine zerebrale Ischämie mit einer Expressionssteigerung von neurotrophischen Faktoren verbunden ist. Eine mögliche Erklärung könnte der Zelluntergang in den Schlaganfallgruppen sein, woraus letztlich die geringere Zellzahl resultiert. Dennoch wird anhand der Daten ersichtlich, dass die Vorbehandlung mit Telmisartan sowie der Kombination gegenüber der Vehikel- und der beiden Ramipril-Behandlungen überlegen ist. Der fehlende Effekt auf der kontralateralen Seite lässt sich durch die fehlende Ischämie erklären. Vergleicht man beide Seiten miteinander, findet sich in der Sham-, Telmisartan- und der Behandlungsgruppe kein Unterschied, in den übrigen Gruppen dagegen ist kontralateral die absolute Zahl höher, was die positive Wirkung der Telmisartan- bzw. Kombinationsbehandlung unterstreicht (siehe Abb. 3-48.). Die Ergebnisse werden bei Hinzuziehen der Gesamtzellzahl noch deutlicher (siehe Abb. 3-49). So zeigen die Telmisartan- und die Kombinationsgruppe eine signifikant höhere relative Zahl TrkB-positiver Zellen sowohl im Vergleich zu Vehikel-, als auch zur Sham-Gruppe. Dagegen führte die Vorbehandlung mit einem Vehikel oder Ramipril zu einer signifikant niedrigeren relativen Zellzahl. Damit bestätigen diese Ergebnisse teilweise die Beobachtungen aus der Studie von Krikov *et al.*, in der gezeigt werden konnte, dass die Gabe eines AT<sub>1</sub>-Blockers zu einer Zunahme von TrkB führt, die Gabe eines ACE-Inhibitors dagegen keine zusätzliche Wirkung entfaltet. Allerdings bleibt es überraschend, dass trotz Hinzuziehens der Gesamtzellzahl in den nicht-AT<sub>1</sub>-R.-blockierenden Interventionsgruppen weiterhin kleinere Werte als in der Sham-Gruppe vorliegen. Wie zuvor beschrieben, könnte der höhere Zellverlust im Rahmen des Infarkts Ursache dessen sein. Kontralateral gab es wiederholt keine Unterschiede zwischen allen Gruppen (siehe Abb. 3-50.) Vergleicht man wiederum die ipsi- und kontralateralen Seiten miteinander, lässt sich ipsilateral eine signifikant höhere relative Zellzahl in der Telmisartan-Gruppe beobachten (siehe Abb. 3-51). Zwar weist auch die Kombinationsbehandlung eine derartige Tendenz auf, das Signifikanzniveau wird jedoch verfehlt. Wahrscheinlich würde dieser Umstand durch Verwendung einer höheren Fallzahl vermieden werden. Die Vorbehandlung mit dem Vehikel sowie der geringeren Ramipril-Dosierung ergaben für die ipsilaterale Seite signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur kontralateralen. Die gleiche Tendenz lässt sich auch für die höhere Ramipril-Dosis feststellen, aufgrund der höheren Standardabweichung ist diese nicht signifikant.

Zusammenfassend führte die Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination zu einer signifikanten Erhöhung sowohl der absoluten, als auch relativen Zahl TrkB-positiver Zellen in der periventrikulären Penumbra; beide Gruppen zeigten sich der Vorbehandlung mit einem Vehikel

und beiden Ramipril-Dosierungen diesbezüglich überlegen. Hinsichtlich der Genexpression von BDNF und TrkB im gesamten Schlaganfallgebiet ergab sich für keine der Vorbehandlungen ein Vorteil. Weshalb die immunfluoreszenzsytochemisch erhobenen Daten andere Effekte als auf Genexpressionsebene suggerieren, lässt sich vermutlich wie bei der Auswertung der proinflammatorischen Marker darauf zurückführen, dass die Expression nicht nur in der Penumbra, sondern im gesamten Infarktgebiet gemessen wurde. Die Überlegenheit seitens Telmisartan und der Kombination erklärt sich wahrscheinlich analog zu den *in-vivo*-Ergebnissen durch die vermehrte Aktivierung von AT<sub>2</sub>-R. in der Penumbra.

Durch die oben beschriebene Wirkung auf die TrkB-positiven Zellen kann man einen neuroprotektiven Effekt durch eine AT<sub>1</sub>-R.-Blockade postulieren. Als Korrelat dieser Neuroprotektion könnten die Zahl von Neuronen sowie die Gesamtzellzahl in der Penumbra dienen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhoben wurden. Dabei zeigte sich in der Penumbra in allen Interventionsgruppen eine signifikant niedrigere Zahl von Neuronen und Zellen im Allgemeinen (siehe Abb. 3-19. und 3-23.). In Beiden Untersuchungen führte die Vorbehandlung mit Telmisartan sowie der Kombination zu einer signifikanten Zunahme der Neuronen und der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. In den Gruppen mit dem ACE-Inhibitor Ramipril ließ sich dagegen kein Effekt nachweisen. In der kontralateralen periventrikulären Region war bezüglich der Gesamtzellzahl kein Unterschied zwischen allen Gruppen festzustellen (siehe Abb. 3-25). Unter der Vorstellung der fehlenden Ischämie auf der kontralateralen Seite war dieses Ergebnis zu erwarten. Ferner würde man bei dem Vergleich beider Seiten ipsilateral eine geringere Gesamtzellzahl als kontralateral erwarten; ausgenommen davon wäre die Sham-Gruppe, in der auf beiden Seiten gleich viele Zellen zu erwarten wären. Diese Annahme wird bei Betrachtung der Ergebnisse bestätigt (siehe Abb. 3-26.). Ein leicht verändertes Bild fand sich bei der Auswertung der Neuronenzahl auf der kontralateralen Seite (siehe Abb. 3-21.). Anders als bei der Gesamtzellzahl war die Zahl der Neuronen in der Vehikel- und beiden Ramipril-Gruppen signifikant niedriger als in der Sham-Gruppe. Eine solche Tendenz war auch in der Telmisartan- und der Kombinationsgruppe zu sehen, jedoch ohne Signifikanz. Daraus kann geschlossen werden, dass die Ischämie auch einen negativen Einfluss auf die kontralaterale Seite, zumindest auf die Zahl der Neuronen, hat und dieser durch die Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination abgeschwächt werden kann.

Zusammengenommen führte die Gabe von Telmisartan und der Kombination zu einem verminderten Zelluntergang in der periventrikulären Penumbra, sowohl die Neuronen betreffend, als auch alle Zellen zusammengenommen. Dieser Effekt könnte Korrelat der höheren Zahl TrkB-positiver Zellen in der Penumbra sein.

Alle Ergebnisse zusammengefasst, vermittelt die Vorbehandlung mit Telmisartan und der Kombination aus Telmisartan und Ramipril in subantihypertensiver Dosierung nach MCAO ein vermindertes relatives Infarktvolume, einen verbesserten neurologischen Status, eine Verhinderung eines Gewichtsverlusts, einen verminderten Untergang von Neuronen und allgemeinen Zellen in der periventriculären Penumbra, eine verringerte relative Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen und eine höhere absolute sowie relative Zahl TrkB-positiver Zellen in der Penumbra im Vergleich zu einer Vehikel-Behandlung. Dagegen ergaben sich für Ramipril in beiden Dosierungen diesbezüglich keine Effekte. Darüber hinaus war eine verminderte Genexpression von Il-6 und TNF- $\alpha$  in der Infarktregion innerhalb der Kombinationsgruppe festzustellen. Aus den genannten Punkten lässt sich demnach schlussfolgern, dass der direkte Vergleich zwischen dem ACE-Inhibitor Ramipril und dem ARB Telmisartan im Rahmen dieser Arbeit zugunsten des ARB ausfällt. So konnten Effekte gezeigt werden, die unabhängig von einer Blutdruck-Senkung die Folgen bzw. Schadenslast nach einem Schlaganfall beeinflussen. Des Weiteren ergab sich, dass die Kombination aus beiden Substanzen und die damit verbundene stärkere Blockierung des RAS keinen weiteren Vorteil gegenüber der alleinigen Medikation mit Telmisartan hervorbringt. Zwar fanden sich geringere Werte für die Expression proinflammatorischer Marker in der Schlaganfallregion, jedoch fehlt ein diesbezügliches Korrelat in den *in vivo*-Untersuchungen, welches für die Überlegenheit einer Kombinationsbehandlung sprechen könnte. Der direkte Vergleich zwischen beiden Substanzen sowie der Kombination erzeugte in den vergangenen Jahren großes Interesse. Grund war die lang angelegte ONTARGET-Studie, in der u. a. die Abhängigkeit der Schlaganfallinzidenz von der Behandlung mit Telmisartan, Ramipril und deren Kombination untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass Telmisartan dem ACE-Inhibitor bezüglich der Schlaganfallinzidenz nicht unterlegen war. Bis auf eine geringere Rate von Nebenwirkungen wie Husten und Angioödem innerhalb der Telmisartan-Gruppe war kein Unterschied im Vergleich zur Ramipril-Behandlung festzustellen. Zudem ergaben sich durch die Kombinationsbehandlung keine weiteren Vorteile. Stattdessen waren Nebenwirkungen wie Hypotonie häufiger zu beobachten als in den anderen Behandlungsgruppen (169). Obwohl in vielen tierexperimentellen Studien Hinweise auf eine bessere Wirksamkeit aufgrund Blutdruck-unabhängiger Wirkungen seitens der ARB gefunden wurden, blieb nach dieser Studie festzustellen, dass mit Hilfe von ARBs die Inzidenz des Schlaganfalls zwar in gleichem Maße wie mit ACE-Inhibitoren gesenkt werden kann, die ARBs jedoch keinen Vorteil hinsichtlich des Auftretens eines Infarkts bieten. Wie unter 1.5. beschrieben, konnten im Rahmen der ONTARGET-Studie keine Aussagen über den Schweregrad des neurologischen Schadens gemacht werden. So ist es durchaus vorstellbar, dass ARBs mittels Blutdruck-unabhängiger Effekte in der Penumbra, z. B. das Infarktvolume

oder die Regeneration nach einem Schlaganfall im Menschen günstig beeinflussen könnten. Die vorliegende Studie konnte anhand eines Tiermodells zeigen, dass der ARB Telmisartan im Gegensatz zum ACE-Inhibitor Ramipril in der Lage ist, durch Blutdruck-unabhängige Wirkungen das Infarktgeschehen günstig zu beeinflussen und das Infarktvolumen oder die neurologischen Defizite zu verringern. Dennoch bleiben viele Fragen unbeantwortet. Beispielsweise ist unklar, durch welchen Mechanismus Telmisartan seine neuroprotektiven Effekte vermittelt. Ein möglicher Mechanismus ist der, dass die Blockierung des AT<sub>1</sub>-R. selbst neuroprotektive Wirkungen entfalten kann oder eine Hemmung von Nervengewebe-schädigenden Prozessen bewirkt, die Ang II-vermittelt sind. Wie oben beschrieben, ist die vermehrte Aktivierung von AT<sub>2</sub>-R. ebenfalls ein denkbarer Signalweg. Dass durch diesen Rezeptor Effekte im Sinne einer Neuroprotektion vermittelt werden können, wurde in Studien bereits gezeigt (131, 159). Anhand der derzeitigen Datenlage ist die vermehrte Aktivierung des AT<sub>2</sub>-R. wahrscheinlicher für die Vermittlung neuroprotektiver Effekte durch ARBs verantwortlich als die AT<sub>1</sub>-R.-Blockade. Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch die Blockierung des AT<sub>2</sub>-R. die schützende Wirkung von ARBs aufgehoben wird (131), zum anderen führte die direkte Aktivierung des AT<sub>2</sub>-R. durch einen Agonisten zu einer Neuroprotektion im Tiermodell des Schlaganfalls (164). Durch neuere Erkenntnisse über die Physiologie und Funktion des RAS sind weitere Wege denkbar, die zu einer Neuroprotektion führen könnten. So könnte die unter einer AT<sub>1</sub>-R.-blockierenden Therapie resultierende, erhöhte Konzentration von Ang II zu einer vermehrten Konversion dieses Moleküls zu Ang<sup>1-7</sup> durch das ACE 2 führen. In der Folge käme es zu einer verstärkten Aktivierung des Mas-R.. Studien konnten bereits zeigen, dass Ang<sup>1-7</sup> im Rahmen einer Ischämie zu einer Verbesserung der zerebralen Perfusion führt und auf diesem Weg eine protektive Funktion ausüben kann (136). Wie unter 1.2.4. beschrieben besitzt Telmisartan die Fähigkeit agonistische Wirkungen am PPAR- $\gamma$ -Rezeptor hervorzurufen (148, 149). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Thiazolidindionen wie Pioglitazon und Rosiglitazon im Rahmen einer fokalen zerebralen Ischämie zu einem verminderten Infarktvolumen und einem verminderten neurologischen Defizit führt. Damit verbunden waren u. a. eine verbesserte Endothel-vermittelte Relaxation von Blutgefäßen, eine Verminderung von oxidativem Stress sowie eine verringerte Expression von VCAM-1, ICAM-1, iNOS und MMP-9. Zudem waren ebenso nach einer Vorbehandlung mit einem PPAR- $\gamma$ -Agonisten verminderte Infarktvolumina und raschere Erholungen von der Ischämie festzustellen. Gestützt werden diese Beobachtungen durch Studien, die belegen, dass diese neuroprotektiven Wirkungen durch Applikation eines PPAR- $\gamma$ -Antagonisten aufgehoben werden (252). Auch eine Interferenz von PPAR- $\gamma$ -Agonisten mit Ca<sup>2+</sup>-Kanälen wird als beteiligter Mechanismus angenommen (253).

Um die genauen Mechanismen letztlich aufklären zu können, müssten weitere Studien durchgeführt werden bzw. die vorliegende Studie durch weitere Aspekte erweitert werden. Beispielsweise könnte man einen AT<sub>2</sub>-R.-Antagonisten zusammen mit Telmisartan applizieren, um die Beteiligung des AT<sub>2</sub>-R. zu verifizieren. Ferner könnte man Antagonisten von Ang<sup>1-7</sup> oder des PPAR- $\gamma$ -Rezeptors nutzen, um die möglichen, zuvor beschriebenen Signalwege zu untersuchen. Des Weiteren wäre es interessant, ob auch andere ARBs die Fähigkeit besitzen, Blutdruck-unabhängige neuroprotektive Wirkungen im Rahmen von fokalen zerebralen Ischämien zu entfalten.

Die wichtigste ungeklärte Frage bleibt jedoch die, ob die hier beobachteten Effekte auf den Menschen übertragbar sind und in ähnlicher Art und Weise zu einer Verbesserung der Prognose von Schlaganfallpatienten beitragen können. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es weiterer klinischer Studien, welche die Patienten auch nach Erleiden des Schlaganfalls untersuchen. Zudem sollte geklärt werden, ob diese Effekte die Langzeitprognose von Patienten verbessern können oder, ob es sich lediglich um eine kurzzeitige Verbesserung in der akuten Phase des Schlaganfalls handelt.

Würden in Langzeitstudien derart positive Effekte, wie in dieser Arbeit beschrieben, bestätigt werden, könnte die Prognose von Schlaganfallpatienten verbessert, die Lebensqualität erhöht und darüber hinaus die Kosten des Gesundheitssystems, insbesondere für Rehabilitations- und Pflegemaßnahmen verringert werden.

### 5. Zusammenfassung

Weltweit sind 10 % aller Todesfälle auf einen Schlaganfall zurückzuführen, zusätzlich sind für die Folgen der überlebten Schlaganfälle 2-4 % aller Gesundheitskosten aufzubringen. Somit spielt der Schlaganfall nicht nur gesundheitlich, sondern auch sozioökonomisch gesehen eine wichtige Rolle im heutigen Gesundheitssystem. Daher wird der Therapie und der Prävention zerebrovaskulärer Ereignisse besondere Bedeutung zugesprochen. Viele Studien belegen, dass mit Hilfe der Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems mit ACE-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockern die Inzidenz von Schlaganfällen verringert werden kann. Darüber hinaus zeigen Tiermodellstudien, dass vor allem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Blutdruck-unabhängige, neuroprotektive Wirkungen vermitteln, welche die Schlaganfallpathophysiologie, insbesondere die Vorgänge im Rahmen der Ischämie, beeinflussen können. Unter dieser Vorstellung könnte die Therapie im Rahmen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker der Therapie mit einem ACE-Inhibitor hinsichtlich der Schlaganfallfolgen überlegen sein. Zudem könnte eine umfassendere Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems durch die Kombination aus beiden Substanzen mit zusätzlichen positiven Effekten verbunden sein.

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals mit Hilfe eines Schlaganfallmodells der Ratte, inwieweit eine Vorbehandlung mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Telmisartan, dem ACE-Inhibitor Ramipril und deren Kombination das Ausmaß des neurologischen Schadens nach fokaler zerebraler Ischämie durch Blutdruck-unabhängige Wirkungen beeinflusst.

Dazu wurden männliche, normotensive Wistar-Ratten für die Dauer von 5 Tagen mit einer subantihypertensiven, aber dennoch das Renin-Angiotensin-System-blockierenden Dosis von Ramipril, Telmisartan sowie deren Kombination behandelt. Anschließend erfolgte die Schlaganfallsimulation durch einen temporären Verschluss der *A. cerebri media*. In den folgenden 2 Tagen wurden die klinisch fassbaren, neurologischen Defizite ermittelt und danach die Schlaganfallvolumina mittels Magnet-Resonanz-Tomografie berechnet. Für die weitere Einschätzung des neurologischen Schadens wurden die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und neuroprotektiver Faktoren sowie diesbezügliche immunfluoreszenzzytochemisch sichtbare Veränderungen herangezogen.

Im Vergleich zur Behandlung mit einem Vehikel vermittelten die Vorbehandlungen mit Telmisartan und der Kombination aus Telmisartan und Ramipril in subantihypertensiver Dosierung nach der Schlaganfallsimulation ein vermindertes, auf das Körpergewicht bezogenes Infarkt-volumen, eine Verminderung neurologischer Defizite, die Verhinderung eines Gewichtsverlusts, einen verminderten Untergang von Neuronen und der allgemeinen Zellpopulation in der

periventrikulären Penumbra, eine verringerte relative Zahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen und eine höhere absolute sowie relative Zahl TrkB-positiver Zellen in der Penumbra. Dagegen ergaben sich für Ramipril diesbezüglich keine Effekte. Schlussfolgernd zeigten sich die Vorbehandlungen mit Telmisartan sowie der Kombination aus Telmisartan und Ramipril gegenüber der Behandlung mit einem Vehikel sowie mit Ramipril hinsichtlich der untersuchten Parameter überlegen. Ferner fand sich kein zusätzlicher Nutzen einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Telmisartan.

### 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Schematische Darstellung der heutigen Ansicht des RAS modifiziert nach Fyhrquist und Saijonmaa (92)	14
Abbildung 1-2. Übersicht über die Rezeptor-vermittelten Wirkungen der Effektoren des RAS; modifiziert nach Fyhrquist und Saijonmaa (92)	18
Abbildung 2-1. Studiendesgin-Behandlungsgruppen	43
Abbildung 2-2. Studiendesign-zeitlicher Ablauf der Hauptstudie	43
Abbildung 2-3. Repräsentative MRT-Aufnahme eines infarzierten Gehirns	56
Abbildung 3-1. Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Ang I (n = 7 pro Gruppe) und Ang II (n = 7); Angabe in mmHg; *p < 0,05 vs. Ang II 50 ng/kg	57
Abbildung 3-2. Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Telmisartan (n = 5 pro Gruppe) und 0,9 % NaCl (n = 5) vor Applikation von 50 ng/kg KG Ang II	58
Abbildung 3-3. Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe verschiedener Dosen von Ramipril (n = 6 pro Gruppe) und 0,9 % NaCl (n = 7) vor Applikation von 150 ng/kg KG Ang I	59
Abbildung 3-4. Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von Ang I + 0,9 % NaCl (n = 6), Ang II + 0,9 % NaCl (n = 5), Ang I + 0,5 mg/kg KG Telmisartan + 0,01 mg/kg KG Ramipril (n = 4) und Ang II + 0,5 mg/kg KG Telmisartan + 0,01 mg/kg KG Ramipril (n = 4)	60
Abbildung 3-5. Grafische Darstellung der Änderung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von Ang I + 0,9 % NaCl (n = 4), Ang I + Ramipril 0,01 mg/kg/d (n = 3), Ang II + 0,9 % NaCl (n = 4) und Ang II + Telmisartan 0,5 mg/kg/d (n = 4)	61
Abbildung 3-6. Grafische Darstellung des MAP zu verschiedenen Zeitpunkten der Schlaganfallsimulation	62
Abbildung 3-7. repräsentative Aufnahmen einer MR-Angiografie vor, während und nach MCAO	63
Abbildung 3-8. Grafische Darstellung des zerebralen Blutflusses vor, während und nach MCAO	64
Abbildung 3-9. Grafische Darstellung der Körpergewichtsveränderung nach MCAO	66
Abbildung 3-10. repräsentative Aufnahmen eines MRT des Kopfes bei Ratten mit MCAO-Eingriff (links) und einer Scheinoperation (rechts)	67

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 3-11. Grafische Darstellung der absoluten Infarkt volumina nach MCAO _____	67
Abbildung 3-12. Grafische Darstellung der relativen Infarkt volumina bezogen auf das Körpergewicht nach MCAO _____	68
Abbildung 3-13. Grafische Darstellung der Mittelwerte der neurologischen Bewertungsskala 24 und 48 h nach MCAO _____	69
Abbildung 3-14. Grafische Darstellung der relativen Genexpression von Il-6, normalisiert auf 18 S-rRNA _____	70
Abbildung 3-15. Grafische Darstellung der relativen Genexpression von TNF- $\alpha$ , normalisiert auf 18 S-rRNA _____	71
Abbildung 3-16. Grafische Darstellung der relativen Genexpression von BDNF, normalisiert auf 18 S-rRNA _____	71
Abbildung 3-17. Grafische Darstellung der relativen Genexpression von TrkB, normalisiert auf 18 S-rRNA _____	72
Abbildung 3-18. repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Nissl-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung ____	74
Abbildung 3-19. Grafische Darstellung der Anzahl Nissl-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung _____	74
Abbildung 3-20. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nissl-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung _____	75
Abbildung 3-21. Grafische Darstellung der Anzahl Nissl-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 10-facher Vergrößerung _____	76
Abbildung 3-22. repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DAPI-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung ____	77
Abbildung 3-23. Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	78
Abbildung 3-24. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DAPI-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung_	79
Abbildung 3-25. Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	80
Abbildung 3-26. Grafische Darstellung der Anzahl DAPI-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsi- vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	80
Abbildung 3-27. Repräsentativer Ausschnitt einer Negativkontrolle _____	81

Abbildung 3-28. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten Il-6-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	82
Abbildung 3-29. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	83
Abbildung 3-30. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten Il-6-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	84
Abbildung 3-31. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	85
Abbildung 3-32. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsi-vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	85
Abbildung 3-33. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	86
Abbildung 3-34. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	87
Abbildung 3-35. Grafische Darstellung der Anzahl Il-6-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsi-vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	88
Abbildung 3-36. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TNF- $\alpha$ -Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	89
Abbildung 3-37. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	90
Abbildung 3-38. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TNF- $\alpha$ -Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	91
Abbildung 3-39. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	92
Abbildung 3-40. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsi-vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	92
Abbildung 3-41. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	93
Abbildung 3-42. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung _____	94

Abbildung 3-43. Grafische Darstellung der Anzahl TNF- $\alpha$ -positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsi-vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	95
Abbildung 3-44. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TrkB-Färbung der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	96
Abbildung 3-45. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	97
Abbildung 3-46. Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Antikörper vermittelten TrkB-Färbung der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	98
Abbildung 3-47. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	99
Abbildung 3-48. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen pro mm <sup>2</sup> in der ipsi-vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	99
Abbildung 3-49. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	100
Abbildung 3-50. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsilateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	101
Abbildung 3-51. Grafische Darstellung der Anzahl TrkB-positiver Zellen / Gesamtzellzahl pro mm <sup>2</sup> in der ipsi- vs. kontralateralen periventriculären Region in 20-facher Vergrößerung	102

---

### 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Übersicht der verwendeten allgemeinen Chemikalien _____	34
Tabelle 2-2. Übersicht der verwendeten Chemikalien für die <i>in vivo</i> -Versuche _____	35
Tabelle 2-3. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen für die Nukleotidanalytik _____	35
Tabelle 2-4. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen für die Immunfluoreszenzzytochemie _____	36
Tabelle 2-5. Zusammensetzung des <i>SYBR Green<sup>®</sup> Housemix</i> ‘ (10 ml) _____	36
Tabelle 2-6. Übersicht der verwendeten Primer _____	37
Tabelle 2-7. Übersicht der verwendeten Enzyme _____	37
Tabelle 2-8. Übersicht der verwendeten Antikörper _____	38
Tabelle 2-9. Übersicht der verwendeten Materialien für die <i>in vivo</i> -Versuche _____	38
Tabelle 2-10. Übersicht der verwendeten Materialien für die Nuekleotidanalytik _____	39
Tabelle 2-11. Übersicht der verwendeten Materialien für die in Immunfluoreszenzzytochemie _____	39
Tabelle 2-12. Übersicht der sonstigen verwendeten Materialien _____	39
Tabelle 2-13. Übersicht der allgemein verwendeten Geräte _____	40
Tabelle 2-14. Übersicht der verwendeten Geräte für die <i>in vivo</i> -Versuche _____	40
Tabelle 2-15. Übersicht der verwendeten Geräte für die Nukleotidanalytik _____	41
Tabelle 2-16. Übersicht der verwendeten Geräte für die Immunfluoreszenzzytochemie _____	41
Tabelle 2-17. Bedeutung der im Rahmen der neurologischen Untersuchung erhobenen Punktwerte _____	48
Tabelle 3-1. Übersicht über die blutgasanalytisch erhobenen Parameter innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen _____	65

### 8. Literaturverzeichnis

1. Gurdjian ES, Gurdjian ES. History of occlusive cerebrovascular disease I. from Wepfer to Moniz. *Arch. Neurol* 1979 Juni;36(6):340-343.
2. Eschenfelder CC, Zeller JA, Stingle R. [Stroke: causes and classification]. *Hamostaseologie* 2006 Nov;26(4):298-308.
3. Fisher M. Stroke and TIA: epidemiology, risk factors, and the need for early intervention. *Am J Manag Care* 2008 Juni;14(6 Suppl 2):S204-211.
4. Ustrell-Roig X, Serena-Leal J. [Stroke. Diagnosis and therapeutic management of cerebrovascular disease]. *Rev Esp Cardiol* 2007 Juli;60(7):753-769.
5. Maher P, Salgado KF, Zivin JA, Lapchak PA. A novel approach to screening for new neuroprotective compounds for the treatment of stroke. *Brain Res* 2007 Okt;1173:117-125.
6. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009;7:97.
7. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc. Dis* 2008;25(5):457-507.
8. Diener H, Weimar C. Diagnose und Therapie der Schlaganfallbehandlung in Deutschland. *Dtsch Arztebl* 2003; 100:A 2576–2582
9. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008 Mai;371(9624):1612-1623.
10. Rothwell PM. Incidence, risk factors and prognosis of stroke and TIA: the need for high-quality, large-scale epidemiological studies and meta-analyses. *Cerebrovasc. Dis* 2003;16 Suppl 3:2-10.
11. Diener H, Weimar C. Update of secondary stroke prevention. *Nephrol. Dial. Transplant* 2009 Juni;24(6):1718-1724.
12. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002 Aug;33(8):2123-2136.
13. Lüders S, Schrader J. [Prevention of stroke: What is evidence based?]. *Internist (Berl)* 2009 Dez;50(12):1337-1344.
14. Rundek T, Sacco RL. Risk factor management to prevent first stroke. *Neurol Clin* 2008 Nov;26(4):1007-1045, ix.
15. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002 Juli;288(3):321-333.

16. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002 Juli;288(1):49-57.
17. Gabriel SR, Carmona L, Roque M, Sánchez GLM, Bonfill X. Hormone replacement therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(2):CD002229.
18. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ* 1989 März;298(6676):789-794.
19. Bonita R, Duncan J, Truelsen T, Jackson RT, Beaglehole R. Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. *Tob Control* 1999;8(2):156-160.
20. Reynolds K, Lewis B, Nolen JDL, Kinney GL, Sathya B, He J, Lewis BL. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2003 Feb;289(5):579-588.
21. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, et al. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch. Intern. Med* 2002 Dez;162(22):2557-2562.
22. Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, et al. Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation* 2005 Apr;111(15):1992-1998.
23. Leppälä JM, Virtamo J, Fogelholm R, Albanes D, Heinonen OP. Different risk factors for different stroke subtypes: association of blood pressure, cholesterol, and antioxidants. *Stroke* 1999 Dez;30(12):2535-2540.
24. Lüders S. Drug therapy for the secondary prevention of stroke in hypertensive patients: current issues and options. *Drugs* 2007;67(7):955-963.
25. Marniemi J, Alanen E, Impivaara O, et al. Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005 Juni;15(3):188-197.
26. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002 Okt;288(16):2015-2022.
27. Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke* 2003 Okt;34(10):2475-2481.
28. Joshipura KJ, Ascherio A, Manson JE, et al. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* 1999 Okt;282(13):1233-1239.
29. Streifler JY. Early stroke risk after a transient ischemic attack: can it be minimized? *Stroke* 2008 Juni;39(6):1655-1656.
30. Amarenco P, Benavente O. EXPRESS transient ischemic attack study: speed the process! *Stroke* 2008 Aug;39(8):2400-2401.
31. Sacco RL. Risk factors for TIA and TIA as a risk factor for stroke. *Neurology* 2004

- Apr;62(8 Suppl 6):S7-11.
32. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008 Sep;55(3):310-318.
  33. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis, *Pathophysiology* (2010), doi:10.1016/j.pathophys.2009.12.001.
  34. Hossmann K. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol* 2006 Nov;26(7-8):1057-1083.
  35. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981 Dez;12(6):723-725.
  36. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004 Dez;19(3-4):151-167.
  37. Stingele R, Eschenfelder CC, Zeller J. [Therapy of acute stroke]. *Hamostaseologie* 2006 Nov;26(4):316-325.
  38. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N. Engl. J. Med* 1995 Dez;333(24):1581-1587.
  39. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* 1999 Dez;282(21):2019-2026.
  40. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995 Okt;274(13):1017-1025.
  41. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 1998 Okt;352(9136):1245-1251.
  42. Gardell SJ, Ramjit DR, Stabilito II, et al. Effective thrombolysis without marked plasminemia after bolus intravenous administration of vampire bat salivary plasminogen activator in rabbits. *Circulation* 1991 Juli;84(1):244-253.
  43. Ernst R, Pancioli A, Tomsick T, et al. Combined intravenous and intra-arterial recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. *Stroke* 2000 Nov;31(11):2552-2557.
  44. Seitz RJ, Hamzavi M, Junghans U, Ringleb PA, Schranz C, Siebler M. Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations. *Stroke* 2003 Aug;34(8):1932-1935.

45. Straub S, Junghans U, Jovanovic V, Wittsack HJ, Seitz RJ, Siebler M. Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004 März;35(3):705-709.
46. Sehgal CM, Leveen RF, Shlansky-Goldberg RD. Ultrasound-assisted thrombolysis. *Invest Radiol* 1993 Okt;28(10):939-943.
47. Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Wirth S, Hennerici M. Potential use of therapeutic ultrasound in ischemic stroke treatment. *Echocardiography* 2001 Apr;18(3):259-263.
48. Molina CA, Ribo M, Rubiera M, et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2006 Feb;37(2):425-429.
49. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008 Sep;55(3):363-389.
50. Bruno A, Levine SR, Frankel MR, et al. Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Neurology* 2002 Sep;59(5):669-674.
51. Weir CJ, Murray GD, Dyker AG, Lees KR. Is hyperglycaemia an independent predictor of poor outcome after acute stroke? Results of a long-term follow up study. *BMJ* 1997 Mai;314(7090):1303-1306.
52. Reith J, Jørgensen HS, Pedersen PM, et al. Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet* 1996 Feb;347(8999):422-425.
53. Toni D, Chamorro A, Kaste M, Lees K, Wahlgren NG, Hacke W. Acute treatment of ischaemic stroke. European Stroke Initiative. *Cerebrovasc. Dis* 2004;17 Suppl 2:30-46.
54. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet* 2000 Dez;356(9246):1955-1964.
55. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997 Sep;350(9080):757-764.
56. Gueyffier F, Bulpitt C, Boissel JP, et al. Antihypertensive drugs in very old people: a subgroup meta-analysis of randomised controlled trials. INDANA Group. *Lancet* 1999 März;353(9155):793-796.
57. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 1999 Juni;281(21):2005-2012.
58. Mancia G. Optimal control of blood pressure in patients with diabetes reduces the incidence

- of macro and microvascular events. *J. Hypertens* 2007 Juni;25 Suppl 1:S7-12.
59. Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul P. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 2004 Dez;35(12):2902-2909.
  60. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002 Juli;360(9326):7-22.
  61. Curioni C, André C, Veras R. Weight reduction for primary prevention of stroke in adults with overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(4):CD006062.
  62. Hsia J, Heiss G, Ren H, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007 Feb;115(7):846-854.
  63. Ridker PM, Cook NR, Lee I, et al. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med* 2005 März;352(13):1293-1304.
  64. Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G, Brown DL. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006 Jan;295(3):306-313.
  65. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann. Intern. Med* 2007 Juni;146(12):857-867.
  66. Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, et al. ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 2001 Okt;104(17):2118-2150.
  67. Chambers BR, Donnan GA. Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD001923.
  68. Halliday A, Mansfield A, Marro J, et al. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Mai;363(9420):1491-1502.
  69. Post-stroke antihypertensive treatment study. A preliminary result. PATS Collaborating Group. *Chin. Med. J* 1995 Sep;108(9):710-717.
  70. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med* 2000 Jan;342(3):145-153.

71. Bosch J, Yusuf S, Pogue J, et al. Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *BMJ* 2002 März;324(7339):699-702.
72. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001 Sep;358(9287):1033-1041.
73. Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, et al. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke* 2005 Juni;36(6):1218-1226.
74. Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, et al. The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke* 2003 Juli;34(7):1699-1703.
75. Yusuf S, Diener H, Sacco RL, et al. Telmisartan to prevent recurrent stroke and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med* 2008 Sep;359(12):1225-1237.
76. Wilcox R, Bousser M, Betteridge DJ, et al. Effects of pioglitazone in patients with type 2 diabetes with or without previous stroke: results from PROactive (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events 04). *Stroke* 2007 März;38(3):865-873.
77. Algra A, van Gijn J. Aspirin at any dose above 30 mg offers only modest protection after cerebral ischaemia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* 1996 Feb;60(2):197-199.
78. A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. The Dutch TIA Trial Study Group. *N. Engl. J. Med* 1991 Okt;325(18):1261-1266.
79. Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* 1991 Dez;54(12):1044-1054.
80. Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, Steinhubl SR. Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *JAMA* 2007 Mai;297(18):2018-2024.
81. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996 Nov;348(9038):1329-1339.
82. Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J. Neurol. Sci* 1996 Nov;143(1-2):1-13.
83. Costa J, Ferro JM, Matias-Guiu J, Alvarez-Sabin J, Torres F. Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(3):CD004296.
84. Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischaemic attack or minor stroke. EAFT (European Atrial Fibrillation Trial) Study Group. *Lancet* 1993 Nov;342(8882):1255-1262.

85. Endarterectomy for moderate symptomatic carotid stenosis: interim results from the MRC European Carotid Surgery Trial. *Lancet* 1996 Juni;347(9015):1591-1593.
86. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N. Engl. J. Med* 1991 Aug;325(7):445-453.
87. Kastrup A, Gröschel K. Carotid endarterectomy versus carotid stenting: an updated review of randomized trials and subgroup analyses. *Acta Chir. Belg* 2007 Apr;107(2):119-128.
88. Tigerstedt R, Bergman P.G. Niere und Kreislauf. *Skand. Arch. Physiol* 1898;(8):223–271.
89. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol. (Lond.)* 1940 Juli;98(3):283-298.
90. Page IH, Helmer OM. A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *J. Exp. Med* 1940 Jan;71(1):29-42.
91. SKEGGS LT, MARSH WH, KAHN JR, SHUMWAY NP. The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med* 1954 März;99(3):275-282.
92. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J. Intern. Med* 2008 Sep;264(3):224-236.
93. Steckelings UM, Unger T. The renin-angiotensin-aldosterone system. In: Mancia G, Grassi G, Kjeldsen S, eds. *Manual of Hypertension of the European Society of Hypertension*. London, U.K.: informa healthcare 2008;;110-116.
94. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev* 2000 Dez;52(4):639-672.
95. Lohmeier TE, Reinhart GA, Mizelle HL, et al. Influence of the renal nerves on sodium excretion during progressive reductions in cardiac output. *Am. J. Physiol* 1995 Sep;269(3 Pt 2):R678-690.
96. Barbry P, Hofman P. Molecular biology of Na<sup>+</sup> absorption. *Am. J. Physiol* 1997 Sep;273(3 Pt 1):G571-585.
97. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol* 2009 Dez;23(6):693-703.
98. Streeten DH, Anderson GH. Secondary hypertension. An overview of its causes and management. *Drugs* 1992 Juni;43(6):805-819.
99. Laragh JH, Lewis K. Dahl Memorial Lecture. The renin system and four lines fo hypertension research. Nephron heterogeneity, the calcium connection, the prorenin vasodilator limb, and plasma renin and heart attack. *Hypertension* 1992 Sep;20(3):267-279.

100. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res* 2000 Sep;87(5):E1-9.
101. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem* 2000 Okt;275(43):33238-33243.
102. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med* 2005 Aug;11(8):875-879.
103. De Mello WC. Cardiac intracrine renin angiotensin system. Part of genetic reprogramming? *Regul. Pept* 2006 Jan;133(1-3):10-12.
104. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev* 2000 Sep;52(3):415-472.
105. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens* 2000 Jan;13(1 Pt 2):31S-38S.
106. Matsubara H, Sugaya T, Murasawa S, et al. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron* 1998 Sep;80(1):25-34.
107. Ahmed A, Li XF, Shams M, et al. Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. *J. Clin. Invest* 1995 Aug;96(2):848-857.
108. Bullock GR, Steyaert I, Bilbe G, et al. Distribution of type-1 and type-2 angiotensin receptors in the normal human lung and in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histochem. Cell Biol* 2001 Feb;115(2):117-124.
109. Leung PS, Yao XQ, Chan HC, Fu LX, Wong PY. Differential gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the epididymides of mature and immature rats. *Life Sci* 1998;62(5):461-468.
110. Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 2001 Mai;54(5):627-632.
111. Bucher M, Ittner KP, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension* 2001 Aug;38(2):177-182.
112. Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Seifert K, Bravo R, Unger T. Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience* 1995 März;65(1):93-99.
113. Blume A, Lebrun CJ, Herdegen T, et al. Increased brain transcription factor expression by

- angiotensin in genetic hypertension. *Hypertension* 1997 Feb;29(2):592-598.
114. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res* 1994 Juni;74(6):1141-1148.
115. Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kübler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1999 Juli;19(7):1623-1629.
116. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev* 2000 März;52(1):11-34.
117. Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997 Juni;94(12):6391-6396.
118. Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 2000 Juli;58(1):251-259.
119. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 2003;12(2):70-88.
120. Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 1997 Jan;6(1):88-105.
121. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 1998 Jan;31(1 Pt 2):152-161.
122. Blume A, Kaschina E, Unger T. Angiotensin II type 2 receptors: signalling and pathophysiological role. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2001 März;10(2):239-246.
123. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 1997 Okt;18(4):383-439.
124. Huang XC, Summers C, Richards EM. Angiotensin II stimulates protein phosphatase 2A activity in cultured neuronal cells via type 2 receptors in a pertussis toxin sensitive fashion. *Adv. Exp. Med. Biol* 1996;396:209-215.
125. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr. Res* 1998 Nov;24(3-4):307-314.
126. Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J* 1997 Juli;325 ( Pt 2):449-454.

127. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005 Aug;26(8):1401-1409.
128. Gallinat S, Busche S, Schütze S, Krönke M, Unger T. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett* 1999 Jan;443(1):75-79.
129. Sosa-Canache B, Cierco M, Gutierrez CI, Israel A. Role of bradykinins and nitric oxide in the AT2 receptor-mediated hypotension. *J Hum Hypertens* 2000 Apr;14 Suppl 1:S40-46.
130. Stoll M, Hahn AWA, Jonas U, et al. Identification of a zinc finger homoeodomain enhancer protein after AT(2) receptor stimulation by differential mRNA display. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2002 Feb;22(2):231-237.
131. Li J, Culman J, Hörtnagl H, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005 Apr;19(6):617-619.
132. Vanderheyden PML. From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Mol. Cell. Endocrinol* 2009 Apr;302(2):159-166.
133. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens. Res* 2009 Juli;32(7):533-536.
134. Nguyen G. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2007 März;16(2):129-133.
135. Ganten D, Minnich JL, Granger P, et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 1971 Juli;173(991):64-65.
136. Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J. Mol. Med* 2008 Juni;86(6):715-722.
137. Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens* 2002 Aug;16 Suppl 3:S64-70.
138. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev* 1992 Mai;13(2):329-380.
139. Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J. Neurochem* 2008 Dez;107(6):1482-1494.
140. Unger T, Jakobsen A, Heroys J, Ralph A, Rees T, Shaw M. Targeting cardiovascular protection: the concept of dual renin-angiotensin system control. *Medscape J Med* 2008;10 Suppl:S4.
141. Chung O, Unger T. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. *Am. J. Hypertens* 1999 Dez;12(12 Pt 1-2):150S-156S.
142. Unger T, Schupp M. Telmisartan: from lowering blood pressure to end-organ protection. *Future Cardiol* 2005 Jan;1(1):7-15.

143. Schieffer B, Bünte C, Witte J, et al. Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol* 2004 Juli;44(2):362-368.
144. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med* 2001 Sep;345(12):861-869.
145. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med* 2001 Sep;345(12):851-860.
146. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002 März;359(9311):995-1003.
147. Elliott WJ, Meyer PM. Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis. *Lancet* 2007 Jan;369(9557):201-207.
148. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 2004 Mai;109(17):2054-2057.
149. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, et al. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* 2005 Juli;46(1):137-143.
150. Krum H, Carson P, Farsang C, et al. Effect of valsartan added to background ACE inhibitor therapy in patients with heart failure: results from Val-HeFT. *Eur. J. Heart Fail* 2004 Dez;6(7):937-945.
151. Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(5):971-981.
152. Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E. Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. *Hypertension* 2003 Dez;42(6):1137-1143.
153. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 2005 März;111(8):1012-1018.
154. Uresin Y, Taylor AA, Kilo C, et al. Efficacy and safety of the direct renin inhibitor aliskiren and ramipril alone or in combination in patients with diabetes and hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007 Dez;8(4):190-198.
155. Andersen K, Weinberger MH, Egan B, et al. Comparative efficacy and safety of aliskiren, an oral direct renin inhibitor, and ramipril in hypertension: a 6-month, randomized, double-blind trial. *J. Hypertens* 2008 März;26(3):589-599.

156. Oparil S, Yarows SA, Patel S, Fang H, Zhang J, Satlin A. Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2007 Juli;370(9583):221-229.
157. Strasser RH, Puig JG, Farsang C, Croket M, Li J, van Ingen H. A comparison of the tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren and lisinopril in patients with severe hypertension. *J Hum Hypertens* 2007 Okt;21(10):780-787.
158. Villamil A, Chrysant SG, Calhoun D, et al. Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. *J Hypertens* 2007 Jan;25(1):217-226.
159. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, et al. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation," *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, vol. 11, März. 2010, S. 67-73.
160. Schrader J, Kulschewski A, Dendorfer A. Inhibition of the renin-angiotensin system and the prevention of stroke. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007;7(1):25-37.
161. Walther T, Olah L, Harms C, et al. Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II. *FASEB J* 2002 Feb;16(2):169-176.
162. Iwai M, Liu H, Chen R, et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004 Aug;110(7):843-848.
163. Lou M, Blume A, Zhao Y, et al. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2004 Mai;24(5):536-547.
164. McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, Widdop RE. Angiotensin AT2 receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke* 2009 Apr;40(4):1482-1489.
165. Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J* 2003 Nov;17(14):2094-2096.
166. Krikov M, Thone-Reineke C, Müller S, Villringer A, Unger T. Candesartan but not ramipril pretreatment improves outcome after stroke and stimulates neurotrophin BDNF/TrkB system in rats. *J. Hypertens* 2008 März;26(3):544-552.
167. Dahlöf B, Sever PS, Poulter NR, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005 Sep;366(9489):895-906.
168. Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, et al. Outcomes in hypertensive patients at high

- cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 2004 Juni;363(9426):2022-2031.
169. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N. Engl. J. Med* 2008 Apr;358(15):1547-1559.
170. Yusuf S, Teo K, Anderson C, et al. Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008 Sep;372(9644):1174-1183.
171. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci* 2001 Jan;2(1):24-32.
172. Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol* 2008 März;153 Suppl 1:S310-324.
173. LEVI-MONTALCINI R, HAMBURGER V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool* 1951 März;116(2):321-361.
174. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982;1(5):549-553.
175. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990 März;247(4949 Pt 1):1446-1451.
176. Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991 Mai;6(5):845-858.
177. Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992 Apr;89(7):3060-3064.
178. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol* 2001 Juni;11(3):272-280.
179. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol* 1994 Nov;25(11):1386-1403.
180. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996 Okt;383(6602):716-719.
181. Klesse LJ, Parada LF. Trks: signal transduction and intracellular pathways. *Microsc. Res. Tech* 1999 Juni;45(4-5):210-216.
182. Kume T, Nishikawa H, Tomioka H, et al. p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res* 2000 Jan;852(2):279-289.
183. Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol* 2000

- Juni;61(2):205-229.
184. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci* 1997 Apr;17(7):2295-2313.
  185. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004 Sep;22(3):123-131.
  186. Tanaka T, Saito H, Matsuki N. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci* 1997 Mai;17(9):2959-2966.
  187. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol. Chem. Neuropathol* 1997 Feb;30(1-2):53-76.
  188. Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J. Neurosci* 2001 Juli;21(13):4891-4900.
  189. Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 1991 Nov;7(5):695-702.
  190. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp. Neurol* 2000 Nov;166(1):127-135.
  191. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001 Juli;293(5529):493-498.
  192. Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology* 1999 Nov;21(5):679-682.
  193. Zhang Y, Pardridge WM. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke* 2001 Juni;32(6):1378-1384.
  194. Kume T, Kouchiyama H, Kaneko S, et al. BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 1997 Mai;756(1-2):200-204.
  195. Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol* 2005 Juni;76(2):99-125.
  196. Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays* 2004 Nov;26(11):1185-1194.
  197. Fryer RH, Kaplan DR, Kromer LF. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol* 1997 Dez;148(2):616-627.

198. Saarelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S, et al. Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol. Cell. Neurosci* 2000 Aug;16(2):87-96.
199. Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007 Juni;2(2):140-153.
200. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog. Neurobiol* 1998 Okt;56(3):307-340.
201. Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Prog. Neurobiol* 2007 Dez;83(6):363-374.
202. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat. Med* 2002 Dez;8(12):1363-1368.
203. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J* 2003 Aug;374(Pt 1):1-20.
204. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem. Soc. Trans* 2007 Nov;35(Pt 5):1295-1297.
205. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol* 2005 Sep;175(6):3463-3468.
206. Oto J, Suzue A, Inui D, et al. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients. *J Anesth* 2008;22(3):207-212.
207. Welsh P, Lowe GDO, Chalmers J, et al. Associations of proinflammatory cytokines with the risk of recurrent stroke. *Stroke* 2008 Aug;39(8):2226-2230.
208. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 Jan;20(1):84-91.
209. Dai WJ, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J. Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 1999 Nov;30(11):2391-2398; discussion 2398-2399.
210. Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J. Hypertens* 2003 Nov;21(11):2175-2182.
211. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995 Apr;26(4):627-634.

212. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 2007;37(2):120-126.
213. Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* [o. J.];10 (2004):92-95.
214. Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J. Neurosci. Methods* 2009 Okt;184(1):115-118.
215. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995 Sep;70(5):220-233.
216. Kubota Y, Kubota K, Tani S. DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: groove-binding and intercalation. *Nucleic Acids Symp. Ser* 2000;(44):53-54.
217. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol* 2005 Juli;42(4):405-426.
218. Gohlke P, Kox T, Jürgensen T, et al. Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 2002 Juni;365(6):477-483.
219. Gohlke P, Weiss S, Jansen A, et al. AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2001 Juli;298(1):62-70.
220. Thöne-Reineke C, Zimmermann M, Neumann C, et al. Are angiotensin receptor blockers neuroprotective? *Curr. Hypertens. Rep* 2004 Aug;6(4):257-266.
221. Linz W, Jessen T, Becker RH, Schölkens BA, Wiemer G. Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation* 1997 Nov;96(9):3164-3172.
222. Stier CT, Adler LA, Levine S, Chander PN. Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 1993 Apr;11(3):S37-42.
223. Kobayashi T, Kawamata T, Shibata N, Okada Y, Kobayashi M, Hori T. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan reduces cerebral infarct volume and peri-infarct cytosolic phospholipase A(2) level in experimental stroke. *J. Neurotrauma* 2009 Dez;26(12):2355-2364.
224. Blair-West JR, Denton DA, McKinley MJ, Weisinger RS. Thirst and brain angiotensin in cattle. *Am. J. Physiol* 1992 Feb;262(2 Pt 2):R204-210.
225. Gohlke P, Urbach H, Schölkens B, Unger T. Inhibition of converting enzyme in the cerebrospinal fluid of rats after oral treatment with converting enzyme inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1989 Mai;249(2):609-616.
226. Ranadive SA, Chen AX, Serajuddin AT. Relative lipophilicities and structural-

- pharmacological considerations of various angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharm. Res* 1992 Nov;9(11):1480-1486.
227. Lenkei Z, Corvol P, Llorens-Cortes C. The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1995 Mai;30(1):53-60.
228. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ. Res* 2002 Dez;91(12):1119-1126.
229. Ruef J, Browatzki M, Pfeiffer CAH, Schmidt J, Kranzhöfer R. Angiotensin II promotes the inflammatory response to CD40 ligation via TRAF-2. *Vasc Med* 2007 Feb;12(1):23-27.
230. Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2003 Aug;285(2):G414-423.
231. Li Z, Chen X, Ni S, Li J, Lin M. Olmesartan inhibits the expression of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha and improves vascular remodeling after vascular injury in mouse. *Chin. J. Traumatol* 2004 Feb;7(1):56-61.
232. Sauter M, Cohen CD, Wörnle M, Mussack T, Ladurner R, Sitter T. ACE inhibitor and AT1-receptor blocker attenuate the production of VEGF in mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2007 Apr;27(2):167-172.
233. Danielyan L, Lourhmati A, Verleysdonk S, et al. Angiotensin receptor type 1 blockade in astroglia decreases hypoxia-induced cell damage and TNF alpha release. *Neurochem. Res* 2007 Sep;32(9):1489-1498.
234. Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol* 2001 Feb;37(2):440-444.
235. Sardo MA, Castaldo M, Cinquegrani M, et al. Effects of AT1 receptor antagonist losartan on sICAM-1 and TNF-alpha levels in uncomplicated hypertensive patients. *Angiology* 2004 Apr;55(2):195-203.
236. Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* 2002 Apr;3(4):569-577.
237. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ. Res* 2004 März;94(4):534-541.
238. Skurk T, van Harmelen V, Hauner H. Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2004 Juli;24(7):1199-1203.
239. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, et al. Angiotensin II stimulates interleukin-6 re-

- lease from cultured mouse mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol* 1995 Juli;6(1):95-101.
240. Larrayoz IM, Pang T, Benicky J, Pavel J, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM. Candesartan reduces the innate immune response to lipopolysaccharide in human monocytes. *J. Hypertens* 2009 Dez;27(12):2365-2376.
241. Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T. Antagonist of the type-1 ANG II receptor prevents against LPS-induced septic shock in rats. *Intensive Care Med* 2009 Aug;35(8):1471-1478.
242. Sanchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldan IM, Moughamian AJ, Pavel J, Nishioku T, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 2008 Okt;149(10):5177-5188.
243. Molinas SM, Cortés-González C, González-Bobadilla Y, et al. Effects of losartan pretreatment in an experimental model of ischemic acute kidney injury. *Nephron Exp. Nephrol* 2009;112(1):e10-19.
244. Link A, Lenz M, Legner D, Böhm M, Nickenig G. Telmisartan inhibits beta2-integrin MAC-1 expression in human T-lymphocytes. *J. Hypertens* 2006 Sep;24(9):1891-1898.
245. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Doré JJ, Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* 2009 Apr;40(4):1490-1495.
246. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2008 Nov;1144:97-112.
247. Wu D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2005 Jan;2(1):120-128.
248. Szekeres M, Nádasy GL, Turu G, et al. Angiotensin II-induced expression of brain-derived neurotrophic factor in human and rat adrenocortical cells, *Endocrinology*, vol. 151, Apr. 2010, S. 1695-1703.
249. Tuttle JB, Etheridge R, Creedon DJ. Receptor-mediated stimulation and inhibition of nerve growth factor secretion by vascular smooth muscle. *Exp. Cell Res* 1993 Okt;208(2):350-361.
250. Rana OR, Schauerte P, Hommes D, Schwinger RHG, Schröder JW, Hoffmann R, Saygili E. Mechanical stretch induces nerve sprouting in rat sympathetic neurocytes, *Auton. Neurosci.* (2010), doi:10.1016/j.autneu.2010.01.003.
251. Nakamura H, Domon Y, Inoue T, Arakawa N, Yokoyama T. Olmesartan medoxomil ameliorates sciatic nerve regeneration in diabetic rats. *Neuroreport* 2009 Okt;20(16):1481-1485.
252. Kapadia R, Yi J, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front. Biosci* 2008;13:1813-1826.

253. Pancani T, Phelps JT, Searcy JL, et al. Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca<sup>2+</sup> currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem* 2009 Juni;109(6):1800-1811.

### 9. Erklärung

„Ich, Kay Rumschüßel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleichende Interventionsstudie mit Telmisartan, Ramipril und der Kombination im akuten Modell des Schlaganfalls der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

### 10. Danksagung

Einen besonderen Dank richte ich an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Unger, der mir die Bearbeitung dieses hochinteressanten Dissertationsthemas ermöglichte. Ohne sein großes Interesse und den außerordentlich konstruktiven Diskussionen wäre die Fertigstellung dieser Arbeit kaum denkbar gewesen.

Weiterhin danke ich an dieser Stelle meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Christa Thöne-Reineke sowie auch Herrn Pawel Namsolleck. Stets hatten sie „ein offenes Ohr“ für Sorgen und Probleme und stets wurden unmittelbar Lösungen gesucht und gefunden. Dies sollte hier unbedingt seine Würdigung finden.

Ebenfalls gilt großer Dank meinen Kollegen in der "Arbeitsgruppe Unger". Namentlich seien hier Kristin Lucht, Katja Schwengel und Kristin Schmerbach für die theoretische und praktische Unterstützung genannt. Für seine tierexperimentellen Arbeiten im Labor soll auch Herrn Maxim Krikov an dieser Stelle gedankt werden, denn diese waren Grundlage dieser Arbeit.

Abschließend spreche ich meinen Freunden und insbesondere meiner Familie meinen herzlichen Dank aus. Sie standen mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und gaben mir dadurch die Möglichkeit, mich auf die Arbeit an der Dissertation zu konzentrieren. Ohne sie wäre die Bewältigung der vielen Stunden, die für die vorliegende Arbeit aufzubringen waren, nicht möglich gewesen.

### **11. Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### 12. Publikationen

1. Thöne-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Schefe JH, Lucht K, Hörtnagl H, Godes M, Müller S, Rumschüssel K, Funke-Kaiser H, Villringer A, Steckelings UM, Unger T. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J. Hypertens* 2008 Dez;26(12):2426-2435.
2. Thoene-Reineke C , Rumschüssel K, Schmerbach K, Krikov M, Wengenmayer C, Godes M, Mueller S, Villringer A, Steckelings UM, Namsolleck P, Unger T. Prevention and intervention studies with telmisartan, ramipril and their combination in different rat stroke models. *PLoS One*. 2011;6(8):e23646. Epub 2011 Aug 25.