

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Interventions- und Präventionsstudien mit kombinierten ECE/NEP - Hemmern  
an Schlaganfallmodellen in Ratten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Christina Wengenmayer  
Tierärztin aus Wiesbaden

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3360

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Unger  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Thönhardt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

stroke, rats, blood pressure, hypertension, brain, ischaemia, cerebrovascular disorders, metalloproteinases, enzyme inhibitors, peptides, animal models

Tag der Promotion: 30.06.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-835-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)





## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Zielsetzung</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Der Schlaganfall</i> .....	3
2.2 <i>Das Endothelinsystem und seine Bestandteile</i> .....	8
2.3 <i>Die natriuretischen Peptide</i> .....	13
2.4 <i>Die Tiermodelle</i> .....	17
2.4.1 MCAO.....	17
2.4.2 SHR-SP.....	19
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 <i>Material</i> .....	20
3.1.1 Versuchstiere.....	20
3.1.2 Test- und Referenzsubstanzen.....	20
3.1.2.1 Phosphat – Puffer Lösung (PBS).....	20
3.1.2.2 SLV338.....	20
3.1.2.3 5% Glukoselösung.....	21
3.1.2.4 SLV334.....	21
3.1.3 Verbrauchs – und Operationsmaterial.....	21
3.1.4 Geräte.....	23
3.1.5 Medikamente, Chemikalien und Lösungen.....	24
3.1.6 Software.....	25
3.2 <i>Methoden</i> .....	25
3.2.1 Tierexperimentelle Grundlagen.....	25
3.2.2 Studienaufbau und Durchführung.....	26
3.2.2.1 Studie A.....	26
3.2.2.2 Studie B.....	27
3.2.2.3 Studie C.....	29
3.2.2.4 Studie D.....	30
3.2.3 MCAO.....	32
3.2.4 Pumpenimplantation.....	33
3.2.5 Retrobulbäre Blutentnahme.....	33
3.2.6 Blutdruck.....	34
3.2.7 Neurologische Untersuchung.....	34
3.2.8 MRT.....	34
3.2.9 Blutentnahme final.....	35
3.2.10 Tötung.....	35
3.2.11 Organentnahme.....	36
3.2.12 Histologische Präparate.....	36
3.2.13 Statistik.....	37

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
4.1	<i>Studie A</i> .....	38
4.1.1	SLV338 Plasmakonzentration .....	38
4.1.2	Blutdruck .....	39
4.1.3	Blutgase .....	40
4.1.4	Neurologische Untersuchung .....	41
4.1.5	Infarktgrößen .....	42
4.1.6	Gehirngewicht .....	43
4.2	<i>Studie B</i> .....	45
4.2.1	SLV338 und SLV334 Plasmakonzentration .....	45
4.2.2	Blutdruck .....	46
4.2.3	Blutgase .....	47
4.2.4	Neurologische Untersuchung .....	48
4.2.5	Infarktgrößen .....	49
4.2.6	Gehirngewicht .....	50
4.3	<i>Studie C</i> .....	52
4.3.1	SLV338 Futterkonzentration .....	52
4.3.2	SLV338 Plasmakonzentration .....	52
4.3.3	Körpergewicht .....	53
4.3.4	Blutdruck .....	54
4.3.5	Neurologische Untersuchung .....	55
4.3.6	Infarktgrößen .....	56
4.3.7	Organgewichte .....	57
4.3.8	Blutwerte .....	61
4.3.9	Urinwerte .....	69
4.3.10	Stoffwechsellkäfig .....	77
4.3.11	Mortalität .....	80
4.4	<i>Studie D</i> .....	81
4.4.1	Blutdruck .....	81
4.4.2	Blutgase .....	82
4.4.3	Neurologische Untersuchung .....	83
4.4.4	Körpergewicht .....	84
4.4.5	Infarktgrößen .....	85
4.4.6	Gehirngewicht .....	85
4.4.7	Nisslfärbung .....	87
4.4.8	Mortalität .....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
5.1	<i>SLV338 im Schlaganfall</i> .....	90
5.2	<i>Das Lösungsmittel in der Schlaganfallforschung</i> .....	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>99</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>101</b>
	<b>Eigene Publikationen und Präsentationen</b> .....	<b>119</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>120</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	<b>121</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Core zone und Penumbra.....	4
Abbildung 2: Darstellung der Endotheline.....	8
Abbildung 3: Darstellung der natriuretischen Peptide.....	14
Abbildung 4: Darstellung eines Schlaganfalls im MRT.....	35
Abbildung 5: SLV338 Plasmakonzentration Studie A.....	38
Abbildung 6: Blutdruck Studie A.....	39
Abbildung 7: Neurologische Defizite Studie A.....	41
Abbildung 8: Infarktgrößen nach 48 h Studie A.....	42
Abbildung 9: Gehirngewichte Studie A.....	43
Abbildung 10: Relative Gehirngewichte Studie A.....	44
Abbildung 11: Blutdruck Studie B.....	46
Abbildung 12: Neurologische Defizite Studie B.....	49
Abbildung 13: Infarktgrößen Studie B.....	50
Abbildung 14: Gehirngewichte Studie B.....	51
Abbildung 15: Relative Gehirngewichte Studie B.....	51
Abbildung 16: Körpergewicht Studie C.....	53
Abbildung 17: Blutdruck Studie C.....	54
Abbildung 18: Neurologische Defizite Studie C.....	55
Abbildung 19: Entnommenes, gefrorenes Gehirn in toto und dessen MRT Aufnahme.....	56
Abbildung 20: Infarktgrößen Studie C.....	57
Abbildung 21: Gehirngewichte Studie C.....	58
Abbildung 22: Relative Gehirngewichte Studie C.....	58
Abbildung 23: Herzgewichte Studie C.....	59
Abbildung 24: Relative Herzgewichte Studie C.....	59
Abbildung 25: Mittlere Nierengewichte Studie C.....	60
Abbildung 26: Relative mittlere Nierengewichte Studie C.....	60
Abbildung 27: Verlauf der Albumin – Plasmakonzentration Studie C.....	61
Abbildung 28: Verlauf der Kreatinin – Plasmakonzentration Studie C.....	62
Abbildung 29: Verlauf der Urea – Plasmakonzentration Studie C.....	63
Abbildung 30: Verlauf der BNP – Plasmakonzentration Studie C.....	64
Abbildung 31: ANP – Plasmakonzentration Studie C.....	65
Abbildung 32: Big-Endothelin – Plasmakonzentration Studie C.....	66
Abbildung 33: Endothelin-1 – Plasmakonzentration Studie C.....	67
Abbildung 34: Natrium – Plasmakonzentration Studie C.....	68
Abbildung 35: Albumin – Urinkonzentration in Woche 1 Studie C.....	69
Abbildung 36: Albumin – Urinkonzentration in Woche 9 Studie C.....	70
Abbildung 37: Albumin – Urinkonzentration in Woche 22 Studie C.....	70
Abbildung 38: Verlauf der Kreatinin – Urinkonzentration Studie C.....	71
Abbildung 39: Verlauf des Albumin/ Kreatininverhältnisses Studie C.....	72
Abbildung 40: Verlauf der Urea – Urinkonzentration Studie C.....	73
Abbildung 41: Verlauf der Urin- cGMP Konzentration Studie C.....	74
Abbildung 42: Verlauf des cGMP/ Kreatininverhältnisses Studie C.....	75
Abbildung 43: Verlauf der glomerulären Filtrationsrate Studie C.....	76
Abbildung 44: Verlauf der Futteraufnahme Studie C.....	77

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 45: Verlauf der Wasseraufnahme Studie C .....	78
Abbildung 46: Verlauf der abgegebenen Urinmenge Studie C .....	79
Abbildung 47: Mortalitätskurve Studie C .....	80
Abbildung 48: Blutdruck Studie D .....	81
Abbildung 49: Neurologische Defizite Studie D .....	83
Abbildung 50: Körpergewicht Studie D .....	84
Abbildung 51: Infarktgrößen Studie D .....	85
Abbildung 52: Gehirngewicht Studie D .....	86
Abbildung 53: Relatives Gehirngewicht Studie D .....	86
Abbildung 54: Nisslfärbung PBS Studie D .....	87
Abbildung 55: Nisslfärbung Glukoselösung Studie D .....	87
Abbildung 56: Nisslfärbung NaCl Studie D .....	88
Abbildung 57: Mortalität Studie D .....	89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blutgase Studie A .....	40
Tabelle 2: Blutgase Studie B .....	47
Tabelle 3: SLV338 Konzentration im Futter Studie C .....	52
Tabelle 4: SLV338 Plasmakonzentration Studie C .....	52
Tabelle 5: Blutgase Studie D .....	82



**Abkürzungsverzeichnis**

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ASIC	pH gesteuerter Ionenkanal (acid sensing ion channel)
Big-ET	Big-Endothelin
BNP	Brain natriuretic peptide
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCR	Centrum for Cardiovascular Research
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol-HCl
DNS/ DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dendroaspis natriuretic peptide/ D-typ natriuretic peptide
ECE	Endothelin – converting – enzyme
ET-1	Endothelin –1
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
GTP	Guanosintriphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenös
IL-12	Interleukin 12
K	Kalium
EDTA-K	Kalium – Ethylendiamintetraacetat
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
MRI	Magnet resonance imaging
MRT	Magnet-Resonanz-Tomograph
NaCl	Natriumchlorid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFWZ	Neurowissenschaftliches Forschungszentrum
NMDA-Rezeptoren	Gruppe der Glutamatrezeptoren
NO	Stickstoffmonoxid
NPR	Natriuretisches Peptid Rezeptor
O <sub>2</sub>	Dioxygen (molekularer Sauerstoff)
p	Partieller Druck
PBS	Phosphat-buffer-solution
pH	Potentia hydrogenii
PIP2	Phosphatidylinositoldiphosphat
RNA/ RNS	Ribonukleinsäure
s.c.	Subkutan
SEM	Standardabweichung (Standard error of the mean)
SHR-SP	Spontaneously hypertensive rats – stroke prone
SPF	Spezifisch pathogen frei
TGF -β	Transforming growth factor - β1
TIA	Transient ischemic attack
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor - α
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem



## Einleitung

Der Schlaganfall ist noch immer eine der bedeutendsten und häufigsten lebensbedrohenden Krankheiten weltweit, in westlichen Industrieländern stellt er sogar die dritthäufigste Todesursache dar (Bundesamt, 2005, Doyle et al., 2008). Jährlich erleiden über 15 Millionen Menschen einen Schlaganfall (WHO, 2007) und 60% der Patienten werden, trotz intensiver Forschung und neuer Medikamente, für den Rest ihres Lebens mit einer anschließenden Behinderung leben müssen (Rothwell et al., 2004, Bundesamt, 2005, WHO, 2007).

Aus diesem Grund wird die Suche nach wirksameren Medikamenten unvermindert fortgesetzt.

Eine der Hauptursachen des Schlaganfalls und damit auch ein Hauptansatzbereich für neue Medikamente ist der Bluthochdruck (Dahlof, 2007, Lewington et al., 2002, MacMahon, 1996). Verschiedene körpereigene Systeme, die den Blutdruck regulieren sind bekannt und weitgehend untersucht. Einer dieser Mechanismen ist das Endothelin System; Endothelin –1 ist einer der potentesten bekannten Vasokonstriktoren und damit auch mitverantwortlich bei der Entstehung pathogenen Bluthochdrucks und dessen Folgen (Schiffrin, 2005).

Ebenfalls an der Regulierung des Blutdruckes beteiligt sind die natriuretischen Peptide: ANP, BNP und CNP. Sie wirken vasodilatativ und damit blutdrucksenkend (Hirata et al., 1992) und hemmen die Endothelin Freisetzung (Campbell, 2003, Hanehira et al., 1997). In verschiedenen Studien wurde die positive Wirkung natriuretischer Peptide bei zerebrovaskulären Erkrankungen bereits nachgewiesen (Akdemir et al., 1997, Lin et al., 1999).

Da das endothelinsynthetisierende Enzym (Endothelin-converting enzyme) und die die natriuretischen Peptide abbauende, neutrale Endopeptidase beide zu den Zink-Metalloproteasen gehören und strukturell eng miteinander verwandt sind, ist es möglich, beide mit einer Substanz zu hemmen und so die Konzentration von Endothelin zu senken und die der natriuretischen Peptide zu erhöhen. Eine solche Substanz, SLV338, wird in der hier vorliegenden Arbeit getestet. Damit soll der Einfluss von Endothelin und der der natriuretischen Peptide auf die Geschehnisse bei einem Schlaganfall ermittelt werden. Durch die Behandlung werden im günstigsten Fall eine Verringerung des Infarktolumens und der neurologischen Schäden nach dem Schlaganfall bewirkt.

Die Wirksamkeit von SLV338 wurde bei dieser Arbeit in drei verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Tiermodellen und Dosierungen untersucht; präventiv in spontan hypertensiven Ratten (SHR-SP) und in zwei Interventionsstudien mit Vor- und Nachbehandlung bei operativer Schlaganfallinduktion in der Ratte. In einer Vergleichsstudie

## Zielsetzung

wurden zusätzlich Tiere mit SLV334, einer anderen Substanz mit ähnlicher Wirkung, behandelt.

Da die Substanzen (SLV338 und SLV334) in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst wurden, waren entsprechende Kontrollgruppen notwendig. Diese unterschiedlichen Kontrollgruppen wurden ebenfalls untereinander verglichen, um die Bedeutung der Lösungsmittel in den Kontrollgruppen zu untersuchen.

## 1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es zu beweisen, dass

- die Blockade des Endothelin-converting Enzyms und gleichzeitige Blockade der neutralen Endopeptidase
  - die Häufigkeit eines spontan auftretenden Schlaganfalls senkt
  - die neurologischen Schäden nach einem Schlaganfall reduziert
  - das Volumen des geschädigten Gebiets verringert
- die Behandlung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln bei den Kontrollgruppen Auswirkungen hat auf das Infarktvolumen, die neurologischen Schäden und die Überlebensrate nach einem Schlaganfall.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Schlaganfall

Als Schlaganfall bezeichnet man das plötzliche Aussetzen bestimmter Funktionen des Gehirns. Laut der *World Health Organisation* (WHO) müssen diese neurologischen Einschränkungen für mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen, damit es sich um einen Schlaganfall handelt. Kürzere Anfälle werden als *transient ischemic attack* (TIA) bezeichnet. Diese neurologischen Defizite, wie sie bei einem Schlaganfall auftreten, werden in den meisten Fällen (90%) durch die Mangel durchblutung eines abgegrenzten Areals im Gehirn verursacht, was dann als ischämischer Infarkt bezeichnet wird (Eschenfelder Ch et al., 2006, Thom et al., 2006). Bei den restlichen 10% der Fälle kommt es zu einem hämorrhagischen Infarkt mit einer Einblutung in das Gehirn (Eschenfelder Ch et al., 2006).

Der ischämische Schlaganfall resultiert aus einer transienten oder permanenten Verminderung des zerebralen Blutflusses, die auf das Gebiet einer Hauptarterie des Hirns beschränkt ist (Dirnagl et al., 1999, Heiss et al., 1999). Diese Reduktion des Blutflusses wird meist durch den Verschluss (Okklusion) einer zerebralen Arterie verursacht, hervorgerufen durch einen Embolus oder eine lokale Thrombose (Brott and Bogousslavsky, 2000, Eschenfelder Ch et al., 2006).

Einige der bekannten Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls sind *Diabetes mellitus*, Nikotin- und Alkoholmissbrauch, Adipositas und Hypercholesterämie (ESA, 2008). Als eine der Hauptursachen wird jedoch erhöhter Blutdruck (Dahlof, 2007, Lewington et al., 2002) angesehen und das Risiko eines Schlaganfalls kann mit Senkung des Blutdrucks um 5 mmHg bereits signifikant erniedrigt werden (ESA, 2008, Li et al., 2005a, Lo et al., 2003).

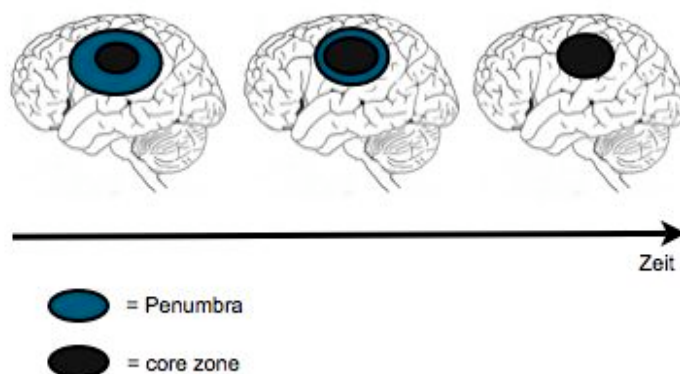
Die erste und unmittelbare therapeutische Maßnahme nach einem Schlaganfall ist die schnelle Wiederherstellung und Aufrechterhaltung einer adäquaten Durchblutung des ischämischen Gewebes durch die Gabe antithrombotischer Medikamente und Antikoagulantien, um so die durch den Schlaganfall induzierten Schäden und späteren neurologischen Defizite (ESA, 2008) abzuschwächen.

Die ischämische Hirnschädigung ist Resultat einer komplexen Abfolge von pathophysiologischen Ereignissen, die sich über Raum und Zeit erstrecken und nur schwer voneinander abzugrenzen sind, da sie sich zum Teil gegenseitig beeinflussen und voneinander abhängen. Wesentliche Mechanismen dieser Kaskade sind Exzitotoxizität (Zellschädigung durch Übererregung), Peri-Infarkt Depolarisationen, Azidotoxizität, Inflammation, programmierter Zelltod (Apoptose) und Nekrose (Gonzalez et al., 2006). Zur Erklärung der einzelnen Vorgänge ist das Verständnis des Konzepts der Penumbra von Bedeutung.

Man kann bei einem ischämischen Schlaganfall zwei Gebiete im Gehirn unterscheiden, den Kernbereich, auch *core zone* genannt, und das Randgebiet, die Penumbra (Astrup et al., 1981). In der *core zone* kommt es wegen der sehr geringen Durchblutung, 0 – 20% (Ginsberg, 2003) zu einem Zelltod innerhalb von Minuten (Dwyer et al., 2008, Doyle et al., 2008). Die mangelnde Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glukose führt zur anaeroben Glykolyse, in deren Folge die Zellen nicht mehr genug Energie aufbringen können, um die Homöostase der Ionen, lebenswichtige Prozesse in der Zelle und die Stabilität der Zellmembran aufrechtzuerhalten, und es kommt zur Nekrose der Zellen (Mergenthaler et al., 2004, Dirnagl et al., 1999).

In der Penumbra kann die Sauerstoff- und Energieversorgung der Zellen durch Kollateralgefäße noch einige Zeit in geringem Maße aufrechterhalten werden (Obrenovitch, 1995, Dwyer et al., 2008). Durch Entzündungsprozesse (Mergenthaler et al., 2004, Dirnagl et al., 1999, Gonzalez et al., 2006), Zerstörung der DNA, freie Radikale und ein langsam entstehendes Ionenungleichgewicht (Doyle et al., 2008) kann es hier aber auch schließlich zu einer Apoptose der Zellen kommen.

Somit ist die Penumbra das Gebiet, in dem versucht wird, die Zellen zu retten und damit die Folgeschäden so gering wie möglich zu halten (Dirnagl et al., 1999, Heiss, 2000).



**Abbildung 1: Core zone und Penumbra**

Core Zone und Penumbra nach einem Schlaganfall. In der core zone kommt es zum unmittelbaren Zelltod, in der Penumbra kann vorübergehend noch eine geringe Stoffwechselaktivität erhalten bleiben. Im Laufe von Tagen sterben auch hier weitere Zellen ab, nur ein geringer Teil kann sich regenerieren (siehe Text).

Im Folgenden werden die wichtigsten Vorgänge (Exzitotoxizität, Peri-Infarkt Depolarisation, Azidotoxizität und Inflammation) nach einem ischämischen Schlaganfall kurz erklärt.

*Exotoxizität:* Das Gehirn hat einen sehr hohen Verbrauch von Glukose und Sauerstoff (20% des totalen Sauerstoffverbrauchs), um so die nötige Energie durch oxidative Phosphorylierung zu gewinnen (Doyle et al., 2008, Edvinsson and Krause, 2002). Bereits kurze Unterbrechungen des Blutkreislaufs und damit der Energieversorgung, führen im Gehirn zu einem Verlust des notwendigen Membranpotentials. Aufgrund des Energiemangels kann keine Repolarisierung der Zellen stattfinden; Kalium verlässt die Zelle, während gleichzeitig Natrium einströmt. Es kommt zu einer Depolarisierung der Neuronen und Gliazellen und damit zu einer Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle; Kalzium strömt weiter in die Zelle ein, bei gleichzeitigem Ausstrom von Aminosäuren, insbesondere Glutamat, in den extrazellulären Raum (Doyle et al., 2008). In der Zelle werden dadurch Kalzium abhängige Proteasen, Lipasen und DNasen aktiviert (Edvinsson and Krause, 2002). Außerhalb der Zelle führt die Akkumulation von Glutamat im extrazellulären Raum aufgrund dessen exzitatorischer Wirkung zu einem Einstrom von Natrium und Chlor in die Zelle (Caplan, 2000). Weiterhin werden durch Glutamat noch mehr spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, so dass die durch Kalzium vermittelten, schädlichen Prozesse noch gesteigert werden (Olney, 1969). Da im Austausch weniger Kalium die Zelle verlässt als Kalzium, Natrium und Chlor in die Zelle einströmen, wird, um die Isoosmose aufrecht zu erhalten, Wasser passiv in die Zelle nachströmen. Das so entstehende Zellödem führt schließlich zum Tod der Zelle, zur Nekrose. Da die Nekrose auf eine Übererregung der Zelle zurückgeführt werden kann, spricht man hier von *Exzitotoxizität*.

In der Penumbra kann eine geringe Energieversorgung durch Kollateralgefäße erhalten werden, so dass die Nekrose der Zellen hauptsächlich in dem Kerngebiet des Schlaganfalls stattfindet (Gonzalez et al., 2006).

*Peri-Infarkt Depolarisation:* Bleibt die Unterbrechung der Durchblutung jedoch über einen längeren Zeitraum bestehen, kommt es an den Randgebieten zwischen *core zone* und Penumbra durch die in der *core zone* freigesetzten exzitatorischen Aminosäuren (z.B. Glutamat) und das Kalium auch hier zu einer Depolarisation der angrenzenden Neuronen und Gliazellen. Da die Repolarisation der Zellen energieabhängig ist und auch in der Penumbra ein Energiemangel herrscht, kann sich dieses auch als *peri-infarkt Depolarisation* bezeichnete Geschehen, vom Kern ausgehend, mit der Zeit durch die gesamte Penumbra hindurch fortsetzen (Doyle et al., 2008) und so auch hier zum Zelltod führen.

*Azidotoxizität:* Nach einer Ischämie steht in dem betroffenen Gebiet nicht mehr genug Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung zur Verfügung, alle Vorgänge in der Zelle werden auf anaeroben Metabolismus umgestellt und es kommt zu einer Ansammlung von Laktat. Aufgrund des Sistierens des Blutstroms kann das angesammelte Laktat jedoch nicht abtransportiert werden und es kommt zu einem Abfall des pH-Wertes. Durch den niedrigen

pH-Wert werden so genannte *ASICs (acid sensing ion channels)* aktiviert, die für Kalzium permeabel sind. Durch diesen Ischämie abhängigen, toxischen Kalziumeinstrom kommt es zu den gleichen Veränderungen in der Zelle, wie sie bei der Exzitotoxizität beschrieben wurden, mit Aktivierung verschiedener abbauender Enzyme, dem Einstrom von Natrium und Chlor und der Nekrose der Zelle (Simon, 2006). Es wird sogar vermutet, dass der toxische Kalziumeinstrom und damit Nekrose und Apoptose der Zellen hauptsächlich durch diese Azidotoxizität ausgelöst wird (Simon, 2006) und nicht, wie bisher angenommen, durch die Glutamat vermittelte Exzitotoxizität.

Ausgehend von der Kenntnis dieser Vorgänge bieten sich verschiedene Therapieansätze an, um die Schäden nach einem Schlaganfall zu verringern: z.B. die Blockade des Glutamat – Rezeptors (Prass and Dirnagl, 1998), der ASICs (Simon and Xiong, 2006), oder auch die Aktivierung verschiedener Faktoren, die die Apoptose verhindern sollen (Crack and Taylor, 2005). Ein weiterer Ansatz ist es, die Durchblutung möglichst schnell wieder herzustellen und so eine Ansammlung toxischer Substanzen zu verhindern (McAuley et al., 1996, ESA, 2008).

*Inflammation:* Zu den Vorgängen, die zu einer Schädigung des Gehirns nach einer Ischämie beitragen, gehört auch die Entzündung; ein komplexer Prozess, bei dem verschiedene Zelltypen, Entzündungsmediatoren und extrazelluläre Rezeptoren eine Rolle spielen (Doyle et al., 2008).

*Zelluläre Entzündungsreaktion:* Nach einem Schlaganfall sind im Plasma neutrophile Granulozyten und Monozyten erhöht, während die Lymphozyten erniedrigt sind (Ross et al., 2007), das alleine würde jedoch noch nicht zu einer Verschlechterung der neurologischen Schäden nach einem Schlaganfall beitragen. Erst durch die durch Selektine, Integrine und Immunglobuline vermittelte Migration neutrophiler Granulozyten aus den Gefäßen in das geschädigte Gehirngewebe kommt es zu einer weiteren Verschlechterung (Doyle et al., 2008). Diese Transmigration ist nur durch den Zusammenbruch der Blut – Hirn – Schranke möglich. Durch die Aggregation der neutrophilen Granulozyten an die Gefäßwände kleiner Mikropillaren und ihren dadurch entstehenden Verschluss, wird die Durchblutung hier weiter verzögert und es kommt zu weiteren Gewebeschäden; man bezeichnet dies auch als das *no – reflow phenom* (Huang et al., 2006). Zusätzlich kommt es zu einer Freisetzung von freien Radikalen und proteolytischen Enzymen durch die neutrophilen Granulozyten (Doyle et al., 2008). Durch Hemmung der Proteinkinase C, die in den Signalkaskaden der neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle spielt, konnten die neurologischen Schäden nach einem Schlaganfall deutlich verringert werden (Chou et al., 2004, Huang et al., 2006).

Die Rolle der Monozyten ist weniger eindeutig, sie sind noch Wochen nach einem Schlaganfall in dem betroffenen Gewebe zu finden, wo sie einerseits durch Phagozytose



zerstörtes Gewebe beseitigen und Cytokine freisetzen, die die Vernarbung der Gliazellen beschleunigen, andererseits wurden eine weitere Zerstörung des Gehirngewebes und eine Verschlechterung der neurologischen Schäden festgestellt (Doyle et al., 2008).

Lymphozyten können durch den Zusammenbruch der Blut – Hirn – Schranke entweder direkt oder durch die dadurch mögliche Präsentation von Gehirnantigenen in aktivierter Form in das Gewebe eindringen (Doyle et al., 2008) und damit zur weiteren Gehirnschädigung beitragen. In Mäusen, denen die T- und B- Lymphozyten fehlten, konnte das Infarktvolumen im Kortex um 40% verringert werden (Hurn et al., 2007).

*Entzündungsreaktion der Zytokine:* Neben den Entzündungszellen spielen auch die Entzündungsmediatoren bei den Vorgängen nach einem Schlaganfall eine entscheidende Rolle. So wird durch Interleukin – 1 nicht nur die Exzitotoxizität durch die NMDA – Rezeptoren gesteigert (Huang et al., 2006), sondern gleichzeitig die neutrophile Infiltration (Huang et al., 2006, Yamasaki et al., 1997).

Durch den Tumor – Nekrose Faktor -  $\alpha$  wird die Aggregation der neutrophilen Granulozyten stimuliert und der Zusammenbruch der Blut – Hirn – Schranke (Doyle et al., 2008). Nach einem Schlaganfall konnten hohe Konzentrationen von TNF- $\alpha$  im Serum nachgewiesen werden (Huang et al., 2006), die mit der Größe des Infarkts korrelierten (Zaremba et al., 2001). Durch die Gabe eines TNF- $\alpha$  neutralisierenden Antikörpers konnte die Gehirnschädigung verringert werden (Nawashiro et al., 1997b, Nawashiro et al., 1997a).

Bei Interleukin – 6 konnten nach einem Schlaganfall ebenfalls höhere Plasmakonzentrationen gemessen werden, die mit der Größe des Infarkts und den neurologischen Schäden nach einem Schlaganfall korrelierten (Huang et al., 2006, Tarkowski et al., 1995). Andererseits hat Interleukin – 6 eine positive Wirkung und aktiviert einen Interleukin – 1 Antagonisten (Relton et al., 1996, Schindler et al., 1990).

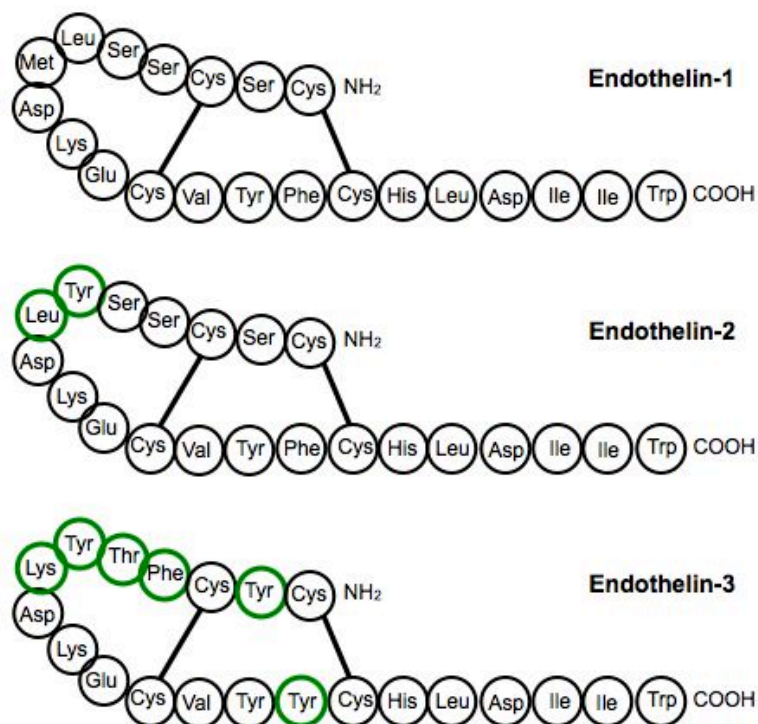
Dem *transforming growth factor* TGF- $\beta$ 1 konnten bisher nur positive Eigenschaften zugeordnet werden. So wirkt er nach einer Ischämie neuroprotektiv (Huang et al., 2006, McNeill et al., 1994), reduziert zirkulierende neutrophile Granulozyten (Mori et al., 1992) und wirkt protektiv gegen die Glutamat vermittelte Exzitotoxizität (Huang et al., 2006, Ruocco et al., 1999).

Abschließend kann man sagen, dass inflammationsbedingte Vorgänge wesentlich zur Gehirnschädigung beitragen, es konnten jedoch auch einige positive Effekte nachgewiesen werden, abhängig von der schon bestehenden Gewebeerstörung und der Stärke der Immunantwort oder direkt über verschiedene neuroprotektive Signalwege (Nawashiro et al., 2000, Zhang et al., 2000).

## 2.2 Das Endothelinsystem und seine Bestandteile

Das Endothelinsystem spielt bei der Regulierung des Blutdrucks und beim Schlaganfall eine wichtige Rolle. Hickey et al. bewiesen 1985 erstmals die Produktion vasoaktiver Substanzen aus dem Endothel (Hickey et al., 1985). Doch erst 1988 gelang es einer anderen Gruppe Endothelin-1 aus dem Überstand kultivierter Schweineaortazellen zu isolieren (Yanagisawa et al., 1988). Diese Substanz zeigte einen sehr starken gefäßverengenden Effekt, der sogar denjenigen von dem bis dahin als stärkstem vasokonstriktorischem Molekül bekannten Angiotensin II übertraf. Bis heute zählt Endothelin zu den stärksten Vasokonstriktoren (Ames et al., 1999).

Bereits ein Jahr später entdeckten Inoue et al. zwei weitere Isoformen, Endothelin-2 und -3, zusätzlich zu dem schon bekannten Endothelin-1 (Inoue et al., 1989). Alle 3 Peptide bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 2492 Dalton. Sie unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz in zwei (ET-1 und ET-2) bzw. sechs (ET-1 und ET-3) Positionen voneinander (Inoue et al., 1989). Die Endotheline sind an identischen Stellen mit je zwei Disulfidbrücken ausgestattet, wodurch die charakteristische Haarnadelform zustande kommt.



**Abbildung 2: Darstellung der Endotheline**

Aminosäuresequenz und schematische Darstellung der Haarnadelstruktur der 3 Endothelin-Isomere. Grün umrandete Aminosäuren sind die, in denen sich Endothelin-2 bzw. Endothelin-3 von Endothelin-1 unterscheiden.

Die Synthese und Freisetzung von ET-1, welches die am häufigsten vorkommende Isoform ist (Haynes and Webb, 1993), verläuft über folgende Zwischenschritte:

Das humane Endothelin-1-Gen (Endothelin-2 und -3 werden durch separate Gene kodiert) kodiert ein 212 Aminosäuren großes Peptid, das Präpro-Endothelin-1 (Yanagisawa et al., 1988, Dhaun et al., 2008). Dieses Präpro-Endothelin-1 wird durch Endopeptidasen, z.B. Furin (Schiffrin, 2005) an ganz spezifischen Stellen, an den Verbindungen Lysin-Arginin oder Arginin-Arginin, erkannt und proteolytisch gespalten. Durch diese Spaltungen entsteht das Pro-Endothelin (*big*-Endothelin), ein nur noch 38 - 39 Aminosäuren enthaltendes Peptid und Prohormon. Durch das Endothelin-Konversionsenzym (*Endothelin-converting enzyme, ECE*) wird dieses *big*-Endothelin zwischen Tryptophan an Stelle 21 und Valin an Stelle 22 in das aktive Endothelin-1 und ein C-terminales Fragment gespalten (Rubanyi and Polokoff, 1994, Dhaun et al., 2008). Bisher wurden zwei Typen des ECE gefunden: ECE-1 und ECE-2. Beide Enzyme sind strukturell mit den neutralen Endopeptidasen eng verwandt und gehören zu den Zink Metalloproteasen (Xu et al., 1994). Sie sind in der Membran von Endothelzellen (Xu et al., 1994), glatten Muskelzellen (Maguire et al., 1997, Rossi et al., 1999), Kardiomyozyten (Fukuchi and Giaid, 1998, Kobayashi et al., 1998) und Makrophagen (Fukuchi and Giaid, 1998, Minamino et al., 1997) lokalisiert. Man kann vier verschiedene Isoformen des ECE-1 unterscheiden: ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d, die alle von einem Gen kodiert werden und sich nur durch ihre N-terminale Aminosäure unterscheiden, die ihre Zelllokalisierung bestimmt (Valdenaire et al., 1999), wobei ECE-1b als einziges der vier Enzyme intrazellulär lokalisiert ist (D'Orleans-Juste et al., 2003). ECE-2 liegt ebenfalls intrazellulär am Golgi-Apparat (Emoto and Yanagisawa, 1995).

Die Expression von Präpro-ET-mRNA, und letztendlich die Sekretion von ET-1, konnte in Gefäßendothelzellen (abluminale Sekretion), glatten Gefäßmuskelzellen, proximalen und distalen Tubuluszellen, Mesangiumzellen, Gliazellen, Makrophagen, Mastzellen, Pituizyten, Bronchialepithelzellen, Tumorzellen und in den Augen durch verschiedene Faktoren stimuliert werden (Kohan, 1992, Lovenberg and Miller, 1990, Luscher et al., 1993b, Luscher et al., 1993a) :

- vasoaktive Substanzen (Adrenalin, Angiotensin II, Vasopressin, Bradykinin) (Luscher and Wenzel, 1995, Marsden et al., 1991, Yanagisawa et al., 1988)
- Zytokine (Interleukin-1, Transforming growth factor, Tumor Necrosis factor) (Kanase et al., 1991, Kohan, 1992)
- Thrombin, Insulin, Erythropoetin, Hypoxie, niedrige Scherbeanspruchung, ET-1 und ET-3 im Sinne einer positiven Rückkopplung und Pharmaka (z.B. Cyclosporin A) (Hoche et al., 1997a, Luscher et al., 1993b, Luscher et al., 1993a, Webb, 1997)

Eine Inhibition der ET-1 Sekretion wurde für den funktionellen Gegenspieler des Endothelins, das Stickstoffmonoxid (NO) (Hochoer et al., 1997a, Luscher et al., 1993b, Luscher et al., 1993a) und den Atrialen Natriuretischen Faktor (Saijonmaa et al., 1990), nachgewiesen. Stickstoffmonoxid als stärkster endogener Vasodilator und Endothelin-1, stärkster endogener Vasokonstriktor, bilden einen feinregulierten parakrinen/autokrinen Regelkreis mit negativer Rückkopplung. NO inhibiert über cGMP die thrombinstimulierte ET-1-Synthese und ET-1 stimuliert über seinen B-Rezeptor die NO-Synthese.

Spezifische Bindungsstellen für Endothelin wurden, außer an Zellen des Gefäßsystems, unter anderem auch am Nierengewebe, am Herzen und am Nervengewebe identifiziert (Lovenberg and Miller, 1990). Die Klonierung der cDNA dieser Bindungsstellen wurde 1990 beschrieben (Arai et al., 1990). Daraus lassen sich zwei Rezeptor-Subtypen, einer mit 427 (ETA-Rezeptor) und einer mit 415 (ETB-Rezeptor) Basenpaaren ableiten. Pharmakologische Untersuchungen mit ET-1 und ET-3 bestätigten die Differenzierung von zwei funktionell unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen in Säugetieren. Der ETA-Rezeptor zeigt gegenüber ET-1 eine große Affinität, die gegenüber ET-2 und ET-3 jeweils abnimmt (Hosoda et al., 1992). An Endothelzellen, aber auch an Zellen des glatten Gefäßmuskels und auf Makrophagen wurde der ETB-Rezeptor gefunden, der für alle Endothelin-Isoformen die gleiche Affinität aufweist (Sakurai et al., 1990). Die Polypeptidketten beider Rezeptoren durchlaufen siebenfach die Plasmamembran und enthalten Sequenzen für N-Glycosilierungen, damit gehören sie der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an (Hosoda et al., 1991, Sakurai et al., 1990).

An glatten Muskelzellen vermitteln beide Endothelinrezeptoren eine Vasokonstriktion. Über ein spezifisches G-Protein (GTP-bindendes Protein) wird die Phospholipase C aktiviert, die das membranständige Phosphoinositol-bisphosphonat (PIP<sub>2</sub>) in das wasserlösliche Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und in Diacylglycerin (DAG) aufspaltet. IP<sub>3</sub> löst eine kurzfristige Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) Freisetzung aus (Simonson and Dunn, 1990), während DAG die Ca<sup>2+</sup> abhängige Proteinkinase C aktiviert. Dies führt zum Beispiel an Herzmuskelzellen und Mesangiumzellen zu mitogenen Effekten (Simonson, 1993) und kann eine Zellproliferation und –hypertrophie vermitteln (Alberts et al., 1994). Gleichzeitig werden durch Bindung von Endothelin-1 an den Rezeptor spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Plasmamembran aktiviert, die zu einem anhaltenden Einstrom von Kalzium in die Zelle führen (Masaki et al., 1992). Dadurch wird erklärt, warum Kalziumantagonisten die Wirkung der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion teilweise wieder aufheben können (Kaasjager et al., 1995, Rabelink et al., 1994). Außerdem kann es am ETB-Rezeptor durch Bindung des Liganden zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, zur Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und konsekutiv zur Freisetzung

von Leukotrienen über die Arachidonsäurekaskade kommen (Griendling et al., 1989, Kasuya et al., 1989, Mizuguchi et al., 1997)

An Endothelzellen führt die Bindung von Endothelin an den ETB-Rezeptor jedoch zu einer Freisetzung von NO und Prostacyclin und damit zu einer Gefäßdilatation (Hirata et al., 1993, Schiffrin, 2005). Daher kommt es bei einer Endothelin Injektion *in vivo* initial auch zu einem Blutdruckabfall, dem allerdings kurze Zeit später ein Blutdruckanstieg folgt.

Neben dem vasokonstriktorisches und -dilatatorischen Effekt, wurden für Endothelin-1 auch zahlreiche andere Wirkungen nachgewiesen:

- Hemmung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate (Bloom et al., 1993)
- Hemmung der Reninfreisetzung und Blockade des antidiuretischen Effekts von Vasopressin an der Niere (Goetz et al., 1989, Rakugi et al., 1988)
- positive Inotropie und Chronotropie, sowie ANF-Freisetzung am Herzen (Fukuda et al., 1988, Ishikawa et al., 1988)
- cerebraler Vasospasmus nach Subarachnoidalblutungen (Mascia et al., 2001)
- Herzversagen (Torre-Amione et al., 2003)
- mitogene Effekte auf Zellkulturen von Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Mesangiumzellen (Simonson, 1993)

Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass speziell in der Niere auch autokrine und parakrine Wirkungen des Endothelins stattfinden (Kohan, 1997, Remuzzi and Benigni, 1993, Rubanyi and Polokoff, 1994).

Der Abbau des Endothelins findet über 3 verschiedene Wege statt (Simonson, 1993):

- Der hydrolytische Abbau durch neutrale Endopeptidasen
- Der Abbau in Lysosomen
- Der Abbau von zirkulierendem Endothelin in der Lunge (Dupuis et al., 1996), aber auch der Niere und der Milz (Attina et al., 2005), durch den ETB- Rezeptor (Dhaun et al., 2008).

Somit kann gesagt werden, dass Endothelin einen erheblichen Einfluss auf den Blutdruck hat (Oishi et al., 1994, Schiffrin et al., 1997) und damit auch in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen berücksichtigt werden muss. In verschiedenen Studien wurde bereits bewiesen, dass der Plasmaspiegel von Endothelin nach einem Schlaganfall deutlich ansteigt (Estrada et al., 1994, Ziv et al., 1992, Giannopoulos et al., 2008) und Schädigungen des Gehirns nach einem Schlaganfall zum Teil auf eine massive Endothelin Freisetzung zurückzuführen sind (Reid et al., 1995). Unter normalen Umständen spielt Endothelin bei der Regulierung des zerebrovaskulären Blutflusses keine Rolle und man geht davon aus, dass

es hier normalerweise nicht von dem Gefäßendothel freigesetzt wird (Koedel et al., 1998). Die normale Endothelinkonzentration im Plasma eines Menschen liegt bei ca. 3,68 pmol/l, nach einem Schlaganfall steigt dieser Wert bis auf 19,63 pmol/l an (Giannopoulos et al., 2008). Die hohe Endothelinkonzentration nach einem Schlaganfall kommt zum einen durch eine vermehrte Abgabe aufgrund erhöhten Stresses, andererseits durch die Freisetzung zerstörter Endothelzellen in dem ischämischen Gebiet zustande (Giannopoulos et al., 2008). Stenman et al. konnten nachweisen, dass ETB-Rezeptoren nach einem Schlaganfall vermehrt auf der betroffenen Seite in glatten Muskelzellen exprimiert werden (Stenman et al., 2002), wodurch es zu einer verstärkten Kontraktion der Gefäße und damit auch zu verminderter Durchblutung kommt. Diese vermehrte Expression kann verschiedene Ursachen haben, einerseits kann die bei einem Schlaganfall entstehende Inflammation (Leseth et al., 1999, Stenman et al., 2002) Auslöser sein und/ oder die Dehnung der Gefäße aufgrund des Ödems (Cattaruzza et al., 2000).

Auf jeden Fall wurde in verschiedenen Versuchen gezeigt, dass eine Blockade der ETA- oder der ETB- Rezeptoren zu einer Verringerung der neurologischen Schäden nach einem akuten Schlaganfall führt (Dawson et al., 1999, Zhang et al., 2005, Matsuo et al., 2001). Durch die Blockade der Rezeptoren kann der Abfall des zerebralen Blutflusses nach einem Schlaganfall verringert und damit die Reperfusion der ischämischen Gebiete verbessert werden (Barone et al., 2000, Roux et al., 1995). Durch eine kombinierte ETA- und ETB-Rezeptor Blockade konnten die Schädigungen des Gehirns nach einem Schlaganfall um 30% reduziert werden (Barone et al., 1995). Auch in Tiermodellen mit maligner Hypertonie konnte durch die Blockade des ETA-Rezeptors das Überleben der Tiere deutlich verlängert werden, der Blutdruckanstieg ebenso wie das Auftreten von Schlaganfällen wurden verzögert und zerebrale Ödeme wurden verhindert (Blezer et al., 1999).

Da der ETB-Rezeptor jedoch auch an dem Abbau von Endothelin-1 beteiligt ist, führt eine Blockade dieses Rezeptors auch immer zu einem Anstieg der Endothelin-1 Plasma Konzentration, was eine Erklärung sein könnte, warum bei einer Hemmung nur dieses Rezeptors oft die gewünschte Wirkung ausblieb (Chuquet et al., 2002, Patel and McCulloch, 1996).

Da das Endothelinsystem also offensichtlich eine wichtige Rolle bei den einer Ischämie folgenden Prozessen spielt und man durch eine Blockade dieses Systems das Vorkommen und die Schäden eines Schlaganfalls positiv beeinflussen könnte, muss nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, um dieses System zu unterbrechen. Ein neuer, viel versprechender Ansatz könnte die Blockade des *Endothelin-converting-enzymes* sein, da es so zu einer Verringerung der Endothelin-1 Produktion kommt, ohne die abbauende Wirkung

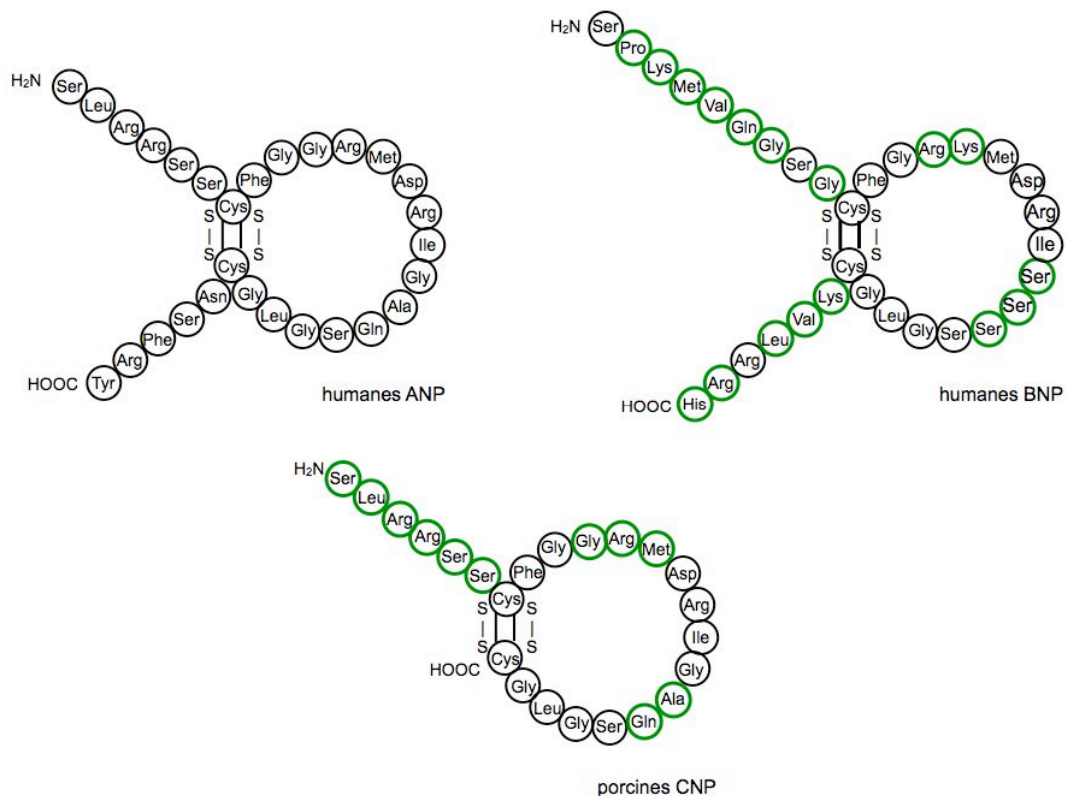
des ETB-Rezeptor zu beeinflussen (Dhaun et al., 2008). Ein Medikament mit einer solchen Wirkung wäre SLV338.

### 2.3 Die natriuretischen Peptide

Die natriuretischen Peptide sind eine Gruppe von verschiedenen Peptidhormonen, dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), dem brain natriuretischen Peptid (BNP), dem C-Typ natriuretischen Peptid (CNP), dem Dendroaspis natriuretischen Peptid (DNP) und dem Urodilatin, die große Ähnlichkeiten in Struktur und Wirkung aufweisen.

1981 wurde ANP zum ersten Mal als vasodilatierende, natriuretische Substanz aus Kardiomyozyten des Vorhofs, daher der Name, und aus Arterien von Ratten isoliert (de Bold et al., 2001). 3 Jahre später wurde die Struktur identifiziert (Kangawa and Matsuo, 1984) und 1988 wurde ein weiteres Peptid, das BNP, zuerst im Gehirn, aber eigentlich kardialen Ursprungs, entdeckt (Saito et al., 1989). 1990 fand man das CNP, das im Endothel und im Gehirn synthetisiert wird (Brown and Zuo, 1993, Komatsu et al., 1991). Im Gift der grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) entdeckte man ein viertes Peptid, das dendroaspis natriuretic peptide oder D-Typ natriuretisches Peptid (DNP) (Schweitz et al., 1992). Im Menschen konnte es bisher noch nicht direkt nachgewiesen werden, allerdings wurde eine DNP-ähnliche Immunoreaktion in humanem Plasma festgestellt (Schirger et al., 1999). Im menschlichen Urin wurde noch ein fünftes, offensichtlich auch zu der Gruppe der natriuretischen Peptide gehörendes, Peptid gefunden, das Urodilatin (Chen and Burnett, 2006). Da über das DNP und das Urodilatin bisher jedoch relativ wenig bekannt ist, spielen sie eher eine untergeordnete Rolle.

Alle Peptidhormone sind aus einer Ringstruktur aufgebaut, mit einer Disulfidbrücke (Chen and Burnett, 2006) und einer amino- und einer carboxyterminalen Kette, die sich in Länge und Sequenz bei den einzelnen Peptiden voneinander unterscheidet. Die Ringstruktur aus 17 Aminosäuren ist bei den unterschiedlichen natriuretischen Peptiden zu großen Teilen identisch und wurde als der Teil identifiziert, der für die Rezeptorerkennung und dadurch auch für die Wirkung verantwortlich ist (Inagami et al., 1987, Mair, 2008, Suzuki et al., 2001).



**Abbildung 3: Darstellung der natriuretischen Peptide**

Aminosäuresequenz und schematische Struktur der natriuretischen Peptide. Die grün umrandeten Aminosäuren sind die, in denen sich BNP und CNP von ANP unterscheiden.

Ähnlich wie Endothelin werden die natriuretischen Peptide zuerst in einer präpro - Form freigesetzt und es sind 2 proteolytische Spaltungen nötig, bis das natriuretische Peptid in seiner aktiven Form vorliegt (Wu et al., 2008). Bei der ersten Spaltung wird ein Signalpeptid von der pro- Form abgespalten und diese wird, im Falle von ANP, anschließend in sekretorischen Granula gespeichert. Durch die Serin- Protease Corin erfolgt während der Sekretion aus den Granula die Spaltung in das aktive C- und das inaktive NT- terminale Fragment (Knappe et al., 2004, Knappe et al., 2003, Wu et al., 2008, Yan et al., 2000). Im Gegensatz zu ANP wird BNP nicht erst in Granula gespeichert, sondern direkt in das Plasma abgegeben (Kolloch and Offers, 2001, Mair, 2008) und zusätzlich zu der Prohormon Convertase Corin auch von Furin gespalten (Mair, 2008, Wu et al., 2002). Die Bildung der natriuretischen Peptide erfolgt hauptsächlich in den Kardiomyozyten, bei ANP in denen des Atriums, bei BNP auch in Kardiomyozyten des Ventrikels (Currie et al., 1983, Suzuki et al., 2001, Hasegawa et al., 1993). Zu einem geringen Anteil wird ANP auch in den Nieren, dem Nebennierenmark und dem ZNS synthetisiert (Forssmann et al., 1998, Saper et al., 1985), BNP auch in kardialen Fibroblasten (Tsuruda et al., 2002) und, obwohl es dort entdeckt wurde, nur zu einem sehr geringen Anteil im ZNS (Saper et al., 1985).



Die Freisetzung der natriuretischen Peptide wird hauptsächlich durch eine erhöhte Dehnung des Vorhofes, bzw. der linken Kammer ausgelöst (Mair, 2008, Levin et al., 1998), aber auch durch verschiedene andere Stimuli, z.B. Ischämie und Hypoxie, Endothelin-1, Angiotensin II und Interleukine (LaPointe, 2005). Gehemmt wird die Freisetzung durch NO und Adrenomedullin (Sato et al., 1997).

Die Wirkungen, Natriuresis, Diuresis und Vasodilatation, der natriuretischen Peptide werden über zwei Rezeptoren vermittelt, den natriuretischen Peptid Rezeptor - A (NRP-A) und den natriuretischen Peptid Rezeptor - B (NRP-B). Beide Rezeptoren sind in einer Vielzahl von Organen zu finden: der Niere, dem Herzen, dem Gehirn, dem Endothel, der Lunge, den Augen, den Nebennieren, der Plazenta und dem Gastrointestinaltrakt (Hollister et al., 1989, Matsukawa et al., 1999, Mair, 2008). Es sind transmembranöse Guanylatcyclase – Rezeptoren, die bei Aktivierung durch Bindung von ANP, BNP und CNP die Synthese von cGMP steigern (Hess et al., 2005, Kolloch and Offers, 2001). cGMP wiederum aktiviert intrazelluläre, cGMP abhängige Proteinkinasen, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen und vermittelt darüber die Wirkung der natriuretischen Peptide (Lincoln and Cornwell, 1993). Der NPR-A hat eine deutlich höhere Affinität für ANP und BNP (Schulz et al., 1989, Rubattu et al., 2008), während CNP hauptsächlich an den NPR-B bindet, der auch nur eine geringe Affinität für ANP und BNP aufweist (Koller et al., 1991, Rubattu et al., 2008).

Die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor wird durch eine Dephosphorylierung des Rezeptors wieder gelöst, die einerseits durch die Bindung mit natriuretischen Peptiden selbst ausgelöst wird, aber auch durch Angiotensin II oder Endothelin-1 provoziert werden kann, was eine Wirkungsabschwächung der natriuretischen Peptide zur Folge hat (Tremblay et al., 2002). Besonders bei Krankheiten bei denen diese Substanzen erhöht sind, z.B. bei Herzinsuffizienz oder Schlaganfall, spielt dieser Vorgang eine wichtige Rolle.

Ein weiterer Rezeptor ist der natriuretische Peptid Rezeptor – C (NPR-C), er funktioniert als Clearance-Rezeptor für die natriuretischen Peptide und wird in fast allen Geweben gefunden (Mair, 2008). Nach Bindung von ANP, BNP oder CNP wird der Ligand-Rezeptor Komplex internalisiert und das natriuretische Peptid durch Lysosomen abgebaut (Kolloch and Offers, 2001, Pandey, 1992, Silberbach and Roberts, 2001). Der Rezeptor wird anschließend wieder auf der Zelloberfläche exprimiert (Nussenzweig et al., 1990). Über den NPR-C wird neben dem Abbau von natriuretischen Peptiden auch eine Hemmung der Adenylatzyklase und damit eine Reduktion von cAMP und eine Aktivierung der Phospholipase C vermittelt (Hempel et al., 1998, Murthy and Makhlof, 1999).

Der Abbau der natriuretischen Peptide erfolgt nicht nur über den NPR-C, sondern auch über die neutrale Endopeptidase (NEP), einem membranständigen, extrazellulär ausgerichteten Enzym, das die Ringstruktur der natriuretischen Peptide zerstört (Mair, 2008). Sie gehört,

ebenso wie das Endothelin-converting enzyme (ECE) zur Familie M13 der Metalloendopeptidasen, deren Gemeinsamkeit ist, dass sie als Co-Faktor Zink binden (Devault et al., 1988). Damit ist auch die NEP am Abbau von Endothelin-1 beteiligt (Abassi et al., 1993). Hauptsächlich ist sie im proximalen Tubulus der Niere zu finden, aber auch im Gefäßendothel, der Lunge und dem Herzen (McGrath et al., 2005). Unter physiologischen Bedingungen ist der enzymatische Abbau eher gering, verglichen mit dem Abbau über den NPR-C, steigt jedoch die Konzentration natriuretischer Peptide, steigt auch der enzymatische Abbau durch die NEP (Hashimoto et al., 1994, Rademaker et al., 1997). Über negative Rückkopplung wird die NEP-Expression durch cGMP gesteigert und somit auch der Abbau natriuretischer Peptide (Ardaillou et al., 1992).

Die Wirkung der natriuretischen Peptide ist, wie schon ihre Rezeptorlokalisierung vermuten lässt, vielfältig. ANP bewirkt über den NPR-A an der Niere eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate bei gleichzeitiger Reduktion der Natrium- und Wasserretention und Hemmung der Reninausschüttung (Potter et al., 2006, O'Connell et al., 1992). Zusätzlich zu dieser Natriuresis wirkt es durch cGMP und NO Freisetzung vasorelaxierend (Burnett et al., 2004, Potter et al., 2006). Diese beiden Effekte führen zu einer Senkung des Blutdruckes bei ANP Applikation (Weidmann et al., 1986), bzw. zu einem erhöhten Blutdruck bei Mäusen mit genetisch fixiertem ANP - Mangel (John et al., 1995). Des Weiteren wird durch ANP die Gefäßpermeabilität erhöht und darüber das intravaskuläre Volumen erniedrigt (Potter et al., 2006) was ebenfalls zu einem Abfall des Blutdruckes führt. Mäuse, denen der NPR-A Rezeptor fehlte, waren leicht hypertensiv und ihr Blutvolumen war erhöht (Sabrane et al., 2005). Ein antifibrotischer und antihypertropher Effekt am Herzen zählt ebenso zu den Wirkungen der natriuretischen Peptide (Burnett et al., 2004, Potter et al., 2006), wie die Hemmung der Freisetzung inflammatorischer Cytokine wie  $TNF\alpha$  und IL-12 (Kierner et al., 2000, Morita et al., 2003). CNP scheint eher eine parakrine Wirkung zu haben (Silberbach and Roberts, 2001, Ahluwalia et al., 2004) und bewirkt über den NPR-B eine Vasorelaxation durch gesteigerte cGMP Freisetzung in den glatten Gefäßmuskelzellen (Wennberg et al., 1999).

Da die natriuretischen Peptide somit an der Regulierung des Blutdruckes beteiligt sind, ist es verständlich, dass sie auch bei Krankheiten, die mit erhöhtem Blutdruck einhergehen oder durch ihn bedingt sind, eine Rolle spielen. Bei Herzinsuffizienz kommt es z.B. durch die erhöhte Wandspannung zu einer deutlich vermehrten Freisetzung der natriuretischen Peptide. BNP ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei dieser Krankheit (Mair, 2008, Mair et al., 2001), da seine Plasmakonzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Yamada et al., 1997, Cowie and Mendez, 2002). Hohe BNP Konzentrationen sind Anzeichen für Myokardinfarkt, linksventrikuläres Herzversagen und

sogar Mortalität (Jernberg et al., 2003, Sabatine et al., 2002, Campbell et al., 2005, Rubattu et al., 2008). Doch auch bei Vorgängen die während oder anschließend an einen Schlaganfall ablaufen spielen die natriuretischen Peptide eine Rolle, und die BNP Konzentrationen sind nach einem Schlaganfall erhöht (Di Angelantonio et al., 2007). Akdemir zeigte, dass ANP den intrakranialen Druck nach einer zerebralen Ischämie durch Verringerung des Gehirnödems senken kann (Akdemir et al., 1997) und es wegen seiner zusätzlich vasodilatierenden und diuretischen Wirkung einen möglichen protektiven Wirkstoff darstellt. In Dahl – Salz sensitiven Ratten konnte durch ANP die Mortalität auf Grund von Schlaganfall verringert und der Anstieg des Blutdruckes verzögert werden (Lin et al., 1999).

Eine Blockade der neutralen Endopeptidase führt zu einem Anstieg der natriuretischen Peptide, gleichzeitig wird dadurch aber auch der Abbau von Endothelin vermindert. Durch SLV338 wird jedoch nicht nur die NEP gehemmt, sondern auch das ECE, so dass es schon zu einer verminderten Produktion von Endothelin-1 kommt.

## 2.4 Die Tiermodelle

Genauere Untersuchungen zu bestimmten Krankheiten des Menschen und Tests von Medikamenten und neuen Substanzen werden häufig erst im Tiermodell durchgeführt und anschließend auf den Menschen übertragen. Damit dies möglich ist, müssen im Tier ähnliche Krankheitsbedingungen geschaffen werden, wie sie im Menschen vorliegen.

Für Untersuchungen des Schlaganfalls gibt es verschiedene Modelle, von denen zwei am häufigsten Anwendung finden: die *middle cerebral artery occlusion*, eine operative Induktion des Schlaganfalls für Interventionsstudien und das Modell der SHR-SP, Ratten mit Bluthochdruck und erhöhtem Risiko für zerebrovaskuläre Erkrankungen, die so die Situation im hypertensiven Patienten widerspiegeln (Davidson et al., 1995).

### 2.4.1 MCAO

Die operative Schlaganfallinduktion in der Ratte ist eine Methode, die nicht nur eingesetzt wird, um die verschiedenen Abläufe, die während und nach einem Schlaganfall auftreten, genauer untersuchen zu können, sondern auch zur Überprüfung der Wirksamkeit neuer Substanzen.

Es sind verschiedene Methoden bekannt, um einen Hirninfarkt im Tier zu induzieren (Kogure et al., 1974, Koizumi et al., 1986, Overgaard et al., 1992, Robinson et al., 1975), die alle folgende Bedingungen erfüllen müssen: die Methode muss reproduzierbar sein, d.h. bei gleicher Operation sollte der Infarkt eine ähnliche Größe haben und im gleichen Hirngebiet liegen, zwischen den einzelnen Tieren und mit der Situation im Menschen vergleichbar und dabei möglichst schonend für das Tier sein. Nach Berücksichtigung dieser Faktoren hat sich

der intraluminale Verschluss der mittleren Zerebralarterie (*intraluminal middle cerebral artery occlusion, MCAO*) durchgesetzt und ist heute die am häufigsten angewendete Methode bei Untersuchungen zur fokalen zerebralen Ischämie (Bardutzky et al., 2005). Die MCAO ist leicht durchführbar, das Gewebe außerhalb des Infarkts wird relativ wenig geschädigt und die Tiere entwickeln ausreichend große, vergleichbare Infarkte mit deutlicher Penumbra, was diese Methode besonders für Wirksamkeitsstudien neuer Substanzen bedeutsam macht (Cam, 2004).

Die *middle cerebral artery occlusion* wurde erstmals 1986 beschrieben (Koizumi et al., 1986) und ist inzwischen häufig modifiziert und verbessert worden (Longa et al., 1989, Takano et al., 1997, Belayev et al., 1995). Grundprinzip dieser Operation ist es, durch einen in der *A. carotis interna vorgeschobenen*, monofilen Nylonfaden den Abgang der *A. cerebri media* zu verschließen, so dass es in deren Versorgungsgebiet zu einer Ischämie und damit zu einem Schlaganfall kommt. Die Dicke des Fadens, wie weit er vorgeschoben wird, ob eine Reperfusion stattfindet, indem man nach einer bestimmten Zeit den Faden wieder heraus zieht, wie lange diese Zeitspanne ist oder ob es ein permanenter Verschluss der Arterie ist, dies sind Parameter, die die Größe und Lage des Schlaganfalls beeinflussen (Li et al., 1999, Lipton, 1999, Zhang et al., 2004, Bouley et al., 2007) und in verschiedenen Studien unterschiedlich gewählt werden. Neben den erwähnten verschiedenen Operationsmethoden, konnte auch ein Einfluss der Anästhesie (Baughman et al., 1988, Soonthon-Brant et al., 1999) und des Rattenstammes (Duverger and MacKenzie, 1988, Walberer et al., 2006) auf die experimentellen Ergebnisse nachgewiesen werden..

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde ein 4-0 monofiler Nylonfaden gewählt, dessen Spitze mit Kunststoff umhüllt und 18 mm weit distal der Bifurcation der *A. carotis communis* in die *A. carotis interna* vorgeschoben wurde. Nach 90 min wurde der Faden heraus gezogen und es fand eine Reperfusion des geschädigten Gebiets statt (Groth et al., 2003, Krikov et al., 2008, Schmerbach et al., 2008). Durch diese Reperfusion kommt es zu ähnlichen Vorgängen in der Ratte wie sie im Menschen nach einem vorübergehenden "Media-Infarkt" ablaufen (Dai et al., 1999, Groth et al., 2003, Li et al., 2005b).

Da bei dieser Operation nur die *A. cerebri medii* der einen Seite verschlossen wird, kommt es zu einer fokalen zerebralen Ischämie, bei der die contralaterale Hemisphäre des Gehirns weitestgehend unbeschädigt bleibt und so auch ein Vergleich zwischen ipsi- und contralateraler Seite möglich ist. Da bei dieser Arbeit die Kontrollgruppen in den MCAO Studien mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt wurden, wurde in einer zusätzlichen Studie der Einfluss verschiedener als Lösungsmittel genutzter Substanzen auf das Auskommen nach einer *middle cerebral artery occlusion* untersucht.

### 2.4.2 SHR-SP

Bei den SHR-SP handelt es sich um einen Inzuchtrattenstamm mit genetisch fixiertem Bluthochdruck und einer Salzsensitivität, die gehäuft zu Schlaganfällen führt (Nagaoka et al., 1976, Okamoto et al., 1974, Rothermund et al., 2001). Dieser Stamm wurde aus spontanhypertensiven Ratten in Kyoto ab 1970 von Yamori und Okamoto als SHR-SP-Ratte herausgezüchtet. Hierbei wurde eine selektive Inzucht von SHR- Nachkommen vorgenommen, deren Eltern an einem Schlaganfall verstorben waren (Okamoto et al., 1974). Die SHR wiederum stammen ursprünglich von spontan hypertensiven Wistar Kyoto Ratten ab (Okamoto and Aoki, 1963).

Die Ratten entwickeln im Alter von 12 bis 15 Wochen eine spontane Hypertonie bis zu 240 mmHg und erkranken in den folgenden Monaten an Endorganschäden, insbesondere vaskulärer und kardialer Hypertrophie, Myokardfibrose und Glomerulosklerose, an denen sie versterben (Devlin et al., 1995, Kashgarian, 1985). Durch eine Salzdiät mit 4% NaCl und 0,75% Kalium im Futter und 1% NaCl im Trinkwasser wird jedoch die Manifestation zerebraler Infarkte auf über 80% deutlich erhöht (Nagaoka et al., 1976, Okamoto et al., 1974, Yamori, 1991).

Da sowohl der genetische Einfluss, als auch der Einfluss äußerer Bedingungen für die Entstehung der Hypertonie, deren pathophysiologische Entwicklung und Verlauf mit den bekannten kardiovaskulären Folgeerkrankungen bei diesem Stamm ähnlich sind wie beim Menschen, wird dieses Modell häufig für Untersuchungen zur essentiellen Hypertonie und damit assoziiertem Schlaganfall eingesetzt. Histologische Untersuchungen von Gehirnen der SHR-SP zeigten Veränderungen in den zerebralen Gefäßen, die als fibrinoide Nekrose bezeichnet und wahrscheinlich durch eine vermehrte Aktivität von Makrophagen ausgelöst werden (Nagaoka et al., 1979, Ogata et al., 1982, Yamori, 1989). Die gleichen Veränderungen konnten auch beim Schlaganfall im Menschen nachgewiesen werden (Tournier-Lasserre et al., 1993).

Genauere Untersuchungen zur Pathologie des Schlaganfalls in SHR-SP zeigten, dass es zu einer deutlichen Reduzierung des zerebralen Blutflusses kommt, sogar noch bevor erste neurologische Störungen auftreten (Mies et al., 1999). Später kommt es weiterhin zu einer gestörten Permeabilität der Gefäße durch Anschwellen der Perizyten (Tagami et al., 1991, Tagami et al., 1990), ebenso wie endothelialen Dysfunktionen, z.B. einer verminderten Antwort der Gefäße auf vasodilatierende Substanzen (Volpe et al., 1996).

Durch diese pathogenetische Ähnlichkeit zwischen der Entwicklung eines Schlaganfalls und dessen späterem Verlauf in SHR-SP und Mensch eignet sich dieses Tiermodell gut für Studien zur Schlaganfallprävention.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

*Rattus norvegicus*; Männliche Wistar Ratten Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland  
(Stamm: Hsd Cpb: Wu)

*Rattus norvegicus*; Männliche SHR-SP Charles River Laboratories, Sulzfeld,  
(Stamm: SHRSP/A3NCrl) Deutschland

##### 3.1.2 Test- und Referenzsubstanzen

###### 3.1.2.1 Phosphat – Puffer Lösung (PBS)

Bezugsquelle PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Lagerung Trocken, bei 4°C

###### 3.1.2.2 SLV338

Bezugsquelle Solvay Pharmaceuticals, Hannover, Deutschland

Lagerung In dunklen Glasflaschen, trocken bei Raumtemperatur

Lösung Studie A + B: Die benötigte Substanzmenge pro Tag wurde abgewogen, eine definierte Menge PBS (bestimmt durch das Füllvolumen der ALZET® Minipumpen) zugegeben und durch Schütteln gelöst.

Studie C: Die Substanz wurde bei der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, in der errechneten Menge dem Futter bei der Herstellung zugegeben (Futtermenge pro Tier/Tag: 20 g; Dosierung 30 mg/kg/Tag oder 100 mg/kg/Tag und einem Gewicht der Ratte von 300g). Das Futter wurde trocken und kühl gelagert.

Die Substanz SLV338 ist eine Nachfolgesubstanz der SLV306 (Daglutril; CAS-no.: 182821-27-8), ebenfalls ein NEP und ECE Inhibitor und gehört zu der Klasse der Benzazepine.

**3.1.2.3 5% Glukoselösung**

Bezugsquelle Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lagerung	In lichtundurchlässigen Plastikflaschen, trocken bei Raumtemperatur
Bezugsquelle Wasser ad injectionem (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Lagerung	In Glasflaschen, trocken bei 4°C
Lösung	Die benötigte Menge Glukose für eine 5% Glukoselösung wurde abgewogen und mit Wasser ad injectionem auf die gewünschte Menge aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert unter ständigem Rühren auf einem Magnetprüher eingestellt (zwischen 7,2 und 7,4). Die so hergestellte Lösung wurde sofort verwendet.

**3.1.2.4 SLV334**

Bezugsquelle SLV334	Solvay Pharmaceuticals, Hannover, Deutschland
Lagerung	In dunklen Glasflaschen, im Exsikkator bei Raumtemperatur
Lösung	Die benötigte Menge SLV334 wurde in der 5% Glukoselösung und ständigem Rühren (Magnetprüher) gelöst und der pH-Wert eingestellt (7,2 – 7,4). Die so hergestellte Lösung wurde sofort verwendet.

**3.1.3 Verbrauchs – und Operationsmaterial**

Alle nicht hier aufgeführten Materialien wurden über den Einkauf der Charité bezogen.

Allgemein:

Eppendorf Gefäß (500 µl, 1,5ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Falcon™ tubes 15 und 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glaspipetten (verschiedene Größen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetten (verschiedene Größen)	Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

## Material und Methoden

### In vivo Versuche:

Alzet <sup>®</sup> Osmotische Minipumpen	Durect Corporation, Cupertino, USA
EDTA –K Probengefäß 500 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
EDTA –K S-Monovetten <sup>®</sup> 4,9 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Kanülen Microlance <sup>®</sup> (verschiedene Größen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kanülen Sterican <sup>®</sup> (verschiedene Größen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kunststoff light base	Heraeus Kulzer Inc., Armonk, USA
Kunststoff light catalyst	Heraeus Kulzer Inc., Armonk, USA
Nahtmaterial Ethilon, nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nahtmaterial Prolene <sup>®</sup> , nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nahtmaterial Terylene, nicht resorbierbar, geflochten, 4-0	Serag Wiessner, Naila, Deutschland
Operationsbesteck	FST, Fine Science tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Operationsbesteck	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Polyethylene-Schlauch (PE-60, Inside diameter: 0,72; Outside diameter: 1,22)	Durect Corporation, Cupertino, USA
S-Monovetten <sup>®</sup> Kanülen 22G	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen Discardit <sup>™</sup> (verschiedene Größen)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritzen Omnifix <sup>®</sup> 1ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

### Immundiagnostik:

Menzel Deckgläschen	Menzel GmbH & CoKg, Braunschweig, Deutschland
SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland



### 3.1.4 Geräte

#### Allgemein:

Analysenwaage BL 1500S	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage BL 310	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage PK 2401	Denver Instrument, Denver, USA
Magnetrührer RET basic C	IKA – Werke, Staufen, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Präzisionswaage SC2	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

#### In vivo Versuche:

Isofluran Verdampfer bei MRT und Operation	Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland
Linux – HP – workstation	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Germany
Model 1025 Monitoring & Gating System	SA Instruments, Inc., Stony Brooks, USA
NIBP controller zur Blutdruckbestimmung	ADInstruments GmbH, Spechtbach, Deutschland
PharmaScan 70/16 MRT Gerät	Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland
PowerLab® zur Blutdruckmessung	ADInstruments GmbH, Spechtbach, Deutschland
Radiometer ABL 555 zur Blutgasanalyse	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Wärmeplatte	Angefertigt von Frau B. Röder, CCR, Charité, Berlin, Deutschland

#### Immunhistochemie:

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryostat CM 1900	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

### 3.1.5 Medikamente, Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien waren von *p.a.* Qualität.

#### Allgemein:

Para-Formaldehyd	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphat-Puffer Lösung (PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

#### In vivo Versuche:

Atemstimulanz (Respirot <sup>®</sup> )	Novartis, Basel, Schweiz
Buprenorphin (Temgesic <sup>®</sup> )	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Desinfektionsmittel (Softasept <sup>®</sup> )	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Haltungsfutter (Studie A, B, D)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Hochsalzdiät (Studie C)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott GmbH & Co Kg, Wiesbaden, Deutschland
Ketaminhydrochlorid/ Xylazinhydrochlorid – Lösung K113	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sauerstoff, medizinisch	Hausversorgung

#### Immunhistochemie:

4',6'- Diamino –2 – pherylindol –HCl (DAPI)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Eindeckmedium Hydromount	Dia Tec, Hallstedt, Deutschland
NeuroTrace <sup>™</sup> Nissl Färbung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Jung Tissue Freezing Medium	Leica-Microsystems, Nussloch, Deutschland
Triton – X 100	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 3.1.6 Software

Analyzes 5.0	AnalyzeDirect Inc, Lenexa, USA
Display Software	SA Instruments, Inc., Stony Brook, USA
GraphPad Prism® 4.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft® Excel X	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ParaVision® 4.0	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany
Software LabChart	ADInstruments GmbH, Spechtbach, Deutschland
Software Openlab 3.1.7	Improvizion®, Coventry, UK
Statistikprogramm SPSS	SPSS GmbH Software, München, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierexperimentelle Grundlagen

Die Versuche am Tier wurden als Versuchsvorhaben G0161/06 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt und in der Tierhaltung des CCR (Center for Cardiovascular Research, Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pharmakologie, Hessische Str. 3-4, 10115 Berlin) durchgeführt.

Die Ratten wurden mit SPF Status vom Lieferanten bezogen und unter standardisierten Bedingungen (22°C, 55% absolute Luftfeuchtigkeit, 3-4 Tiere/Typ IV Makrolonkäfig, 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus (Lichtphase von 7:00 Uhr – 19:00 Uhr) sowie freier Zugang zu Futter und Wasser) in einer SPF Barriere gehalten.

Die Untersuchung im MRT fand unter Leitung von Dipl. Ing. S. Müller im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NFWZ, Charité Universitätsklinikum Berlin, Schumannstrasse 21-22, 10115 Berlin) statt. Der Umgang mit den Tieren und ihre Behandlung wurde unter Berücksichtigung der Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde und in Anlehnung an die Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)* durchgeführt.

### 3.2.2 Studienaufbau und Durchführung

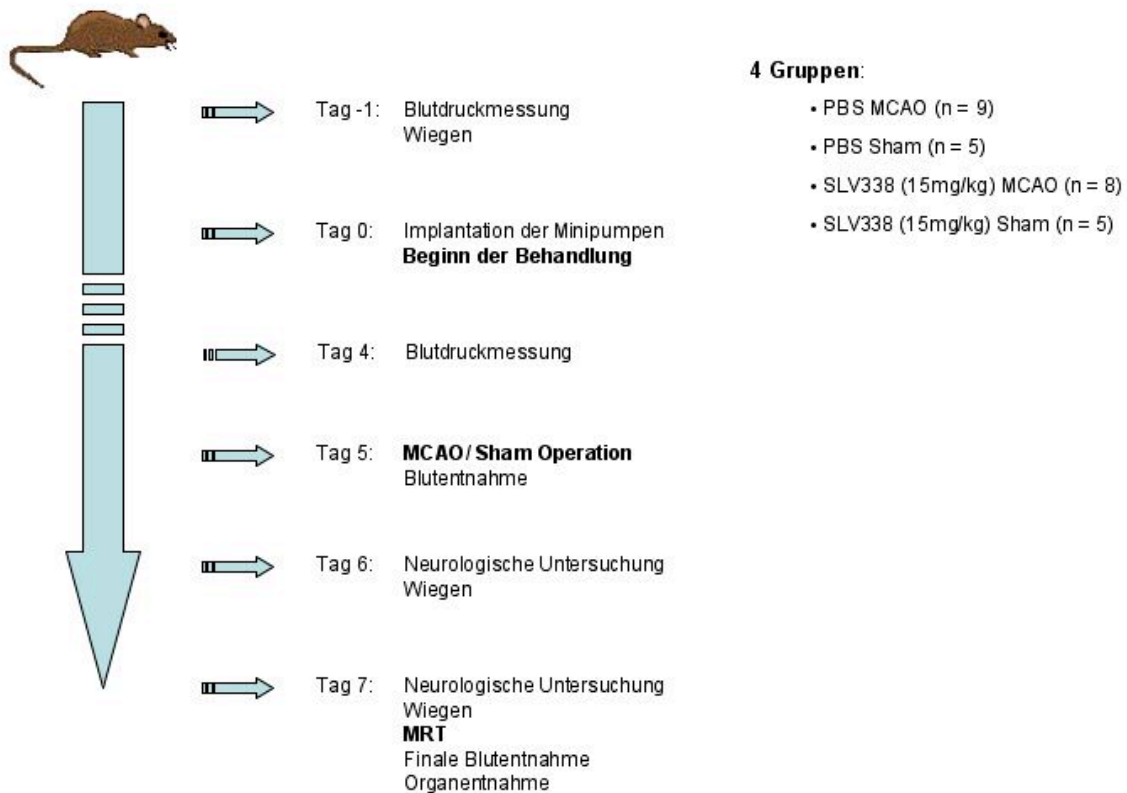
#### 3.2.2.1 Studie A

Die von Harlan Winkelmann bezogenen Tiere, mit einem Gewicht von  $200 \pm 10\text{g}$  ( $190 - 205\text{g}$ ) wurden in Vierergruppen gehalten. Nach einer Adaptationsphase zwischen 7 und 8 Tagen begann der Versuch mit der Messung des Blutdrucks der Tiere durch die nicht-invasive *tail cuff* Methode. Am darauf folgenden Tag (Tag 0) wurde den Tieren unter 2,5%iger Isofluran Narkose, bei einer Durchflussrate von 0,5 l/min, eine Pumpe an der seitlichen Körperwand subkutan implantiert. Durch diese Pumpen erfolgte die subkutane Behandlung der Ratten, bei 18 Tieren mit Phosphatpufferlösung (PBS) und bei 18 Tieren mit 15 mg/kg SLV338.

An Tag 4 wurde erneut der Blutdruck aller Tiere gemessen.

Nach 5 Tagen Vorbehandlung wurde bei 10 Tieren der PBS- und bei 11 Tieren der SLV338 – Gruppe die Schlaganfalloperation (MCAO), bei den restlichen Tieren eine Schein- (*Sham*-) Operation durchgeführt. Am Ende der Operation wurde den Tieren retrobulbär Blut zur Bestimmung der Blutgase entnommen.

Sowohl 24 h, als auch 48 h Stunden nach der Operation wurden alle Tiere mit Hilfe des *Garcia score systems* (Garcia et al., 1995) neurologisch untersucht und gewogen. Am Tag 7, 2 Tage nach der Operation, wurde das Schlaganfall – Volumen *in vivo* mit Hilfe des MRT ermittelt. Anschließend wurden die Tiere mit 4% Chloralhydrat (1ml/ 100g) IP euthanasiert und es wurden Blut (zur Bestimmung der SLV338 Plasmakonzentration), das Gehirn, die Nieren und das Herz entnommen.



### 3.2.2.2 Studie B

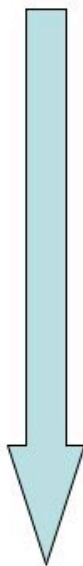
Wie auch in Studie A, wurden die Tiere mit einem Gewicht von  $210 \pm 10$ g von Harlan Winkelmann bezogen und in Vierergruppen gehalten. Nach einer Adaptationszeit von 5 Tagen wurde der Blutdruck mit Hilfe der *tail cuff* Methode gemessen. Am nächsten Tag wurde unter Narkose die Schlaganfall -, bzw. die *Sham* – Operation durchgeführt. Im Anschluss an diese Operation, während die Tiere noch in Narkose lagen, wurde ihnen seitlich am Körper subkutan eine Minipumpe eingesetzt und mit der *V. cava cranialis* für eine intravenöse Behandlung verbunden. 17 Tiere erhielten eine Behandlung mit PBS (12 x MCAO; 5 x *Sham*), 15 Tiere wurden mit 50 mg/kg SLV338 behandelt (9 x MCAO; 6 x *Sham*), 19 Ratten mit 50 mg/kg SLV334 (14 x MCAO; 5 x *Sham*) und 18 Ratten erhielten eine Behandlung mit einer 5% Glukose – Lösung (13 x MCAO; 5 x *Sham*), als Kontrollgruppe für die mit SLV334 behandelten Tiere.

Am Ende der Operation wurde allen Tieren Blut zur Bestimmung der Blutgase retrobulbär entnommen.

An Tag 1 und 2 wurden die Tiere neurologisch nach dem *Garcia score system* untersucht und gewogen.

## Material und Methoden

Das Schlaganfall – Volumen wurde 48 h nach der Operation *in vivo* im MRT bestimmt. Anschließend daran wurden die Ratten, wie in Studie A, mit 4% Chloralhydrat (1ml/ 100g) IP euthanasiert, es wurde final Blut abgenommen und das Gehirn, die Nieren und das Herz für spätere Untersuchungen entnommen. Auch hier wurde anschließend im Plasma die SLV338 Konzentration bestimmt.



### 8 Gruppen:

- PBS MCAO (n = 12)
- PBS Sham (n = 5)
- SLV338 (50 mg/kg) MCAO (n = 9)
- SLV338 (50 mg/kg) Sham (n = 6)
- 5% Glucose Lsg MCAO (n = 13)
- 5% Glucose Lsg Sham (n = 5)
- SLV334 (50 mg/kg) MCAO (n = 14)
- SLV334 (50 mg/kg) Sham (n = 5)

### 3.2.2.3 Studie C

79 *SHR-SP* (spontaneously hypertensive rats – stroke prone) Ratten im Alter von 7 Wochen mit einem Gewicht von  $130 \pm 10\text{g}$  wurden von Charles River bezogen und in Dreiergruppen gehalten.

Nach einer Adaptationsphase von 5 Tagen wurden die Tiere zufällig in 2 Gruppen mit jeweils 26 Tieren und einer Gruppe mit 27 Tieren aufgeteilt. Zur Ermittlung der Basalwerte wurden in der ersten Woche alle Tiere neurologisch nach dem *Garcia score system* untersucht und gewogen, der Blutdruck wurde durch die *tail cuff* Methode gemessen und jeweils 8 Tiere jeder Gruppe wurden für 12 Stunden in den metabolischen Käfig gesetzt. Hier wurden die Wasser- und Futteraufnahme sowie die Urinmenge bestimmt. Der Urin wurde gesammelt und zur Bestimmung verschiedener Parameter (cGMP, Albumin, Kreatinin und Harnstoff) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bevor die Tiere in den metabolischen Käfig gesetzt wurden, wurde ihnen, unter Narkose mit Ketamin, retrobulbär Blut zur Bestimmung von Endothelin-1, Big-Endothelin, BNP, Albumin, Kreatinin, Harnstoff und Elektrolyten, entnommen.

Ab der 2. Woche wurden alle Tiere auf eine Hochsalzdiät mit 1% NaCl im Trinkwasser und 4% NaCl und 0,75% K im Futter gesetzt. Gruppe 2 erhielt zusätzlich über das Futter eine Behandlung mit 30 mg/kg SLV338, Gruppe 3 eine Behandlung mit 100 mg/kg SLV338.

Jede 2. Woche wurde der Blutdruck der Tiere mit der *tail – cuff* Methode gemessen, jede Woche wurden sie gewogen. Die neurologische Beurteilung wurde zu Beginn jede 3. Woche durchgeführt, ab der 9. Woche jede Woche. Die Tiere wurden täglich auf Krankheitssymptome hin beobachtet.

Lagen das Ergebnis der neurologischen Beurteilung (siehe Abschnitt 4.2.7) einer Ratte unter 5 Punkten oder hatte sie einen Gewichtsverlust von mehr als 20%, wurde das Tier durch Chloralhydrat Injektion (4%) IP (1 ml/ 100g), getötet und Blut, Gehirn, beide Nieren und das Herz wurden entnommen.

In der 9. und der 22. Woche wurden erneut jeweils 8 Tiere jeder Gruppe, wenn möglich dieselben Individuen wie beim vorherigen Mal, für 12 Stunden in den metabolischen Käfig gesetzt, Blut- und Urinproben wurden genommen und die Wasser- und Futteraufnahme bestimmt.

Nachdem in Woche 28 69% der Tiere der Kontrollgruppe auf Grund eines Schlaganfalls oder den daraus entstehenden Folgen, gestorben waren und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen waren, wurde der Versuch beendet. Die überlebenden Tiere wurden mit Chloralhydrat euthanasiert und Blut, das Gehirn, beide Nieren und das Herz entnommen.

In dem Plasma der Tiere wurde die Konzentration von Endothelin-1, Big-ET, BNP und ANP bestimmt, sowie die SLV338 Konzentration.

Nach Versuchsende wurde zur Kontrolle der Gehalt von SLV338 in den unterschiedlichen Futtermischungen (ein Futter mit 0.45 mg/g Futter für die Behandlung mit 30 mg/kg und ein Futter mit 1.5 mg/g Futter für die Behandlung mit 100 mg/kg) bestimmt.

<b>Woche 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolischer Käfig</li> <li>• Blutdruck</li> <li>• Neurologische Untersuchung</li> <li>• n=26</li> </ul>
<b>Woche 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beginn der Hochsalzdiät</li> <li>• Beginn der Behandlung:             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gruppe ohne Behandlung (Kontrolle) n=26</li> <li>2. Gruppe 30 mg/kg SLV338 n=27</li> <li>3. Gruppe 100 mg/kg SLV338 n=26</li> </ol> </li> </ul>
<b>Woche 3 - 8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jede zweite Woche Blutdruckmessung</li> <li>• Jede dritte Woche neurologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Woche 9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolischer Käfig</li> <li>• Blutdruckmessung</li> <li>• Neurologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Woche 10 – 21</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jede zweite Woche Blutdruckmessung</li> <li>• Jede Woche neurologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Woche 22</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolischer Käfig</li> <li>• Blutdruckmessung</li> <li>• Neurologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Woche 23 – 27</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jede zweite Woche Blutdruckmessung</li> <li>• Jede Woche neurologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Woche 28</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Euthanasie der Ratten</li> <li>• Blut- und Organentnahme</li> </ul>

### 3.2.2.4 Studie D

Bei dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf das Schlaganfallvolumen, die neurologischen Schäden und die Mortalität getestet. Hierfür

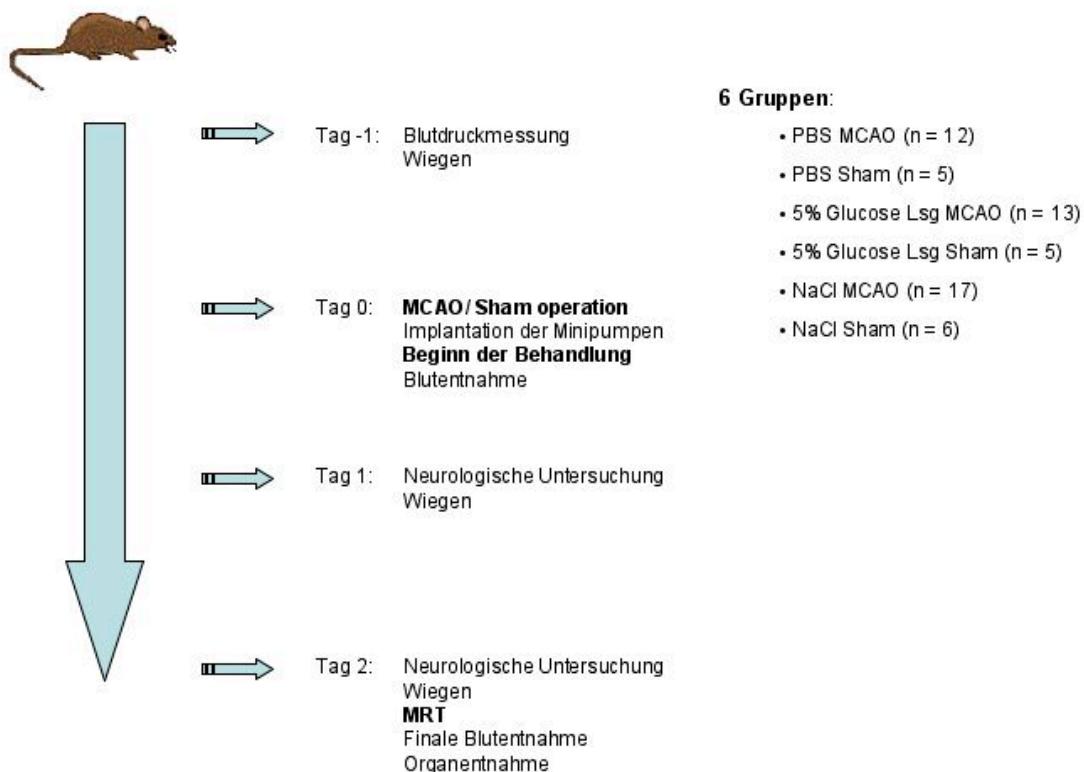


wurden die mit PBS und Glukoselösung behandelten Tiere aus Studie B genutzt und zusätzlich 23 Tiere mit NaCl behandelt und operiert (17 x MCAO; 6 x *Sham*).

Um die mit NaCl behandelten Tiere mit denen aus Studie B vergleichen zu können, wurden auch hier 24 und 48 Stunden nach der Operation die neurologischen Defizite bestimmt und die Tiere gewogen. Das Schlaganfall – Volumen wurde *in vivo* im MRT nach 48 Stunden bestimmt.

Anschließend wurden auch hier die Tiere euthanasiert und das Blut, das Gehirn, die Nieren und das Herz entnommen.

Die Gehirne aller Tiere aus diesen 6 mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelten Gruppen (PBS MCAO, PBS Sham, Glukose MCAO, Glukose Sham, NaCl MCAO, NaCl Sham) wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  *in toto* eingefroren. Später wurde der Bereich des Gehirns, in dem der Hippocampus liegt, als Scheibe ausgeschnitten und in Gewebekleber (tissue tek) eingebettet. Die eingebetteten Proben wurden am Kryostaten in  $6\text{ }\mu\text{m}$  dünne Präparate geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und zur Bestimmung der Neuronenzahl im Kortex mit Nisslfärbung gefärbt.



### 3.2.3 MCAO

Männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von  $220 \pm 15$  g (210 – 235 g) wurden für die Schlaganfalloperation in einer Box mit 5% Isofluran, bei einer Durchflussrate von 0,5 L/min in Narkose gelegt. Die anschließende Narkose wurde mit 2,5% Isofluran aufrechterhalten. Die Tiere lagen für die Operation auf einer von Fr. Röder (Mitarbeiterin des CCR) entworfenen Platte, auf der sich 4 Narkosemasken mit Absaugung befinden und eine Wärmematte eingebaut ist. Durch diese Wärmematte konnte die Körpertemperatur der Ratten während der gesamten Operation zwischen 38 °C und 40 °C gehalten werden.

Bevor mit der Operation begonnen wurde, wurde die Tiefe der Narkose bei den einzelnen Tieren durch den *tail & toe pinch reflex* (Flexorreflex) überprüft. War die Narkose ausreichend, wurde die rechte *A. carotis communis* durch einen kleinen Einschnitt in der Kehle der Ratte freipräpariert und in die Tiefe verfolgt, bis zur Bifurcation. Nach Ligation der *A. carotis externa* und *A. carotis communis* erfolgte mit einer Mikroschere eine Inzision der *A. carotis communis*. Ein 7 cm langer 4-0 Polyethylen Faden, dessen Spitze mit Silikon umhüllt wurde, wurde in die Arterie eingeführt und 1,8 cm weit in die *A. carotis interna* vorgeschoben, so dass die *A. cerebri media* verschlossen und auch eine Blutversorgung durch den *Circulus arteriosus cerebri* verhindert wurde. Nachdem der Faden in der Arterie lag, wurde die *A. carotis communis* rostral der Inzision ein weiteres Mal abgebunden und der Faden damit fixiert. Die Wunde wurde so vernäht, dass der Rest des Fadens außerhalb zu liegen kam.

Die Blutversorgung im Gebiet der *A. carotis externa* wird durch Kollaterale aufrechterhalten, so dass es hier zu keiner Ischämie kommt und die Gefäße ligiert bleiben können.

Die Ratten wurden ab dem Zeitpunkt, an dem der Faden weit genug in der *A. carotis interna* lag, für weitere 90 min in Narkose belassen. Nach diesen 90 min wurde der Faden heraus gezogen und es fand eine Reperfusion der Gefäße statt.

Nachdem der Faden herausgezogen wurde, wurden die Tiere mit Temgesic® (Buprenorphin 0,01 – 0,05 mg/kg) behandelt, um den Wundschmerz zu mildern, und zum Aufwachen in die Käfige gesetzt.

Für die Scheinoperation (Sham) wurden die Tiere demselben Protokoll unterzogen, bis auf die Inzision der *A. carotis communis* und damit auch dem Einführen des Fadens.

### 3.2.4 Pumpenimplantation

Für die Behandlung mit der jeweiligen Substanz in Studie A, Studie B und Studie D wurden die Medikamente über Minipumpen verabreicht. Die Minipumpen hatten ein Fassungsvermögen von 2 ml und eine Abgaberate von 10 µl/h. Die Pumpen wurden subkutan, seitlich am Körper implantiert.

Für die subkutane Behandlung wurde den Ratten die seitliche Brustwand rasiert und desinfiziert und die Haut ca. 1 cm auf Höhe der 3. Rippe eingeschnitten. Durch diesen Schnitt wurden die Minipumpen subkutan eingesetzt und der Schnitt anschließend wieder vernäht.

Bei der intravenösen Behandlung wurde an die Minipumpen ein Polyethylen-Schlauch (PE-60; innerer Durchmesser: 0,72 mm; äußerer Durchmesser: 1,22 mm) befestigt durch den die Medikamentenabgabe erfolgte. Im Anschluss an die Schlaganfalloperation wurde der rechte Bereich lateral des Brustbeins auf Höhe der ersten Rippen rasiert, desinfiziert und ca. 1 cm breit eingeschnitten. Durch eine Pinzette wurde die Haut von den Muskeln gelöst, so dass die Minipumpen bis zur seitlichen Bauchwand hochgeschoben werden konnten. Durch denselben Schnitt wurde die *V. cava cranialis* frei präpariert, abgebunden und durch eine Inzision mit dem Schlauch der Minipumpe verbunden. Der Schlauch wurde in der *V. cava* ein kleines Stück eingeschoben, jedoch nicht so weit, dass er bis in das Herz reichte, und befestigt. Anschließend wurde die Wunde vernäht.

### 3.2.5 Retrobulbäre Blutentnahme

Um sicherzustellen, dass es zu keinen operationsbedingten Unterschieden zwischen den Tieren kam, wurde bei den Studien A, B und D am Ende der Operation, nachdem der Faden aus der *A. carotis* gezogen worden war, den Ratten retrobulbär aus dem Venenplexus mit Hilfe einer Glaskanüle Blut entnommen zur Bestimmung des Natrium-, Kalium-, Glucose-Gehalts, pH – Werts, Hämatokrits und partiellem Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid drucks. Diese Parameter wurden mit Hilfe des RADIOMETER ABL555 Series gemessen.

In Studie C wurden die Tiere zu 3 verschiedenen Zeitpunkten mit Ketamin/ Xylazin (0,1 ml/ 100 g) in Narkose gelegt, mit Hilfe einer Glaskanüle wurde retrobulbär jeweils ca. 1 ml Blut entnommen und in EDTA-K Röhrchen (S-Monovetten®) gefüllt. Anschließend wurde das Blut bei 4 °C und 4000 Umdrehungen für 10 min zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei –80 °C eingefroren.

### **3.2.6 Blutdruck**

Der Blutdruck der Ratten wurde in allen Versuchen nicht-invasiv, mit der tail-cuff Methode, gemessen. Dafür wurden die Ratten zur Fixation in Plexiglas – Röhren gesetzt. Durch Rotlichtlampen wurden die Schwänze der Ratten erwärmt, um die Durchblutung zu steigern und dadurch dass Messen des systolischen Blutdrucks zu ermöglichen. Die Blutdruckmessung wurde mit dem PowerLab<sup>®</sup> mit NBIP controller von ADInstruments durchgeführt und mit LabChart ausgewertet.

### **3.2.7 Neurologische Untersuchung**

Die neurologische Untersuchung der Tiere wurde von einer, hinsichtlich der Gruppeneinteilung verblindeten Person, nach dem Garcia System durchgeführt. Dieses System umfasst 6 verschiedene Tests zur Bestimmung der Spontanaktivität und der sensorischen (Propriozeption und Berühren der Tastaare) und motorischen (Symmetrie der 4 Gliedmaßen, Greifreflex und Aufsetzen der Vordergliedmaßen) Funktionen. Jeder Test wird mit 1-3, beziehungsweise 0-3 Punkten bewertet, wobei 3 Punkte eine physiologische Reaktion und 0 oder 1 Punkt eine pathologische oder gar keine Reaktion bedeuten. Abschließend wird die Gesamtsumme der einzelnen Tests ermittelt und so die Ratte neurologisch beurteilt.

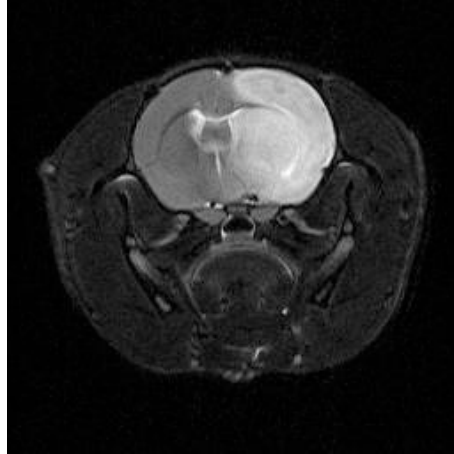
### **3.2.8 MRT**

Alle Untersuchungen im MRT wurden mit einem 7 T rodent Scanner und einer T2 gewichteten 2D Turbo Spin Echo Sequenz durchgeführt mit Hilfe der Bruker software ParaVision<sup>®</sup> 4.0. Die Auswertung des Volumens der hyperintensiven Gebiete wurde mit dem Programm Analyze 5.0 durchgeführt.

Für die Untersuchung im MRT in Studie A, Studie B und Studie D wurden die Tiere mit 2% Isofluran, bei einer Durchflussrate von 0,5 l/min, in Narkose gelegt. Während der Untersuchung im MRT wurde die Narkose mit Isofluran aufrechterhalten und die Tiefe der Narkose über die Atmung kontinuierlich überwacht. Die Ratten lagen in Bauchlage auf einem Schlitten mit einer Wärmematte, deren Temperatur durch ein Wasser – Fluss – System zwischen 40 °C und 45 °C gehalten und durch einen Thermostaten kontrolliert wurde. Durch diesen Schlitten wurde der Kopf der Tiere in eine 40 mm Volumenspule und damit in das Magnetfeld eingebracht. Es wurden 20 Schnitte mit einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen, um das gesamte Gehirn zu erfassen.

Für die Untersuchung der Gehirne in Studie C, wurde je ein eingefrorenes Gehirn in ein mit Wasser gefülltes 15 ml Falcon<sup>™</sup> tube gelegt. Diese Falcon<sup>™</sup> tubes wurde in einen 20 mm

RF-Quadratur – Volume Resonator eingebracht, so dass die Gehirne im Mittelpunkt des Magnetfeldes lagen. 25 axiale Schnitte mit einer Schichtdicke von 0,5 mm wurden aufgenommen.



**Abbildung 4: Darstellung eines Schlaganfalls im MRT**

MRT-Bild eines Gehirns einer Ratte nach MCAO; die gesamte rechte Hälfte ist durch den Schlaganfall geschädigt. Durch die Ödembildung erscheint das betroffene Gebiet weiß. Deutlich ist auch die Verschiebung der Mittelachse, aufgrund des raumfordernden Prozesses auf der rechten Seite, nach links zu erkennen.

### **3.2.9 Blutentnahme final**

Zur finalen Blutentnahme wurde den Ratten, anschließend an die Anästhesie mit Ketamin/ Xylazin (0,1 ml/ 100g), der Bauchraum entlang der Linea alba eröffnet, Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens angelegt und mit Hilfe von EDTA-K Spritzen ca. 5 ml Blut aus der Aorta entnommen.

### **3.2.10 Tötung**

Zur Tötung eines Tieres wurden, vor der finalen Blutentnahme und anschließend an die Anästhesie mit Ketamin/ Xylazin, 1 ml/ 100 g Körpergewicht 4% Chloralhydrat intraperitoneal appliziert. Zeigte das Tier keine Reflexe mehr, wurde es dekapitiert.

### 3.2.11 Organentnahme

Nach der Dekapitation der Ratten wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn *in toto* entnommen. Aus dem bereits eröffneten Bauchraum wurden die linke und rechte Niere abgesetzt, entnommen und von ihrer Kapsel befreit. Die Brusthöhle wurde ebenfalls eröffnet und das Herz an der *V. cava* und dem *Truncus aorticus* abgesetzt. Anschließend wurden alle Organe einzeln gewogen.

In Studie A, B und D wurden das Gehirn und die Organe *in toto* auf Trockeneis eingefroren

In Studie C wurden das Gehirn, die rechte Niere und die Herzspitze auf Trockeneis eingefroren, die linke Niere und die Herzbasis für spätere eventuelle histologischen Untersuchungen in 10% Formalin eingelegt.

### 3.2.12 Histologische Präparate

Die am Kryostaten geschnittenen Gehirnproben wurden zur Fixierung des Gewebes auf dem Objektträger für 5 min in kaltes Aceton eingetaucht.

Anschließend wurden die Präparate entsprechend dem Protokoll der Firma *Invitrogen* mit dem Fluoreszenzfarbstoff „*NeuroTrace<sup>TM</sup> Nisslfärbung*“ gefärbt, um so die Neuronen sichtbar zu machen. Dafür wurden die gefrorenen fixierten Schnitte zu Beginn für 40 Min in 0,1 molarem PBS rehydratisiert. Zur Gewebestabilisierung und besseren Färbung wurden die Präparate anschließend für 10 Min in PBS mit 0,1% Triton-X-100 gewaschen. Vor der Färbung mit *NeuroTrace<sup>TM</sup>* wurden die Schnitte erneut 2 mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die *NeuroTrace<sup>TM</sup>* – Färbung wurde im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und auf die einzelnen Schnitte aufgetragen. Nach 30 min folgte die Fixierung der Färbung mit PBS plus 0,1% *Triton X-100*, danach wurden die Präparate erneut 2 mal für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend daran wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Dafür wurden die Präparate für 15 min mit 1: 10000 Dapi - Farbstoff gefärbt und anschließend für 3x10 min in PBS gewaschen und abschließend mit Hydromount eingedeckt.

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Openlab Software 3.1.7. Die Präparate wurden bei einer 200 fachen Vergrößerung ausgewertet und die Neuronen im dorsalen Kortex, im Bereich der Penumbra, sowohl der ipsi-, als auch der entsprechenden contralateralen Seite, wurden gezählt. Die Zellen wurden pro Objekt und Seite jeweils 3 Mal gezählt, anschließend wurde der Mittelwert gebildet.

### 3.2.13 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 12.0 und Microsoft Excel® X. Die Ergebnisse wurden dargestellt als Streudiagramme mit Medianwert  $\pm$  dem Interquartilsabstand oder als box plots, wobei die whiskers den minimalen und maximalen Wert angeben.

Ergebnisse zwischen den Gruppen wurden mit dem Wilcoxon Rangsummentest für unabhängige Stichproben, dem Wilcoxon Vorzeichen Rangsummentest für abhängige Stichproben oder dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Dabei wurden die Wilcoxon Tests bei einem Vergleich zwischen zwei Gruppen und der Kruskal-Wallis Test bei einem Vergleich zwischen mehreren Gruppen angewendet. Zum Vergleich der Mortalität in den unterschiedlichen Gruppen wurde eine Überlebenszeitanalyse mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers durchgeführt. Ergebnisse bei denen  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant eingeschätzt.

## 4 Ergebnisse

Tiere, die während der Versuche aus nicht prüfungsrelevanten Gründen starben (z.B. Atemstillstand bei der Schlaganfallopoperation, Abszessbildung), wurden bei der Beurteilung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

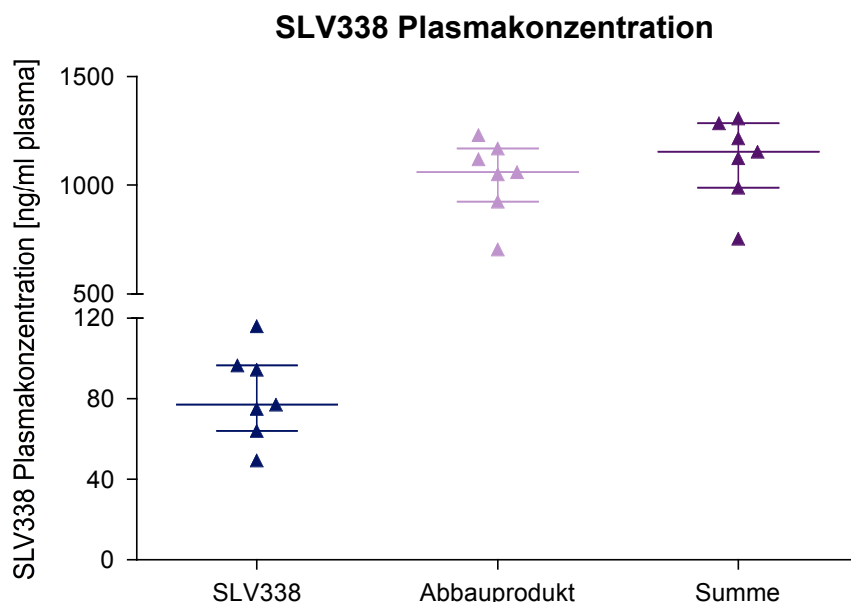
Tiere, bei denen nach der MCAO kein Schlaganfall im MRT zu erkennen war, wurden bei der Beurteilung der Ergebnisse ebenfalls nicht berücksichtigt, da dies auf individuelle anatomische Besonderheiten zwischen den einzelnen Tieren zurückzuführen ist (die Blutversorgung wurde nicht vollständig unterbrochen) und nicht als eine Folge der Behandlung angesehen werden kann.

### 4.1 Studie A

#### 4.1.1 SLV338 Plasmakonzentration

Anschließend an die Untersuchung im MRT wurde den Ratten Blut entnommen und die SLV338 Plasmakonzentration in den mit Prüfsubstanz behandelten Ratten ermittelt.

Bei allen untersuchten Tieren der Studie A lag die SLV338 Konzentration deutlich unter der erwarteten Menge (ca. 1200 ng/ml). Das Abbauprodukt war jedoch stark erhöht und die Summe beider Ergebnisse lag im erwarteten Bereich (Abb. 5). Wodurch dieser erhöhte Abbau hervorgerufen wurde, ist unklar.



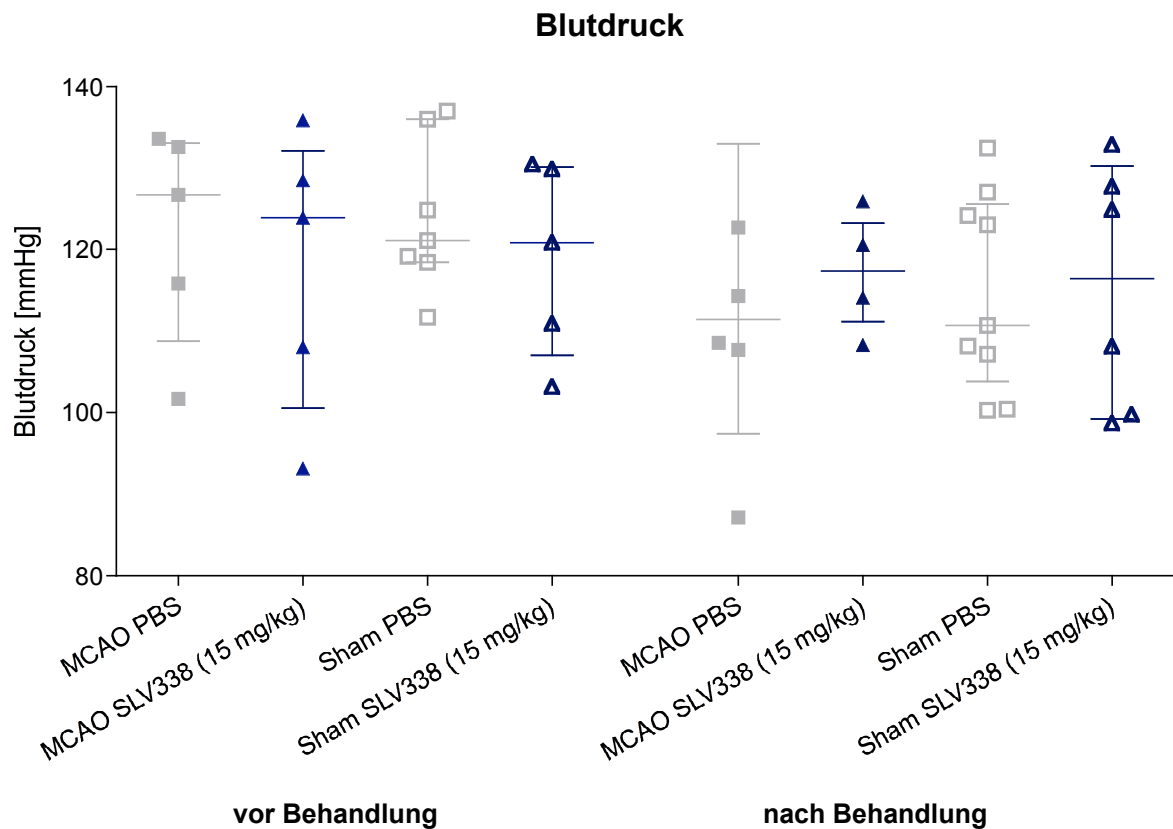
**Abbildung 5: SLV338 Plasmakonzentration Studie A**

Plasmakonzentration von SLV338, dessen Abbauprodukt und die Summe beider Konzentrationen in den behandelten, MCAO operierten Tieren.



#### 4.1.2 Blutdruck

Der Blutdruck wurde mittels *tail cuff* Methode an zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: einmal vor Beginn der Behandlung, um sicherzustellen, dass zwischen den einzelnen Tieren keine Unterschiede vorlagen und erneut nach 5 tägiger Behandlung, vor der Operation, um eine blutdrucksenkende Wirkung der Substanz auszuschließen. Da die Methode der *tail cuff* Blutdruckmessung mit einem gewissen Stress für die Tiere verbunden ist, können die Ergebnisse in manchen Fällen leicht erhöht ausfallen, Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Eine Absenkung des Blutdrucks durch die Behandlung mit SLV33 fand nicht statt und der mediane Blutdruck lag in allen Gruppen zw. 110 und 123 mmHg (Abb. 6).



**Abbildung 6: Blutdruck Studie A**

Blutdruck der mit PBS und SLV338 (15 mg/kg) behandelten Tiere, vor und nach der Behandlung, gemessen mit der tail-cuff Methode.

### 4.1.3 Blutgase

Sowohl nach der Sham, als auch nach der Schlaganfalloperation wurde bei einigen Tieren (n = 4) retrobulbär Blut zur Bestimmung der Blutgase (Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$ , Kohlenstoffdioxidpartialdruck  $pCO_2$ ), des pH-Wertes, der Glukose-, Natrium- und Kalium-Konzentration und des Hämatokrits entnommen. In Tabelle 1 sind die Medianwerte der einzelnen Gruppen mit dem 1. und dem 3. Quartil in Klammern angegeben. Es gab weder zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, noch zwischen den Schlaganfall- und Sham-operierten Tieren signifikante Unterschiede. Bei allen Tieren konnte eine leichte Hypoxie und Hyperkapnie aufgrund der durch die Narkose bedingten Atemdepression festgestellt werden.

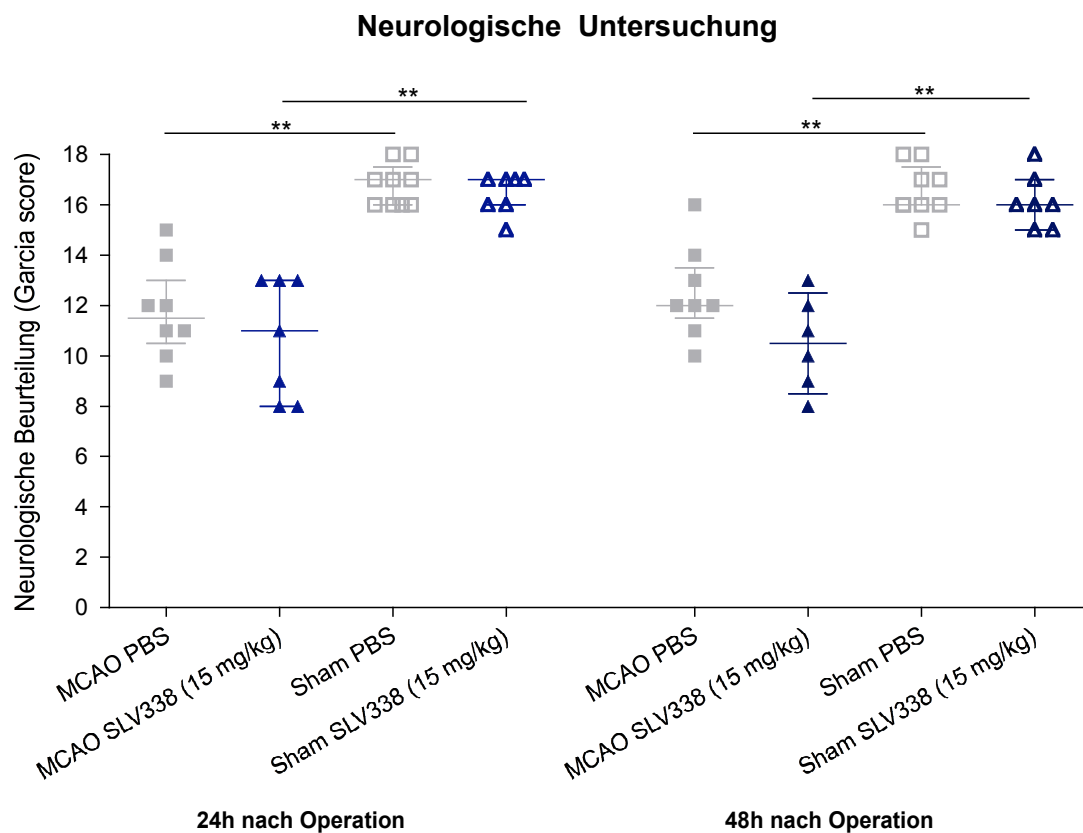
**Tabelle 1: Blutgase Studie A**

Werte der Blutgasanalyse gemessen in retrobulbärem Blut nach der Operation.

	<b>MCAO PBS</b>	<b>Sham PBS</b>	<b>MCAO SLV338 15 mg/kg</b>	<b>Sham SLV338 15 mg/kg</b>
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>66,4</b> (64,7 / 83,1)	<b>69,5</b> (62,1 / 76,1)	<b>65,5</b> (64,8 / 80,5)	<b>72,9</b> (65,6 / 80,2)
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>48,0</b> (41,3 / 49,1)	<b>48,8</b> (44,6 / 54,1)	<b>51,0</b> (41,4 / 53,1)	<b>52,3</b> (47,8 / 56,8)
<b>pH-Wert</b>	<b>7,31</b> (7,30 / 7,32)	<b>7,31</b> (7,30 / 7,32)	<b>7,31</b> (7,30 / 7,31)	<b>7,33</b> (7,32 / 7,33)
<b>Glukose [mmol/l]</b>	<b>10,2</b> (10,0 / 11,6)	<b>12,7</b> (11,4 / 13,0)	<b>10,5</b> (10,3 / 11,1)	<b>9,6</b> (9,3 / 10,0)
<b>Natrium [mmol/l]</b>	<b>133,0</b> (132,8 / 134,5)	<b>134,0</b> (132,6 / 135,1)	<b>134,6</b> (130,0 / 135,0)	<b>134,5</b> (134,3 / 134,8)
<b>Kalium [mmol/l]</b>	<b>7,60</b> (6,46 / 7,65)	<b>6,90</b> (6,10 / 6,96)	<b>5,98</b> (5,85 / 6,80)	<b>6,48</b> (5,91 / 7,04)
<b>Hämatokrit [%]</b>	<b>43,5</b> (42,8 / 43,8)	<b>42,8</b> (42,4 / 43,0)	<b>45,0</b> (41,8 / 45,0)	<b>43,8</b> (43,1 / 44,4)

#### 4.1.4 Neurologische Untersuchung

Die neurologischen Defizite wurden sowohl 24, als auch 48 h nach der Schlaganfall- und der Sham- Operation mit dem Garcia score bewertet. Zwischen den Behandlungsgruppen zeigten sich keine deutlichen Unterschiede, die Sham Tiere der korrespondierenden Behandlungsgruppen wurden neurologisch erwartungsgemäß signifikant besser im Vergleich zu den Schlaganfallgruppen bewertet (Abb. 7).

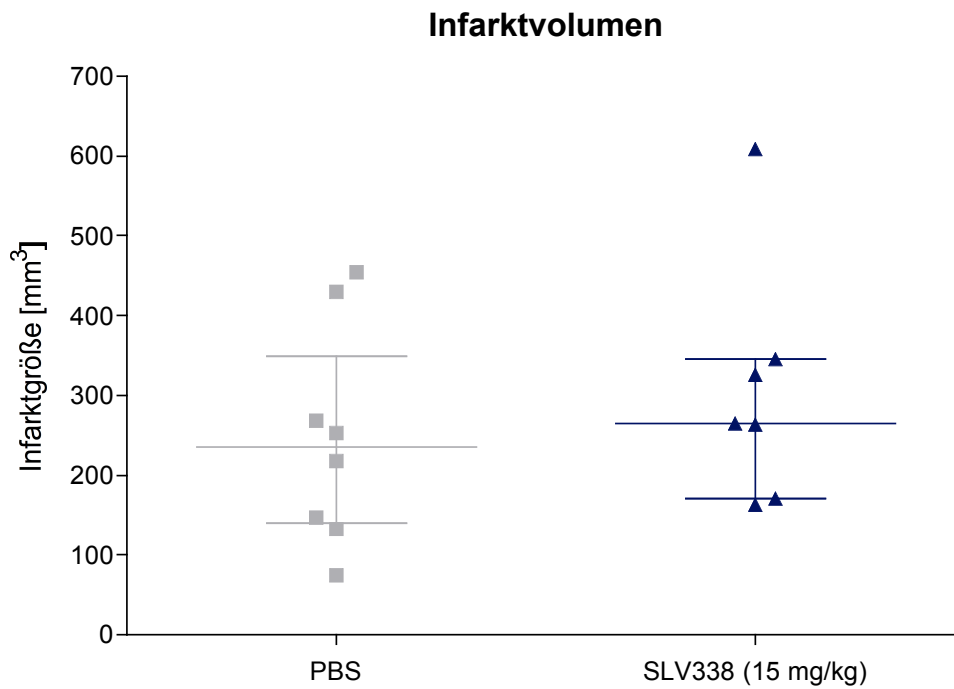


**Abbildung 7: Neurologische Defizite Studie A**

Neurologische Defizite der MCAO und Sham operierten Tiere 24 und 48 h nach der Operation bewertet mit dem Garcia score. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.1.5 Infarktgrößen

48 h nach der MCAO- Operation wurden die Tiere im MRT untersucht und anschließend die Infarktgrößen errechnet (Abb. 8). Es ist kein Unterschied zwischen den PBS- und SLV338 behandelten Gruppen zu erkennen (medianes Infarktvolumen PBS: 235,56 mm<sup>3</sup>; SLV338: 264,61 mm<sup>3</sup>).

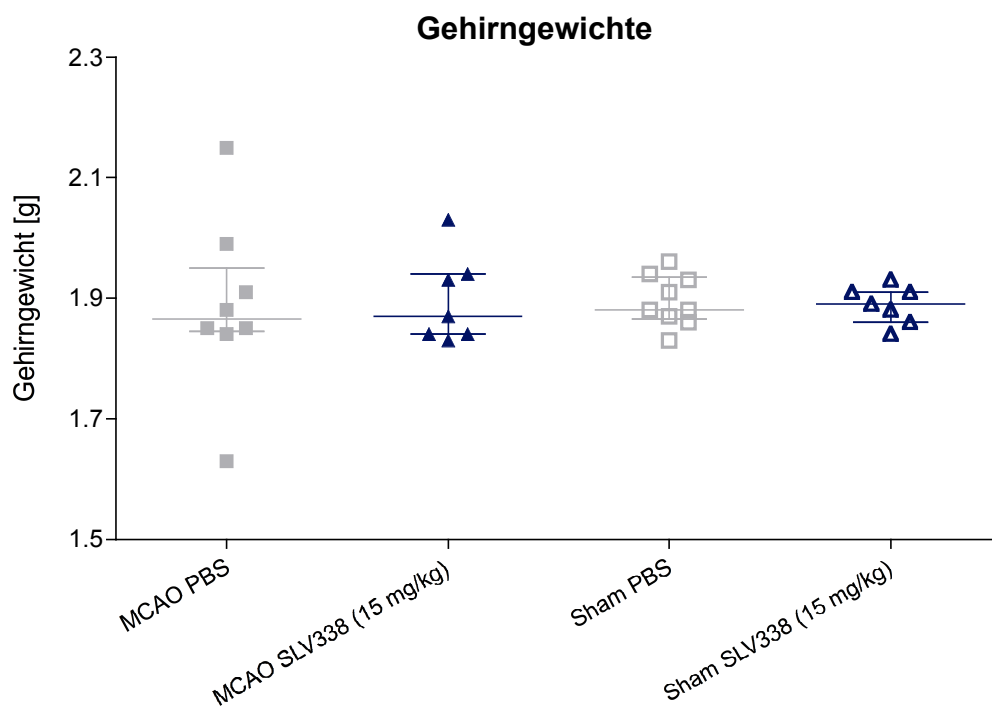


**Abbildung 8: Infarktgrößen nach 48 h Studie A**

Im MRT gemessenes Infarktvolumen 48 h nach der MCAO- Operation der mit PBS und SLV338 (15 mg/kg) behandelten Tiere.

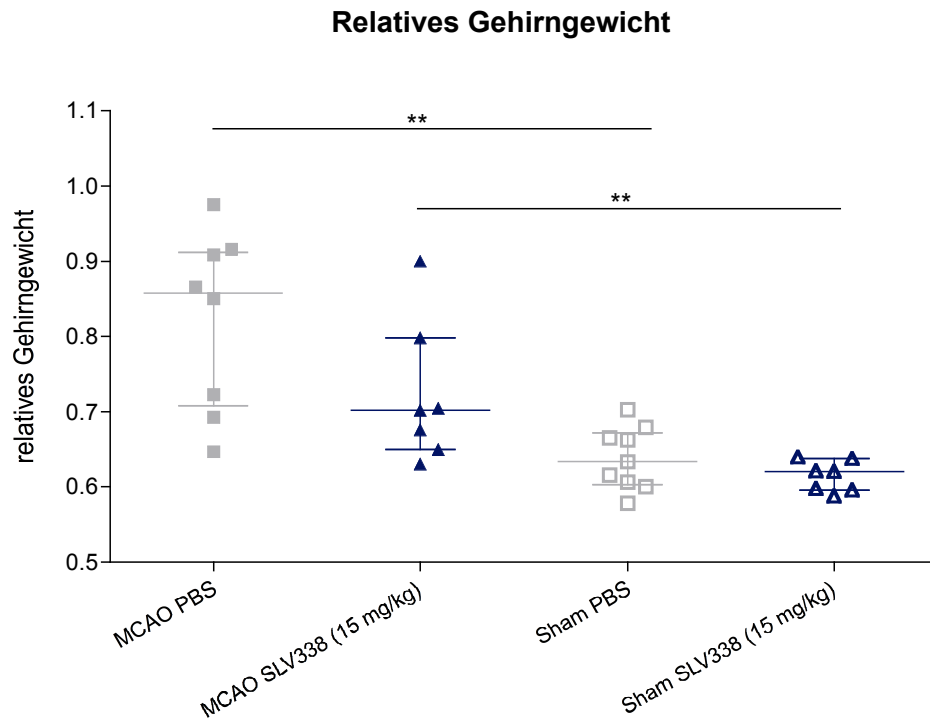
#### 4.1.6 Gehirngewicht

Anschließend an die Untersuchung im MRT wurden die Tiere gewogen, die Gehirne entnommen und von diesen jeweils einzeln das Gewicht bestimmt. Mit einem Gewicht von ca. 1,9 g waren alle Gehirne gleich schwer und es konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abb. 9). Auch zwischen den Sham und den MCAO operierten Tieren gab es keine Unterschiede. Das relative Gehirngewicht, bezogen auf das Körpergewicht, zeigt jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Sham und den jeweiligen MCAO operierten Tieren (Abb. 10), wobei der Median des relativen Gehirngewichts der MCAO PBS Gruppe bei 0,86; der MCAO SLV338 Gruppe bei 0,70; der Sham PBS Gruppe bei 0,63 und der Median der Sham SLV338 Gruppe bei 0,62 liegt. Diese signifikante Differenz im relativen Gehirngewicht wird bedingt durch die Ödembildung (Wassereinlagerung) im Gehirn nach einem Schlaganfall, wodurch dieses absolut schwerer wird, und einem gleichzeitig absinkenden Körpergewicht durch das gestörte Allgemeinbefinden (verringerte Futter- und Wasseraufnahme) der Schlaganfall-Tiere.



**Abbildung 9: Gehirngewichte Studie A**

Das absolute Gehirngewicht der Tiere nach der Untersuchung im MRT (MCAO operierte Tiere), oder nach 48 h (Sham operierte Tiere).



**Abbildung 10: Relative Gehirngewichte Studie A**

Das relative Gehirngewicht, bezogen auf das Körpergewicht der Tiere, nach der Untersuchung im MRT (MCAO operierte Tiere) oder 48 h nach der Operation (Sham operierte Tiere). \*\*p < 0,01.

## 4.2 Studie B

### 4.2.1 SLV338 und SLV334 Plasmakonzentration

Anschließend an die Untersuchung im MRT wurde den mit den Testsubstanzen behandelten, MCAO operierten Tieren Blut entnommen und die SLV338 oder die SLV334 Plasmakonzentration bestimmt. Da es bei manchen Tieren nicht möglich war eine Blutprobe zu gewinnen, liegt die Anzahl der Tiere hier unter der, die einen Schlaganfall bekamen.

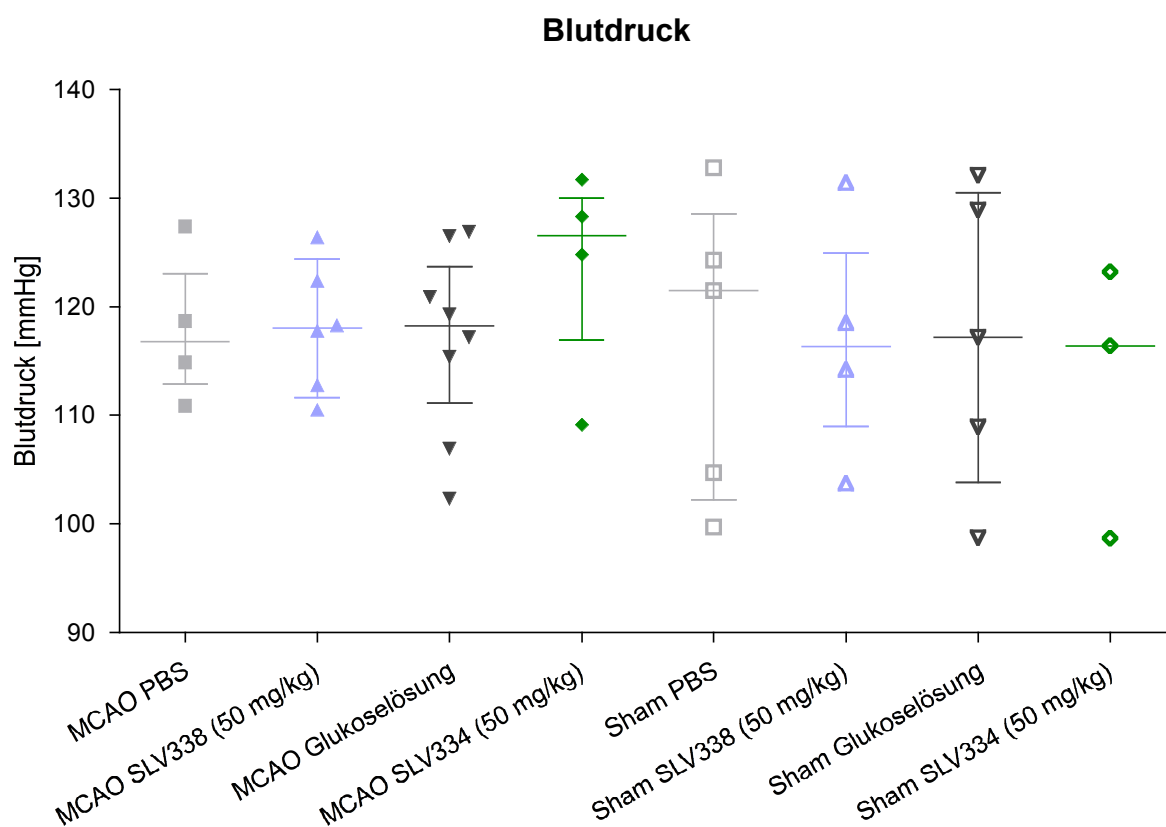
Bei allen untersuchten Tieren lagen die Plasmakonzentrationen in dem erwarteten Bereich.

Tier	SLV338 Plasmakonzentration [ng/ml]
1	848
2	1170
3	1280
4	1100
5	2500
6	1040
<b>Median</b>	<b>1135</b>
1. Quartil	1055
3. Quartil	1253

Tier	SLV334 Plasmakonzentration [ng/ml]
7	1020
8	680
9	1700
10	1940
11	2370
12	657
13	401
<b>Median</b>	<b>1020</b>
1. Quartil	669
3. Quartil	1820

### 4.2.2 Blutdruck

Der Blutdruck der Ratten wurde vor der Schlaganfallopoperation durch die *tail cuff* Methode gemessen, um mögliche Unterschiede zu ermitteln. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden und der mediane Blutdruck lag in allen Gruppen zw. 116 und 126 mmHg (Abb. 11). Nach der Operation war es aufgrund der Kondition der Tiere nicht mehr möglich, den Blutdruck zu messen.



**Abbildung 11: Blutdruck Studie B**

Der Blutdruck aller Tiere, gemessen vor der Behandlung mit der *tail cuff* Methode.



### 4.2.3 Blutgase

Nach der MCAO- oder Sham- Operation wurde einigen Tieren (n = 4) zur Bestimmung der Blutgase (Sauerstoffpartialdruck pO<sub>2</sub>, Kohlenstoffdioxidpartialdruck pCO<sub>2</sub>), des pH-Wertes, der Glukose-, Natrium- und Kalium- Konzentration und des Hämatokrits retrobulbär Blut entnommen. In Tabelle 2 sind die Medianwerte der einzelnen Gruppen mit dem 1. und dem 3. Quartil in Klammern angegeben. In allen Tieren konnte eine leichte Hyperkapnie aufgrund der Narkose beobachtet werden. Zwischen den einzelnen Gruppen sind keine Unterschiede zu erkennen.

**Tabelle 2: Blutgase Studie B**

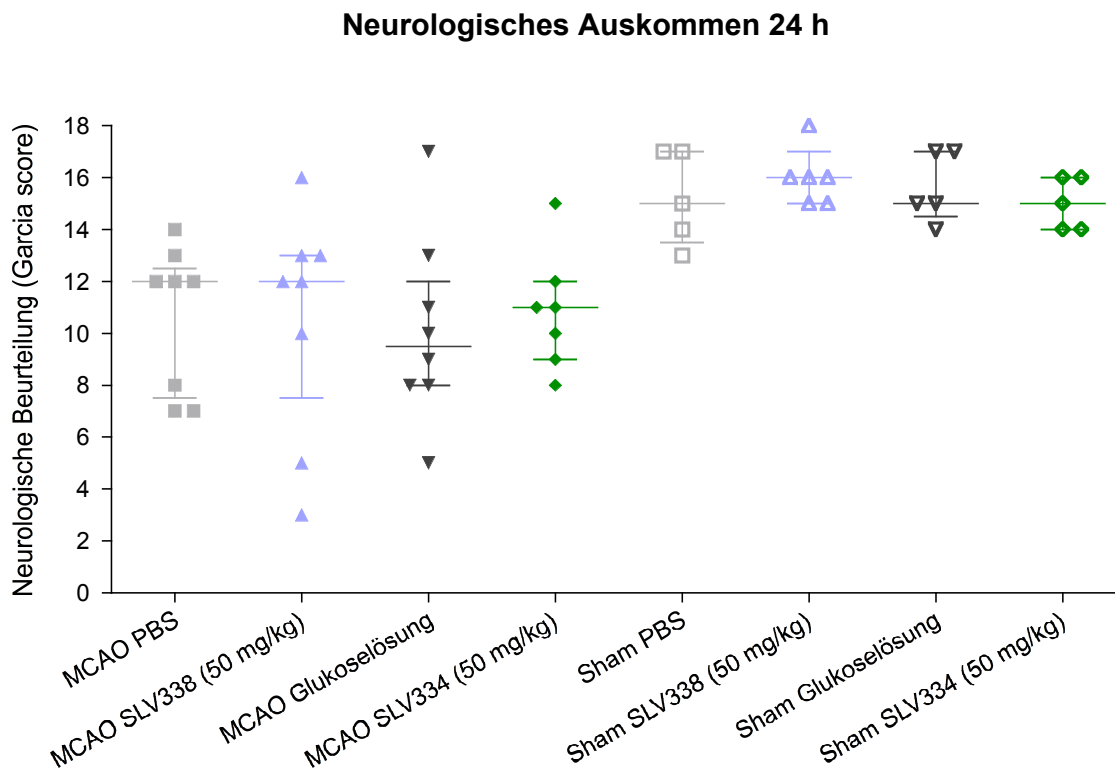
Werte der Blutgasanalyse gemessen in retrobulbärem Blut nach der Operation.

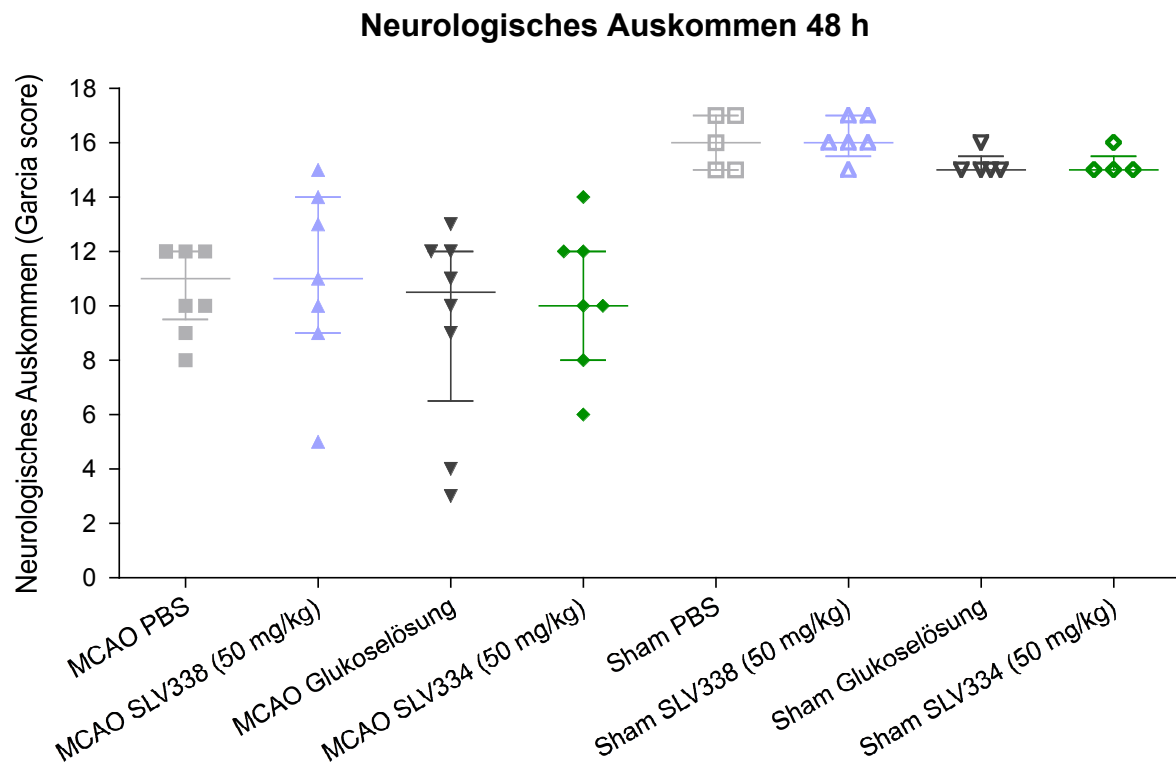
	<b>MCAO PBS</b>	<b>Sham PBS</b>	<b>MCAO SLV338 50 mg/kg</b>	<b>Sham SLV338 50 mg/kg</b>
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>76,6</b> (72,8 / 96,5)	<b>90,5</b> (85,5 / 98,9)	<b>73,2</b> (64,2 / 81,5)	<b>112,3</b> (110,8 / 116,3)
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>63,4</b> (55,8 / 69,5)	<b>74,6</b> (69,0 / 75,0)	<b>63,4</b> (58,5 / 70,2)	<b>75,8</b> (70,3 / 81,4)
<b>pH-Wert</b>	<b>7,36</b> (7,32 / 7,37)	<b>7,31</b> (7,30 / 7,33)	<b>7,31</b> (7,31 / 7,31)	<b>7,24</b> (7,20 / 7,27)
<b>Glukose [mmol/l]</b>	<b>12,0</b> (12,0 / 12,0)	<b>13,8</b> (13,3 / 14,1)	<b>13,0</b> (12,0 / 14,0)	<b>19,4</b> (17,1 / 19,6)
<b>Natrium [mmol/l]</b>	<b>135,0</b> (130,0 / 135,5)	<b>131,0</b> (129,5 / 133,0)	<b>133,5</b> (131,5 / 135,3)	<b>131,0</b> (130,0 / 133,5)
<b>Kalium [mmol/l]</b>	<b>5,63</b> (4,97 / 5,77)	<b>5,90</b> (5,60 / 6,30)	<b>7,25</b> (6,70 / 7,80)	<b>5,20</b> (4,95 / 6,05)
<b>Hämatokrit [%]</b>	<b>45,1</b> (43,0 / 45,8)	<b>42,9</b> (42,9 / 43,7)	<b>41,6</b> (40,4 / 43,0)	<b>41,8</b> (41,6 / 43,6)

	<b>MCAO Glukoselsg</b>	<b>Sham Glukoselsg</b>	<b>MCAO SLV334 50 mg/kg</b>	<b>Sham SLV334 50 mg/kg</b>
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>80,1</b> (75,4 / 83,4)	<b>80,8</b> (79,4 / 82,1)	<b>79,7</b> (77,2 / 90,2)	<b>95,8</b> (94,5 / 97,0)
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>57,4</b> (54,3 / 73,1)	<b>62,7</b> (61,5 / 63,9)	<b>57,7</b> (51,0 / 71,9)	<b>78,4</b> (74,9 / 81,9)
<b>pH-Wert</b>	<b>7,28</b> (7,21 / 7,30)	<b>7,23</b> (7,19 / 7,26)	<b>7,34</b> (7,27 / 7,37)	<b>7,20</b> (7,19 / 7,29)
<b>Glukose [mmol/l]</b>	<b>12,0</b> (11,4 / 13,5)	<b>13,5</b> (13,0 / 13,9)	<b>11,1</b> (10,1 / 13,2)	<b>26,0</b> (24,9 / 27,2)
<b>Natrium [mmol/l]</b>	<b>134,0</b> (133,0 / 136,0)	<b>134,5</b> (134,3 / 134,8)	<b>135,5</b> (134,8 / 136,0)	<b>130,0</b> (129,5 / 130,5)
<b>Kalium [mmol/l]</b>	<b>7,00</b> (6,80 / 7,20)	<b>6,50</b> (6,30 / 6,70)	<b>6,00</b> (5,58 / 6,43)	<b>6,65</b> (6,58 / 6,73)
<b>Hämatokrit [%]</b>	<b>39,9</b> (39,2 / 41,2)	<b>43,6</b> (43,1 / 44,2)	<b>45,3</b> (43,1 / 46,5)	<b>39,9</b> (39,9 / 39,9)

#### 4.2.4 Neurologische Untersuchung

Die neurologischen Defizite wurden 24 und 48 h nach der MCAO oder Sham Operation bei allen Tieren mit dem Garcia score bestimmt. Die medianen Werte der MCAO- operierten Tiere lagen 24 h nach der Operation zwischen 9 und 12 Punkten und 48 h nach der Operation zwischen 10 und 12 Punkten. Die neurologische Beurteilung der Sham- operierten Tiere war in allen Fällen signifikant besser als die der korrespondierenden MCAO – Gruppe ( $p < 0,01$ ). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde dies jedoch nicht in die Abbildung eingezeichnet. In den Sham Gruppen hatten die Tiere 24 h und 48 h nach der Operation im Median zwischen 15 und 16 Punkten (Abb. 12). Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen MCAO operierten Gruppen zu erkennen.



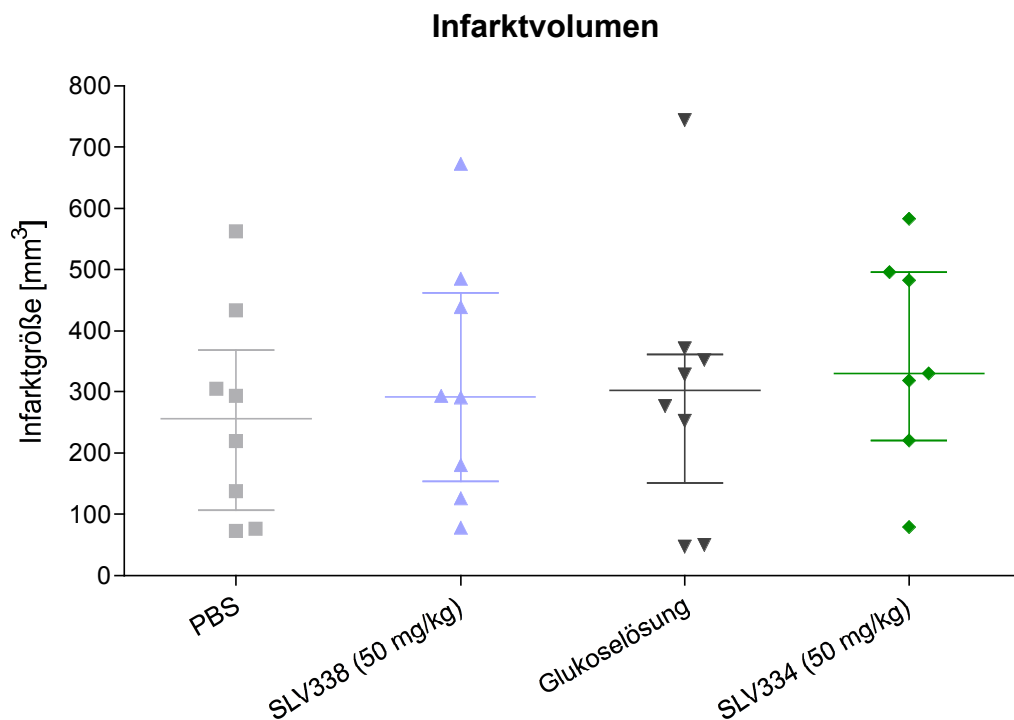


**Abbildung 12: Neurologische Defizite Studie B**

Die neurologischen Defizite, bewertet mit dem Garcia score, 24 h und 48 h nach der MCAO oder Sham Operation.

#### 4.2.5 Infarktgrößen

48 h nach der Schlaganfall – Operation wurden die Tiere im MRT untersucht und die Infarktgröße anschließend berechnet. Das Infarktvolumen war zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich und der Median lag bei der mit PBS behandelten Gruppe bei 256,08 mm<sup>3</sup>, in der mit SLV338 behandelten Gruppe bei 291,98 mm<sup>3</sup>, in der mit Glukoselösung behandelten Gruppe bei 302,04 mm<sup>3</sup> und in der mit SLV334 behandelten Gruppe bei 329,95 mm<sup>3</sup> (Abb. 13).

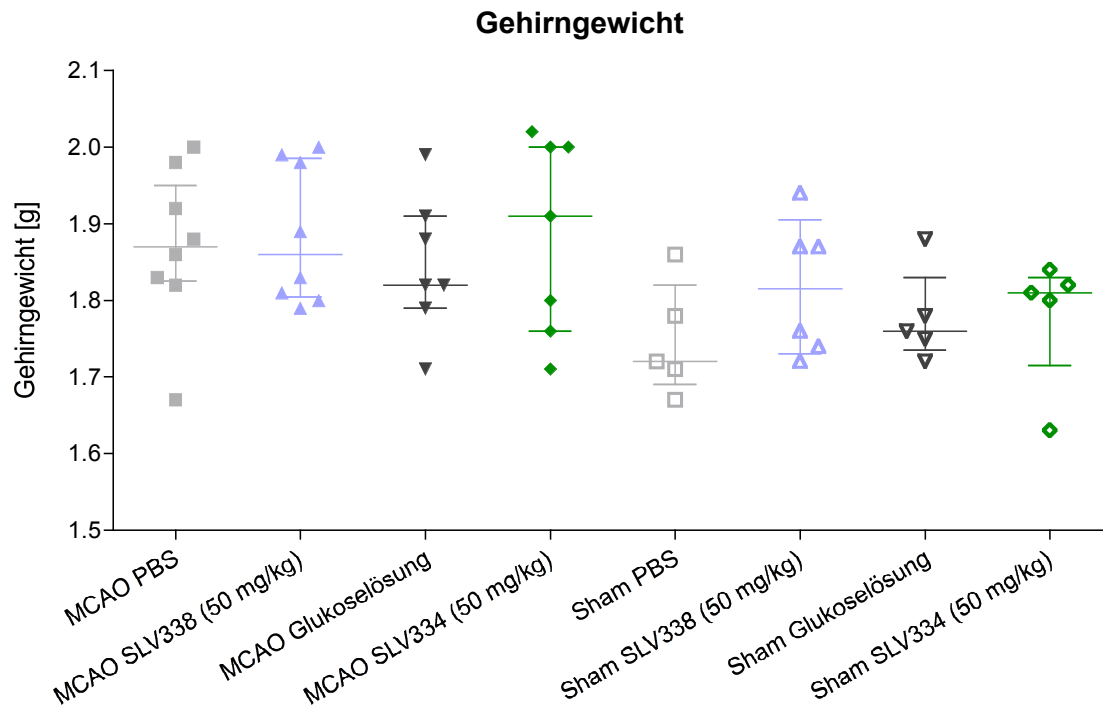


**Abbildung 13: Infarktgrößen Studie B**

Die 48 h nach der MCAO- Operation im MRT gemessenen Infarktgrößen.

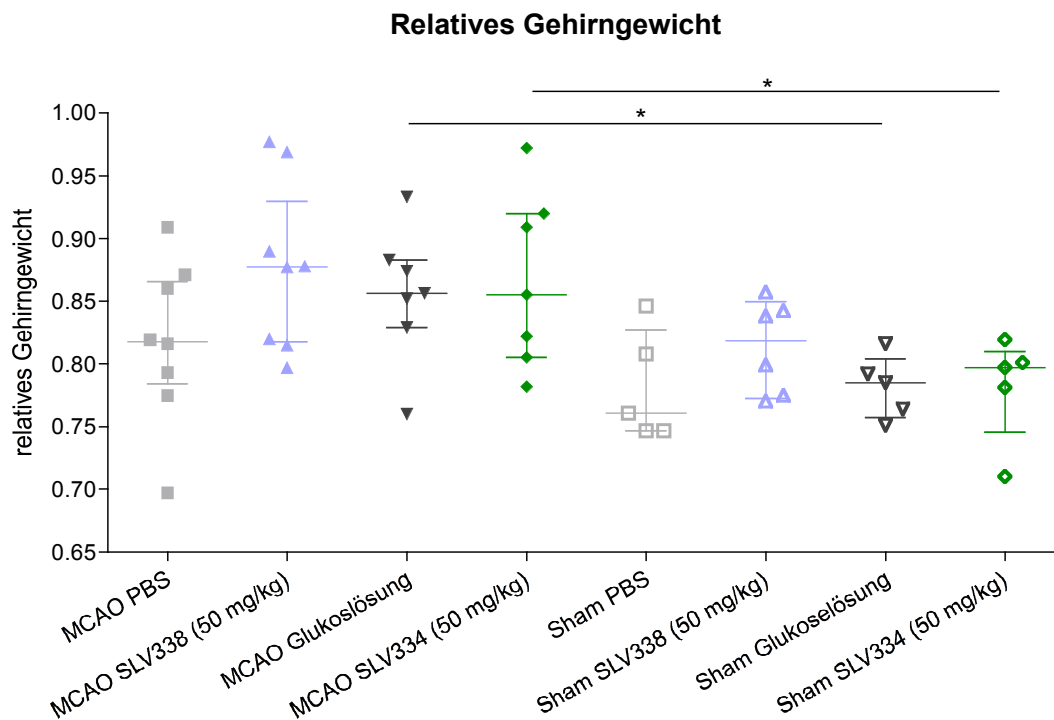
#### 4.2.6 Gehirngewicht

Nach der Untersuchung im MRT wurden die Tiere erst gewogen, anschließend getötet und die Gehirne entnommen. Die Gehirne wurden einzeln gewogen (Abb. 14) und für das relative Gehirngewicht auf das Körpergewicht bezogen (Abb. 15). Es waren weder im absoluten, noch im relativen Gehirngewicht zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen Unterschiede zu erkennen. Das mediane relative Gehirngewicht der mit Glukoselösung und SLV334 behandelten Tiere war jedoch signifikant höher bei den MCAO operierten Tieren (Glukoselösung: 0,86; SLV334: 0,86) im Vergleich zu den entsprechenden Sham operierten Tieren (Glukoselösung: 0,78; SLV334: 0,80).



**Abbildung 14: Gehirngewichte Studie B**

Die Gehirngewichte der unterschiedlichen Gruppen nach 48 h.



**Abbildung 15: Relative Gehirngewichte Studie B**

Die Gehirngewichte bezogen auf das Körpergewicht der Tiere 48 h nach der MCAO- oder Sham-Operation. \*p < 0,05.

### 4.3 Studie C

#### 4.3.1 SLV338 Futterkonzentration

Nach Beendigung des Versuches wurde die SLV33 – Konzentration der beiden Futtermischungen in jeweils einer Probe bestimmt. Die nominale Konzentration ergab sich aus der Dosierung (30 oder 100 mg/kg), einer geschätzten Futteraufnahme von 20 g/Tag und einem mittleren Gewicht der Ratte von 300 g. Da die Ratten zu Beginn des Versuchs eine geringere Futteraufnahme hatten, aber auch leichter waren, wird davon ausgegangen, dass sie über den gesamten Zeitraum des Versuches SLV338 in ausreichender Konzentration zu sich nahmen.

**Tabelle 3: SLV338 Konzentration im Futter Studie C**

	Nominale Konzentration [mg SLV338/g Futter]	Gemessene Konzentration [mg SLV338/g Futter]
Futter für 30 mg/kg	0,45	0,42
Futter für 100 mg/kg	1,5	1,34

#### 4.3.2 SLV338 Plasmakonzentration

Von jedem Tier das während oder am Ende des Versuches getötet wurde, wurde eine Blutprobe entnommen, um die SLV338 Plasmakonzentration zu bestimmen.

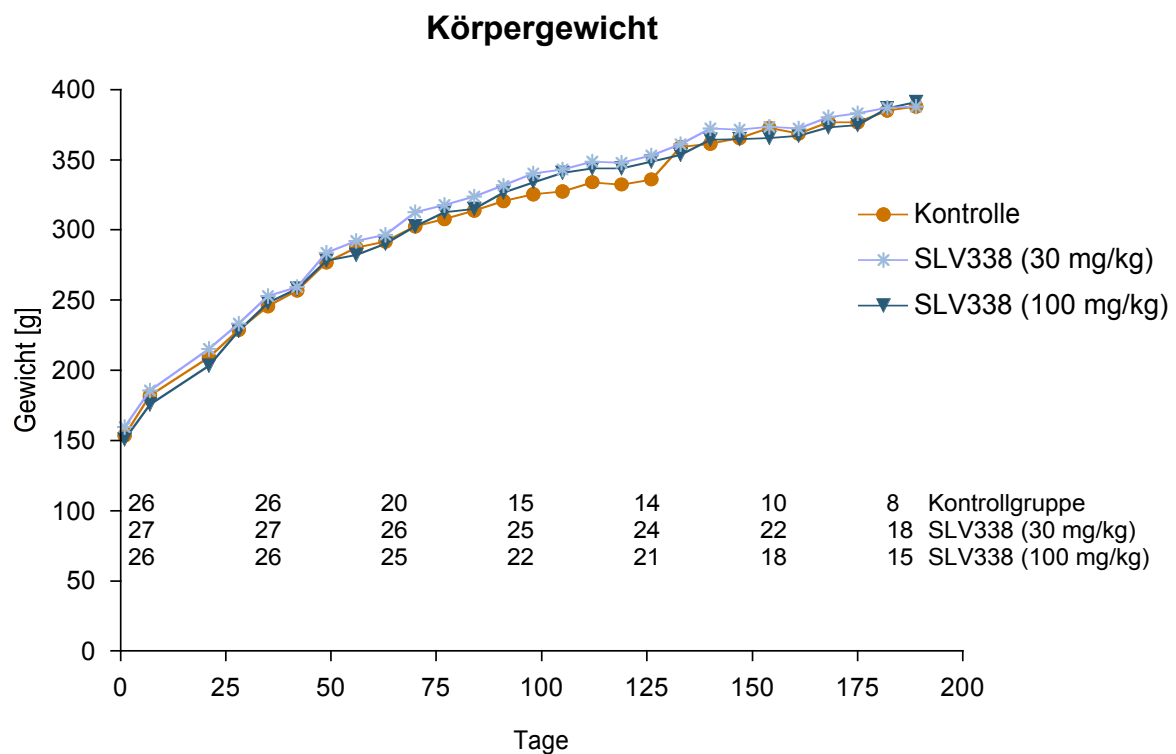
Die Plasmakonzentrationen liegen in dem aus vorherigen Studien zu erwarteten Bereich und sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

**Tabelle 4: SLV338 Plasmakonzentration Studie C**

	Gemessene Konzentration [ng SLV338/ml plasma]
30 mg/kg (n = 24)	51,4 $\pm$ 13,6
100 mg/kg (n = 24)	119,4 $\pm$ 37,2

### 4.3.3 Körpergewicht

Im Verlauf des Versuchs wurde das Körpergewicht jedes Tieres wöchentlich ermittelt. Es stieg bei allen Tieren mit der Zeit an, es waren jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu erkennen. Zu Beginn lag der Median des Körpergewichts bei 155 g (Kontrollgruppe: 153,6 g; SLV338 (30 mg/kg): 159,5 g; SLV338 (100 mg/kg): 150,6 g) und stieg während des Versuchs auf 389 g an (Kontrollgruppe: 388,2 g; SLV338 (30 mg/kg): 387,9 g; SLV338 (100 mg/kg): 391,3 g) (Abb. 16).

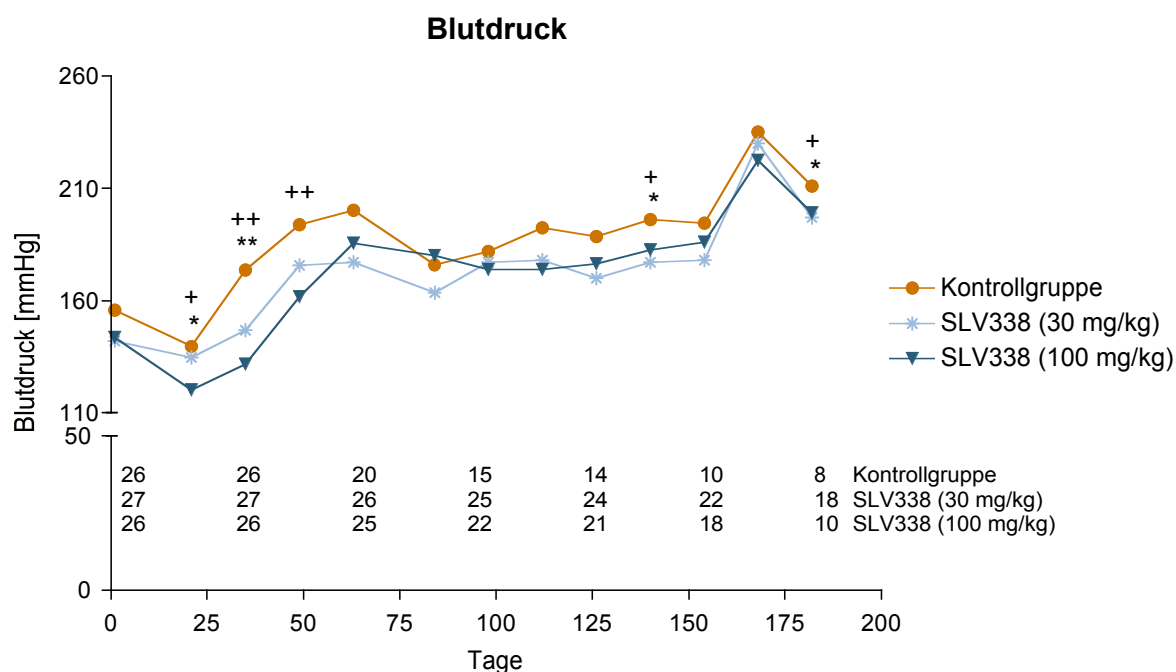


**Abbildung 16: Körpergewicht Studie C**

Das Körpergewicht der Tiere im Verlaufe des Versuchs, dargestellt ist der Median der jeweiligen Gruppe pro Messzeitpunkt. Die Zahlen unter den einzelnen Werten geben die Anzahl der zu dem Zeitpunkt noch lebenden Tiere an.

#### 4.3.4 Blutdruck

Jede 2. Woche wurde der Blutdruck mit der *tail cuff* Methode gemessen; er stieg in allen Tieren im Laufe der Studie an (der Median stieg von 147,1 mmHg in der ersten Woche auf 202,3 mmHg in der vorletzten Woche an) und war zu jedem Zeitpunkt pathologisch erhöht (Abb. 17). Bei 5 Messungen konnten signifikant höhere Werte in der Kontrollgruppe gemessen werden, allerdings blieben diese Unterschiede nicht über einen längeren Zeitraum bestehen und sind daher vernachlässigbar. Der Blutdruck in den behandelten Gruppen blieb an diesen 5 Zeitpunkten pathologisch erhöht und der signifikante Unterschied kam nicht durch einen Blutdruckabfall in den behandelten Gruppen zustande.



**Abbildung 17: Blutdruck Studie C**

Der Blutdruckverlauf in den Gruppen im Laufe des Versuchs, dargestellt ist der Median der jeweiligen Gruppe pro Messzeitpunkt. Die Zahlen unter den einzelnen Werten geben die Anzahl der zu dem Zeitpunkt noch lebenden Tiere an.

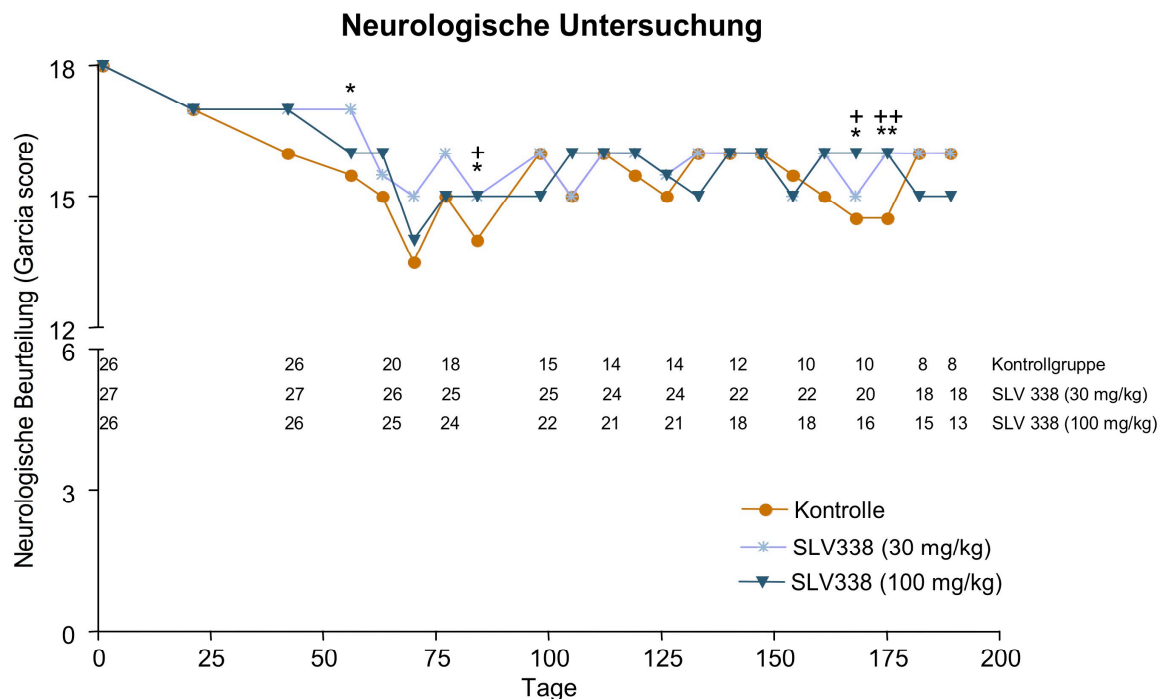
\* $p < 0,05$  Kontrollgruppe vs 30 mg/kg SLV338

+ $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$  Kontrollgruppe vs 100 mg/kg SLV338.



### 4.3.5 Neurologische Untersuchung

Die neurologische Beurteilung nach dem Garcia score wurde von einer, die Behandlung betreffend, verblindeten Person durchgeführt, zu Beginn des Versuchs alle 3 Wochen, dann wöchentlich. Zu einigen Zeitpunkten konnten signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Unterschiede waren jedoch nicht über einen längeren Zeitraum zu beobachten und daher nicht relevant. Die neurologische Beurteilung, über den gesamten Versuch hinweg beurteilt, zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und liegt zwischen 14 und 18 Punkten in den behandelten Gruppen und 13,5 und 18 in der Kontrollgruppe (Abb. 18).



**Abbildung 18: Neurologische Defizite Studie C**

Der Verlauf des neurologischen Auskommens während des gesamten Versuchs, dargestellt ist der Median der jeweiligen Gruppe pro Messzeitpunkt. Die Zahlen unter den einzelnen Werten geben die Anzahl der zu dem Zeitpunkt noch lebenden Tiere an.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  zwischen der Kontrollgruppe und der mit 30 mg/kg behandelten Gruppe  
 + $p < 0,05$ ; +++ $p < 0,01$  zwischen der Kontrollgruppe und der mit 100 mg/kg SLV338 behandelten Gruppe.

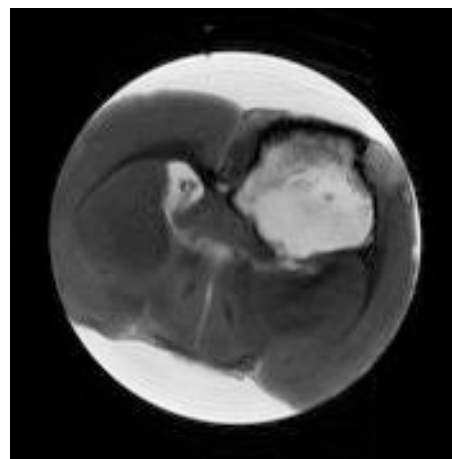
#### 4.3.6 Infarktgrößen

Für die Bestimmung der Infarktgrößen wurden die entnommenen, gefrorenen Gehirne aller Tiere am Ende des Versuches im MRT gemessen und die Infarktgrößen anschließend berechnet. Bei allen Tieren die während des Versuchs starben konnte ein Schlaganfall nachgewiesen werden. Tiere, die am Ende des Versuchs getötet wurden und keine Anzeichen eines Schlaganfalls gezeigt hatten, waren auch im MRT unauffällig und sind in Abb. 20 nicht berücksichtigt. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der ermittelten Infarktgröße konnten nicht festgestellt werden.

A)

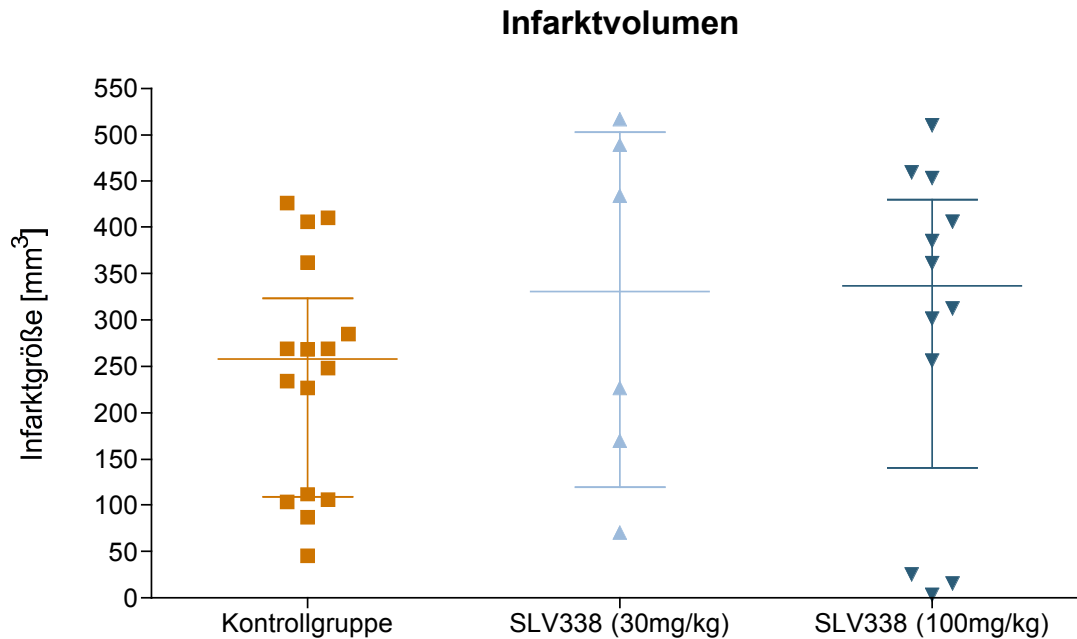


B)



**Abbildung 19: Entnommenes, gefrorenes Gehirn in toto und dessen MRT Aufnahme**

- A) Von SHR-SP entnommenes und gefrorenes Gehirn, deutlich ist schon von außen der hämorrhagische Infarkt zu erkennen.
- B) MRT-Bild des gleichen gefrorenen Gehirns. Das Gehirn liegt in einem Falconröhrchen und ist von Wasser (hier weiß) umgeben.



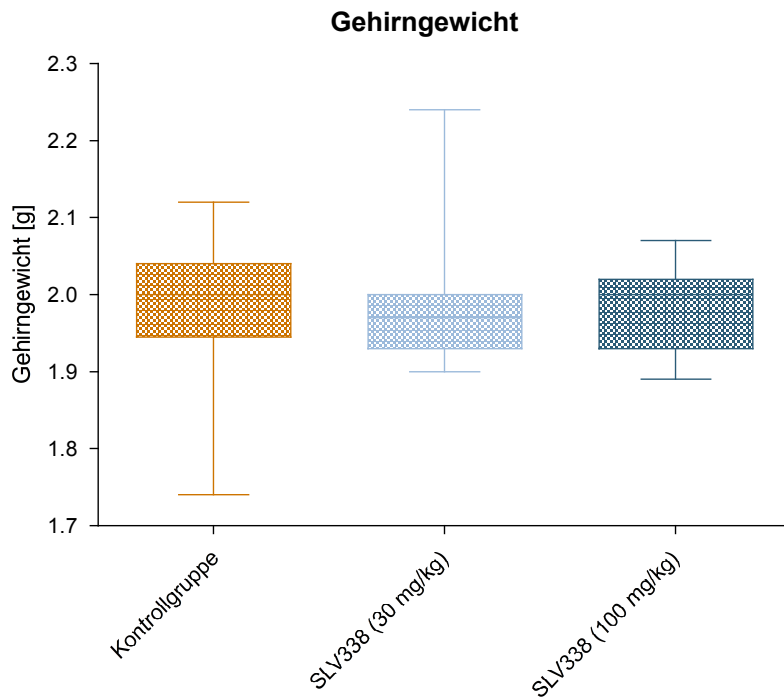
**Abbildung 20: Infarktgrößen Studie C**

Die im MRT ermittelte Infarktgrößen, gemessen wurden nach Ende des Versuchs die gefrorenen Gehirne.

#### 4.3.7 Organgewichte

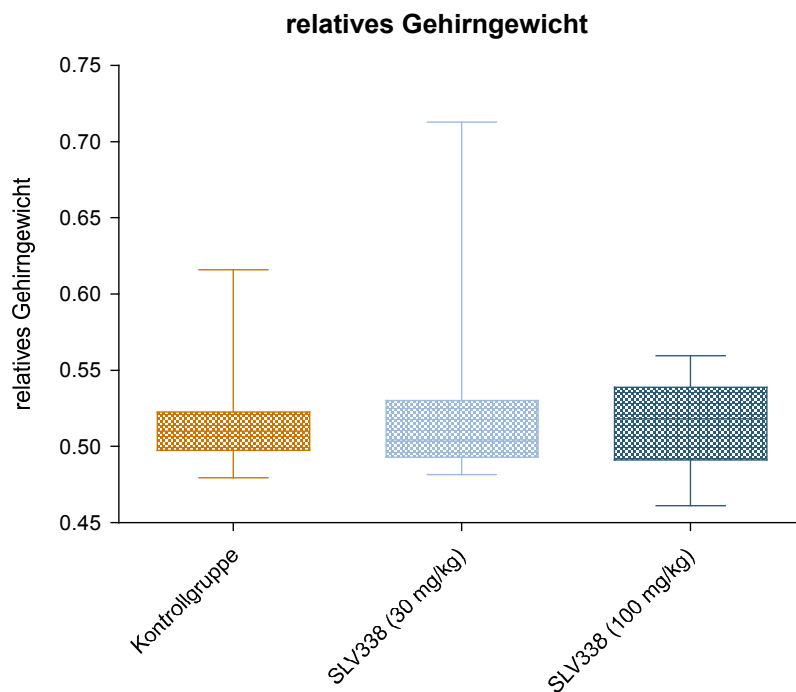
Die Tiere, die am Ende des Versuchs noch lebten, wurden gewogen, getötet, die Organe wurden entnommen und ebenfalls gewogen (Gehirn = Abb. 21; Herz = Abb. 23; Niere = Abb. 25). Der Median des Gehirngewichts lag in der Kontroll- und der 100 mg/kg SLV338 - Gruppe bei 2 g und in der 30 mg/kg SLV338 - Gruppe bei 1,97 g, der des Herzgewichts lag in der Kontrollgruppe bei 1,94 g, in der 30 mg/kg SLV338 - Gruppe 1,81 g und in der 100 mg/kg SLV338 - Gruppe nur 1,89 g. Das mittlere Nierengewicht einer Ratte wurde errechnet als Durchschnitt des Gewichts der rechten und der linken Niere; daraus ergab sich ein medianes Nierengewicht für die Kontrollgruppe von 1,89 g, für die 30 mg/kg SLV338 Gruppe von 2,08 g und für die 100 mg/kg SLV338 Gruppe von 2,00 g. Es lagen keine Unterschiede in den absoluten Organgewichten zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen vor. Zur Bestimmung des relativen Gewichts wurde das Organgewicht anschließend auf das jeweilige Körpergewicht der Ratte bezogen, (relatives Gehirngewicht = Abb. 22; relatives Herzgewicht = Abb. 24; relatives Nierengewicht = Abb. 26). Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

## Ergebnisse



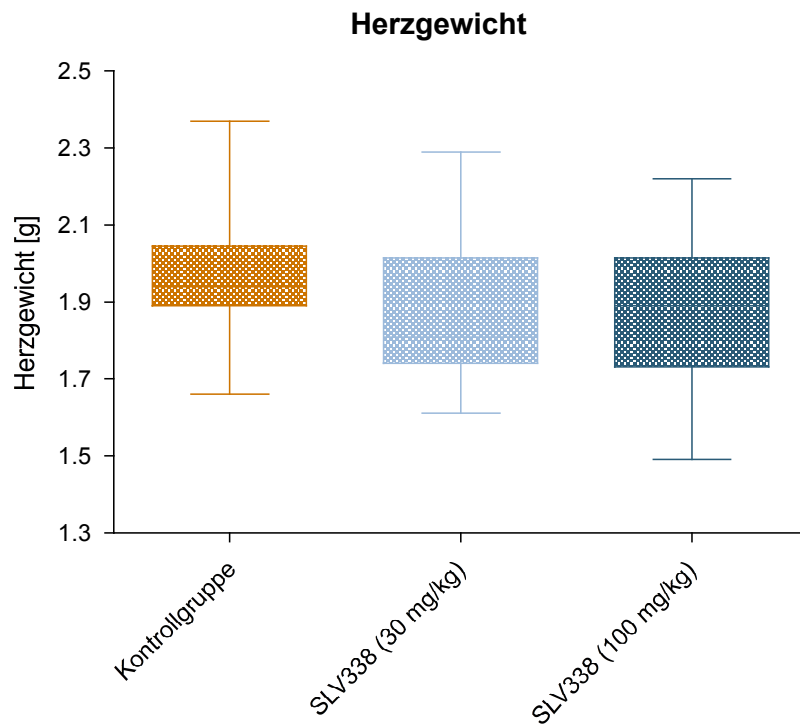
**Abbildung 21: Gehirngewichte Studie C**

Die unterschiedlichen Gehirngewichte der am Ende des Versuchs noch lebenden Tiere. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.



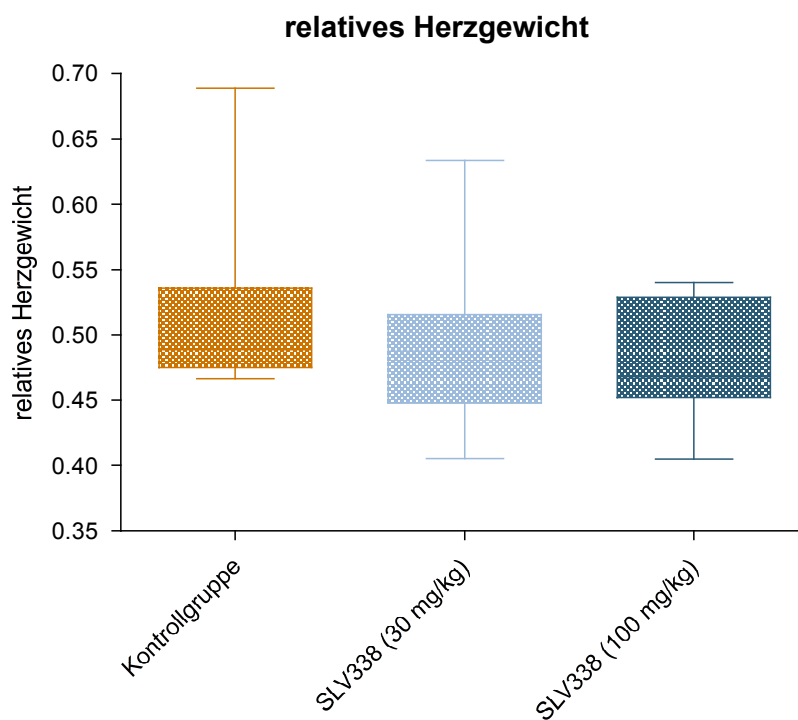
**Abbildung 22: Relative Gehirngewichte Studie C**

Das relative Gehirngewicht der Tiere, bezogen auf das Körpergewicht. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.



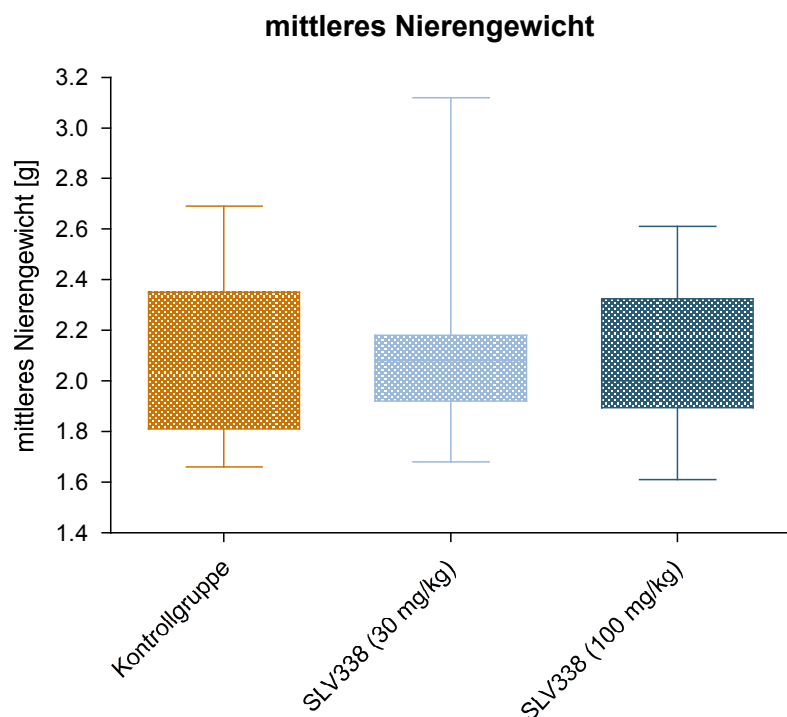
**Abbildung 23: Herzgewichte Studie C**

Das Herzgewicht der am Ende des Versuchs noch lebenden Tiere. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.



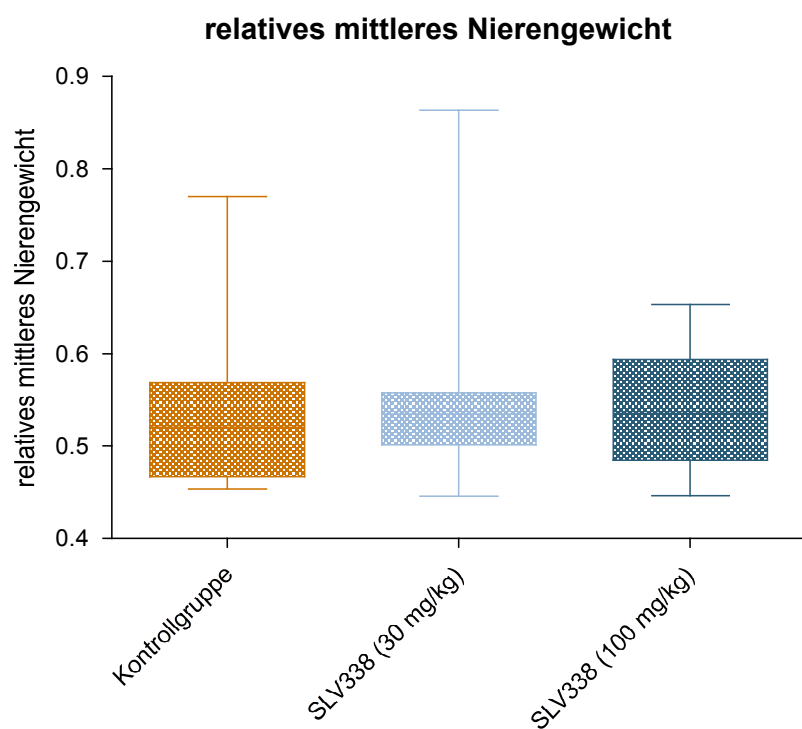
**Abbildung 24: Relative Herzgewichte Studie C**

Das relative Herzgewicht, bezogen auf das Körpergewicht. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.



**Abbildung 25: Mittlere Nierengewichte Studie C**

Das Nierengewicht, als Mittelwert aus rechter und linker Niere, aller am Ende des Versuchs noch lebender Tiere. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.



**Abbildung 26: Relative mittlere Nierengewichte Studie C**

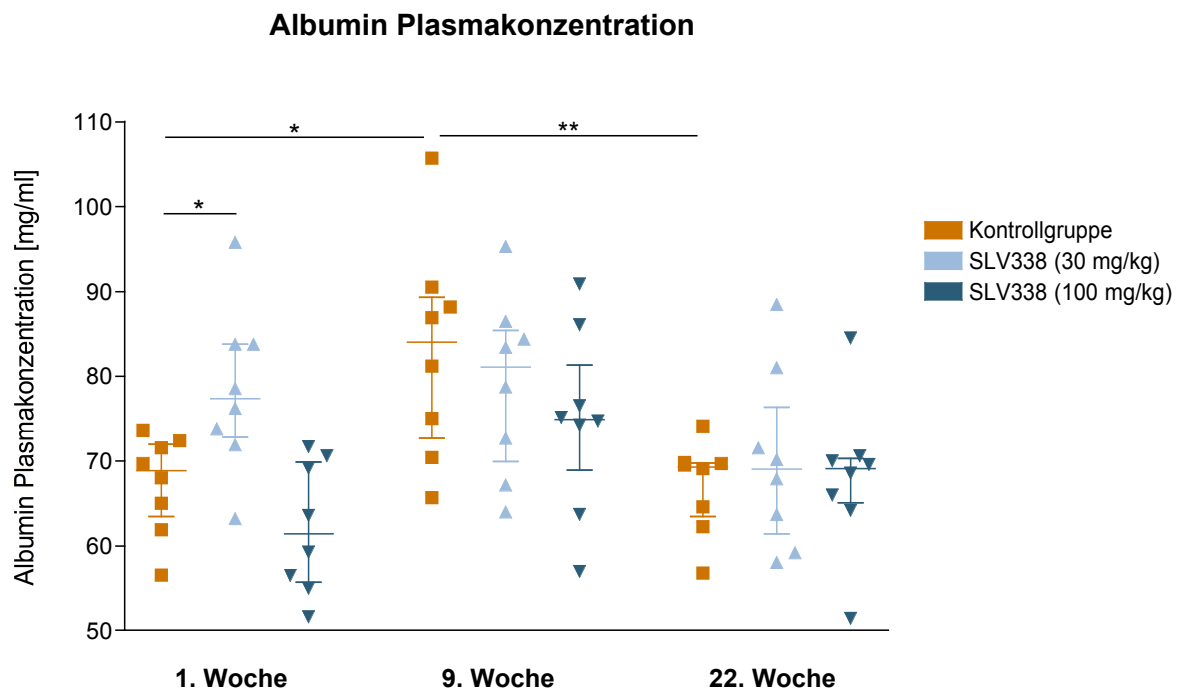
Das relative Nierengewicht, bezogen auf das Körpergewicht. Kontrollgruppe: 8 Tiere; SLV338 (30 mg/kg): 18 Tiere; SLV338 (100 mg/kg): 13 Tiere.

#### 4.3.8 Blutwerte

Zur Bestimmung verschiedener Parameter (Albumin, Kreatinin, Harnstoff, BNP) wurde den SHR-SP Ratten zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten retrobulbär Blut entnommen. Zusätzlich wurde den Tieren am Ende des Versuchs, nachdem sie getötet worden waren, zur Bestimmung weiterer Parameter (BNP, ANP, Big-ET, Endothelin-1) Blut aus der Aorta entnommen.

##### Albumin

Die mediane Albuminkonzentration im Plasma stieg in der Kontrollgruppe von Woche 1 (68,9 mg/ml) zu Woche 9 (84,1 mg/ml) signifikant an, fiel dann jedoch wieder auf den Ausgangswert ab (69,3 mg/ml). Der signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der niedrige dosierten Behandlungsgruppe in Woche 1 kann nicht erklärt werden, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch nicht behandelt wurden. (Abb. 27).

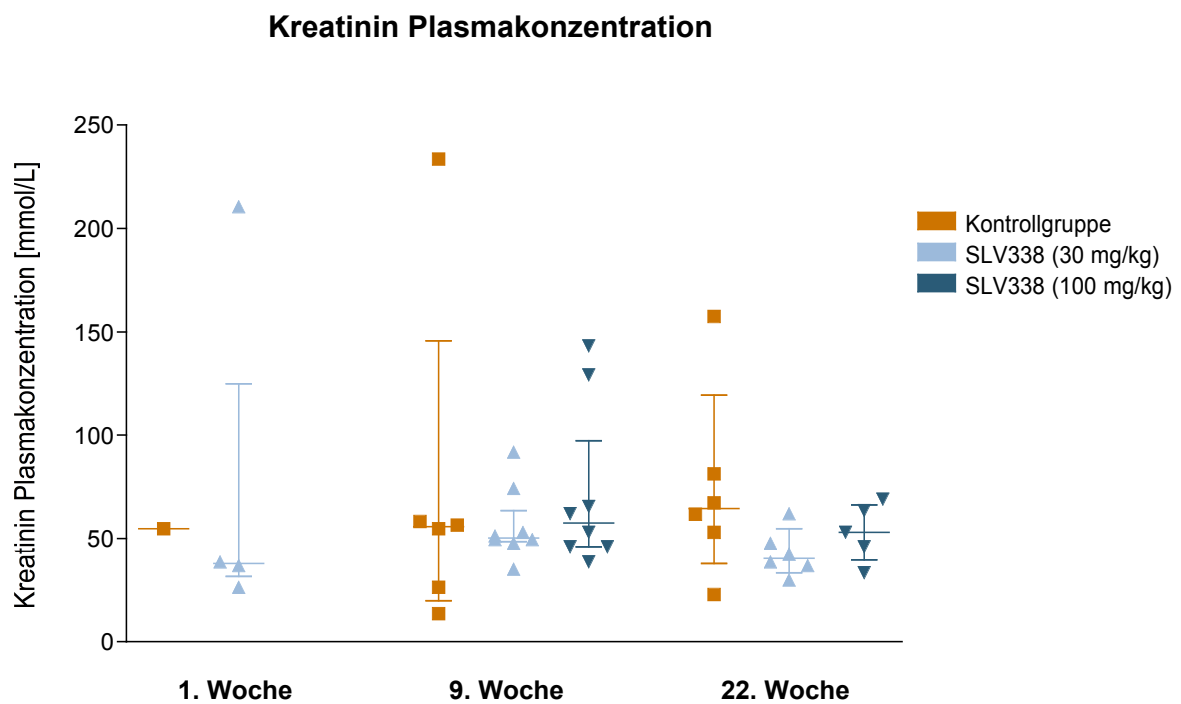


**Abbildung 27: Verlauf der Albumin – Plasmakonzentration Studie C**

Die im Plasma zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Albuminwerte zu drei verschiedenen Zeitpunkten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

*Kreatinin*

Bei den in Woche 1, 9 und 22 gemessenen Kreatinin – Werten im Plasma waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten. Nur in Woche 22 wurde eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe etwas geringere mediane Kreatinin – Plasmakonzentration in der niedrig dosierten SLV338 Gruppe gemessen (Abb. 28). Da nicht zu jedem Zeitpunkt ausreichend Blut von den einzelnen Tieren gewonnen werden konnte, konnte die Kreatinin Plasmakonzentration in Woche 1 und Woche 22 nicht von allen Tieren bestimmt werden.



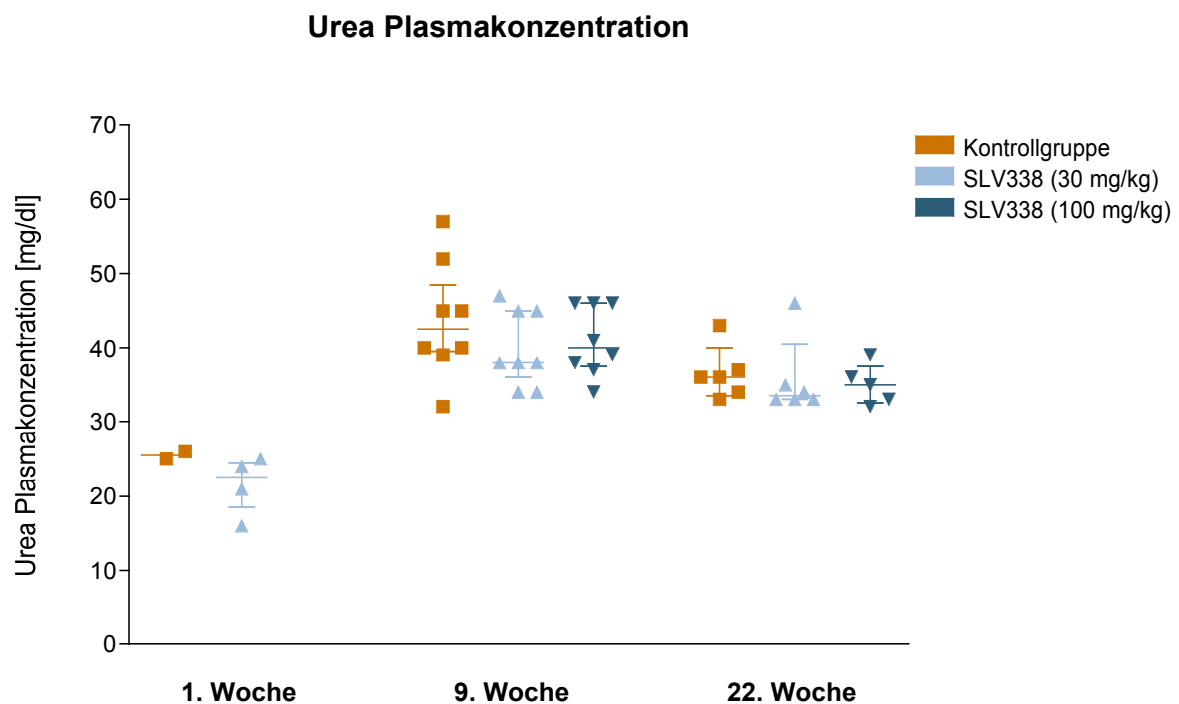
**Abbildung 28: Verlauf der Kreatinin – Plasmakonzentration Studie C**

Die im Plasma zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Kreatininwerte.



### Urea

Bei den in Woche 1, 9 und 22 gemessenen Urea – Plasmakonzentrationen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 29). Die Harnstoff-Konzentrationen stiegen von Woche 1 zu Woche 9 etwas an, blieben im weiteren Verlauf des Versuches jedoch relativ konstant. Auch für die Bestimmung der Urea Plasmakonzentration war nicht zu jedem Zeitpunkt ausreichend Plasma von allen 8 Tieren vorhanden.

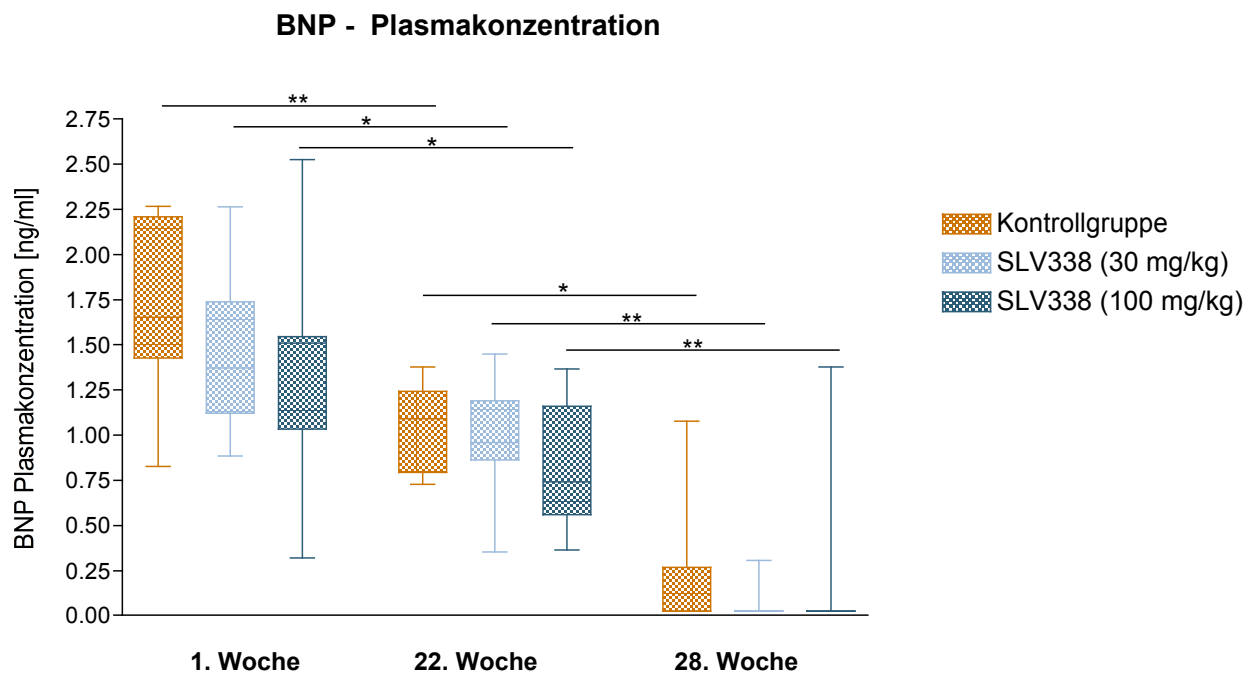


**Abbildung 29: Verlauf der Urea – Plasmakonzentration Studie C**

Die im Plasma zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Ureawerte.

**BNP**

Bei der in Woche 1, 22 und 28 gemessenen BNP – Plasmakonzentration ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen. Innerhalb der drei Untersuchungsgruppen fielen die BNP- Konzentrationen im Laufe des Versuches jedoch signifikant ab (Abb. 30).

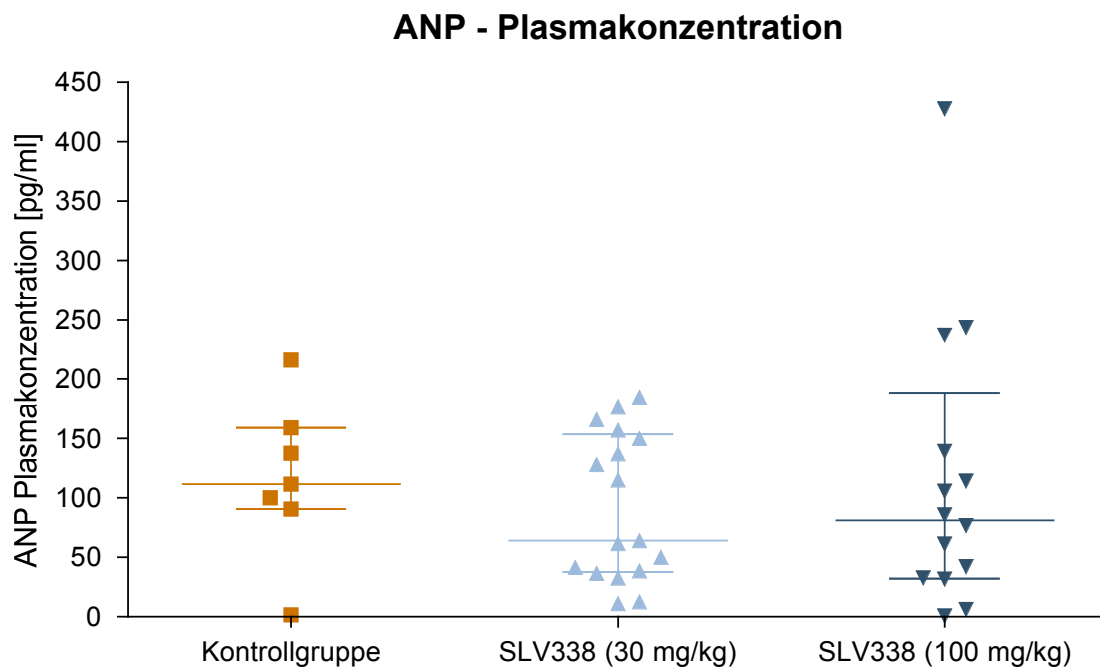


**Abbildung 30: Verlauf der BNP – Plasmakonzentration Studie C**

Die BNP – Plasmakonzentrationen, gemessen in Woche 1, 22 und 28. n=8; für Woche 28: Kontrollgruppe n=8; SLV338 (30 mg/kg) n=18; SLV338 (100 mg/kg) n=13. \*p < 0,5; \*\*p < 0,01.

**ANP**

Die im finalen Blut (Woche 28) gemessene ANP Konzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 31) und der Median lag in der Kontrollgruppe bei 111,3 pg/ml, in der niedrig dosierten SLV338- Gruppe bei 63,8 pg/ml und in der hoch dosierten SLV338- Gruppe bei 80,8 pg/ml.

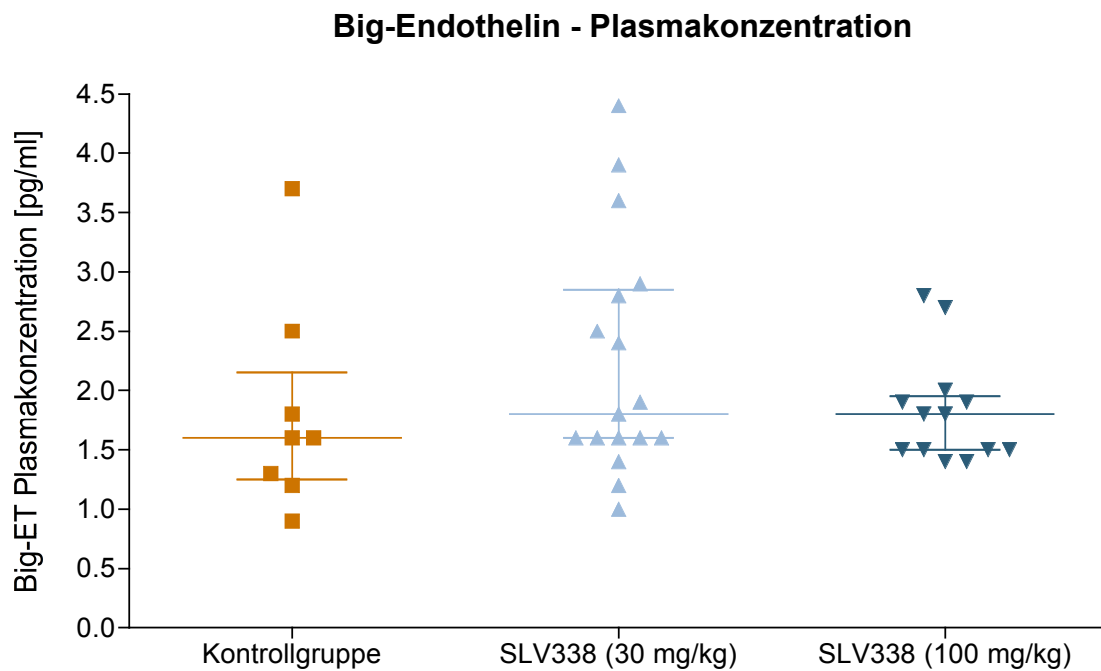


**Abbildung 31: ANP – Plasmakonzentration Studie C**

ANP- Konzentration gemessen in final gewonnenem Blut (Woche 28).

*Big – Endothelin*

Der Median der Big – Endothelin – Konzentration, gemessen in final gewonnenem Blut (Woche 28), lag in der Kontrollgruppe bei 1,6 pg/ml und in den behandelten Gruppen bei 1,8 pg/ml (Abb. 32). Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden.

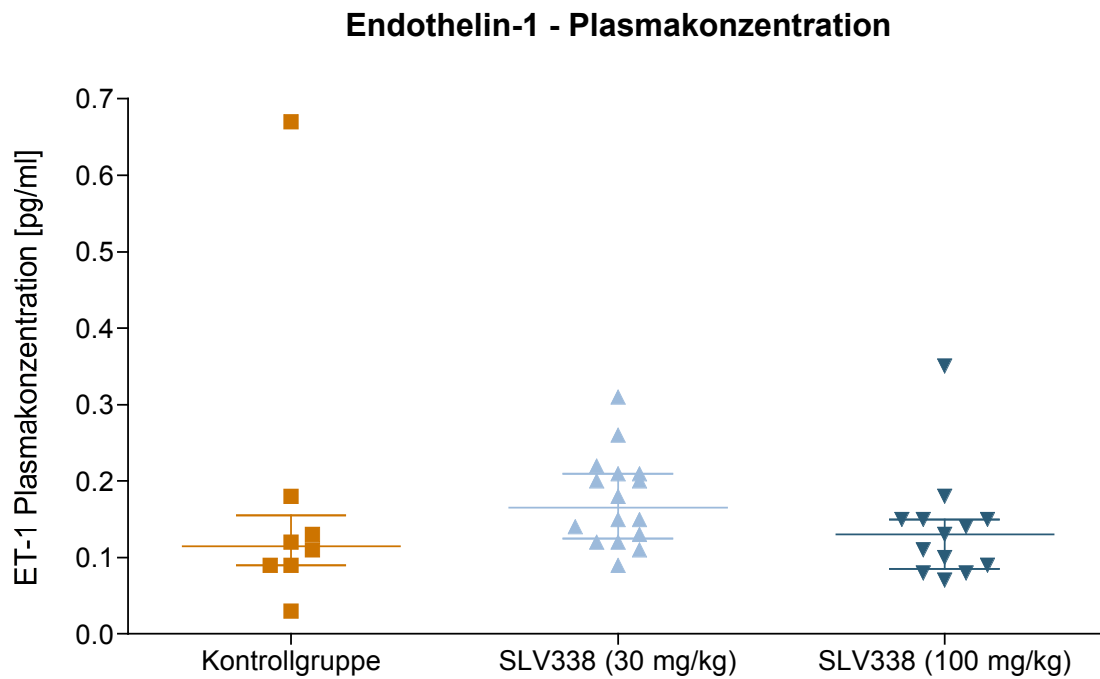


**Abbildung 32: Big-Endothelin – Plasmakonzentration Studie C**

Big – Endothelin – Plasmakonzentration, gemessen in final gewonnenem Blut (Woche 28).

*Endothelin-1*

Der Median der im finalen Blut (Woche 28) gemessene Endothelin-1 – Konzentration lag in der Kontrollgruppe bei 0,12 pg/ml, in der mit 30 mg/kg SLV338 behandelten Gruppe bei 0,17 pg/ml und der mit 100 mg/kg SLV338 behandelten Gruppe bei 0,13 pg/ml und (Abb. 33).

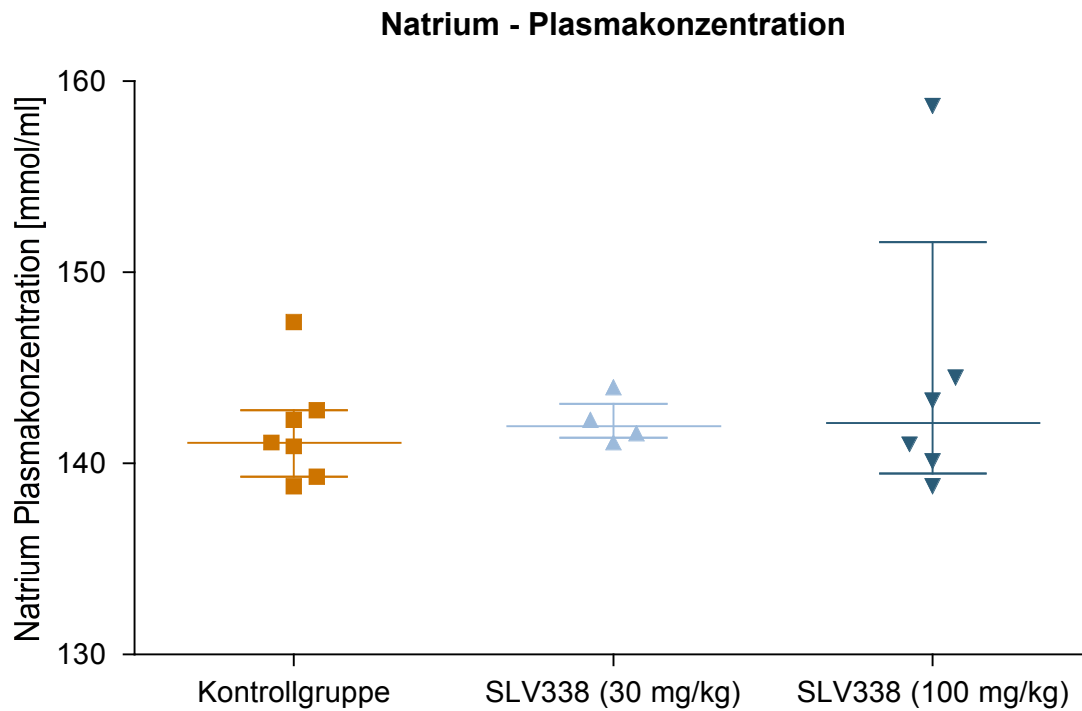


**Abbildung 33: Endothelin-1 – Plasmakonzentration Studie C**

Die von Endothelin-1 gemessene Konzentration in final gewonnenem Blut (Woche 28).

*Natrium*

Die in Woche 22 gemessenen Natrium – Plasmakonzentrationen lagen bei allen Tieren im physiologischen Bereich (Median in der Kontrollgruppe: 141,1 mmol/L; Median in der 30 mg/kg SLV338 - Gruppe: 142,2 mmol/L; Median in der 100 mg/kg SLV338 - Gruppe: 142,0 mmol/L) und wiesen keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auf (Abb. 34).



**Abbildung 34: Natrium – Plasmakonzentration Studie C**

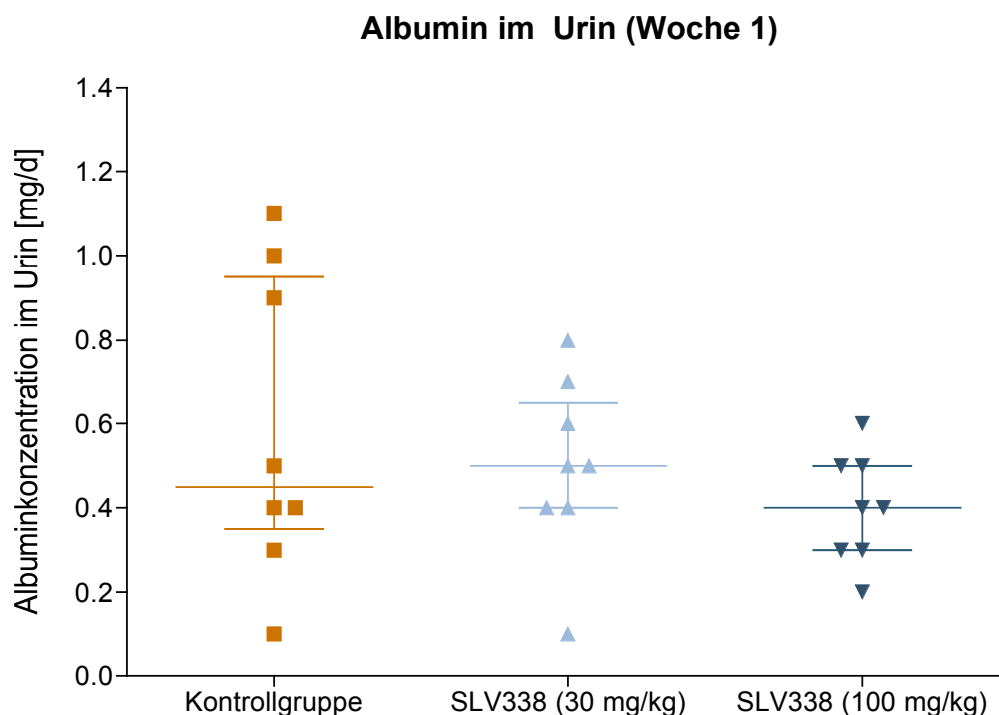
Natrium- Konzentration gemessen in Woche 22 in allen drei Untersuchungsgruppen.

#### 4.3.9 Urinwerte

Es wurden während des Versuches zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1, 9 und 22) Urinproben von je 8 Tieren pro Gruppe zur Bestimmung verschiedener Parameter (Albumin, Kreatinin, Harnstoff und cGMP) und Berechnung der glomerulären Filtrationsrate gewonnen.

##### *Albumin*

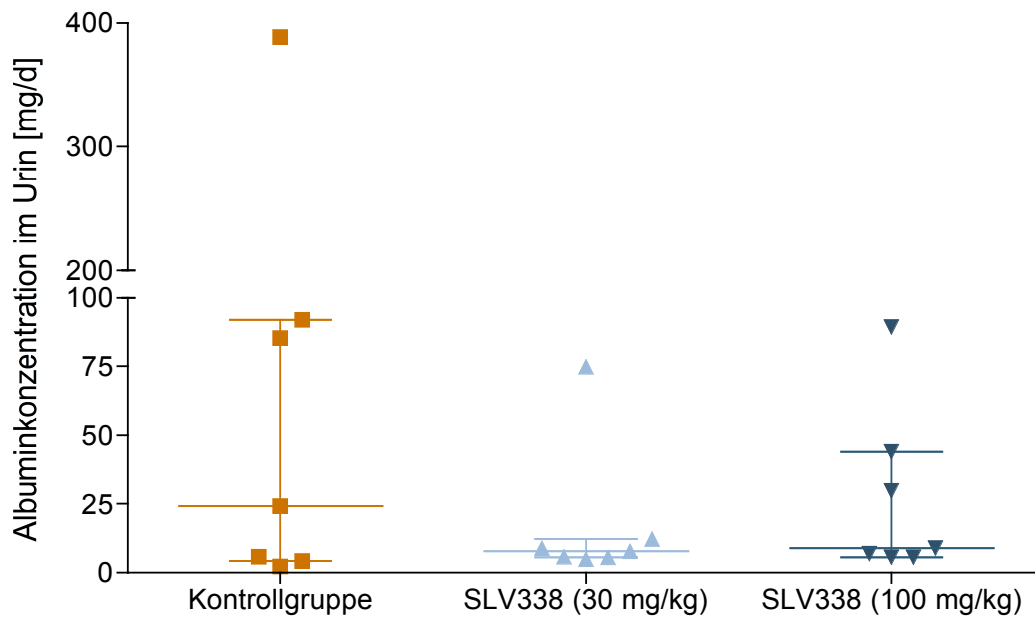
Bei der in Woche 1 (Abb. 35) ermittelten Menge Albumin pro Tag konnten keine Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen festgestellt werden. In Woche 9 zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Albuminurie in den behandelten Gruppen (Median in der Kontrollgruppe: 24,2 mg/d; Median in der 30 mg/kg SLV338 - Gruppe: 7,8 mg/d; Median in der 100 mg/kg SLV338 - Gruppe: 8,8 mg/d) (Abb. 36). In Woche 22 verschwand dieser Effekt wieder, da die am meisten geschädigten Tiere aus der Kontrollgruppe bereits verstorben waren, während sie in den behandelten Gruppen noch lebten und so die Ergebnisse negativ beeinflussten (Abb. 37).



**Abbildung 35: Albumin – Urinkonzentration in Woche 1 Studie C**

Die in Woche 1 gemessene Albuminmenge im Urin pro Tag.

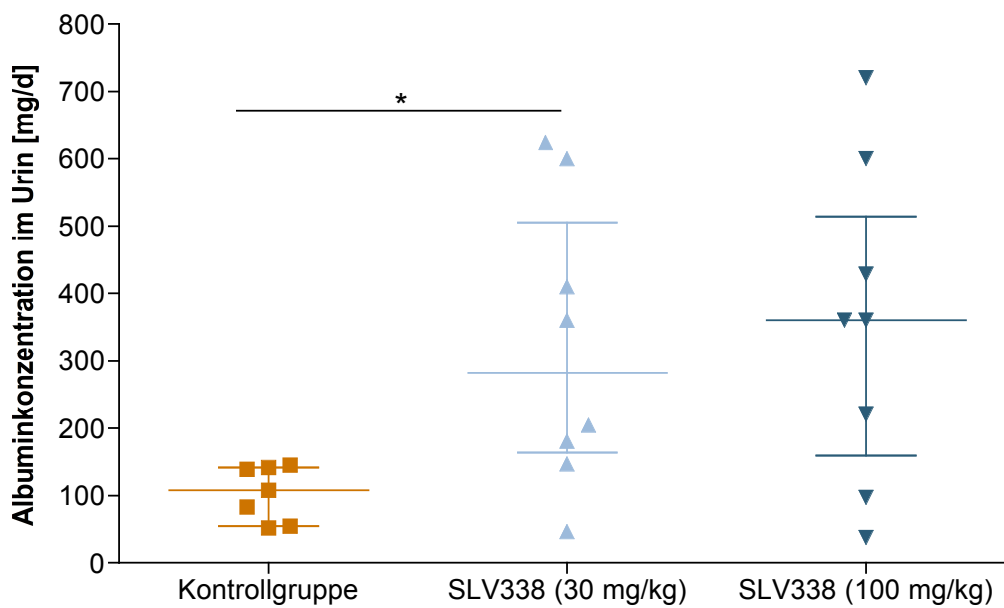
### Albumin im Urin (Woche 9)



**Abbildung 36: Albumin – Urinkonzentration in Woche 9 Studie C**

Die in Woche 9 gemessene Albuminmenge im Urin pro Tag.

### Albumin im Urin (Woche 22)



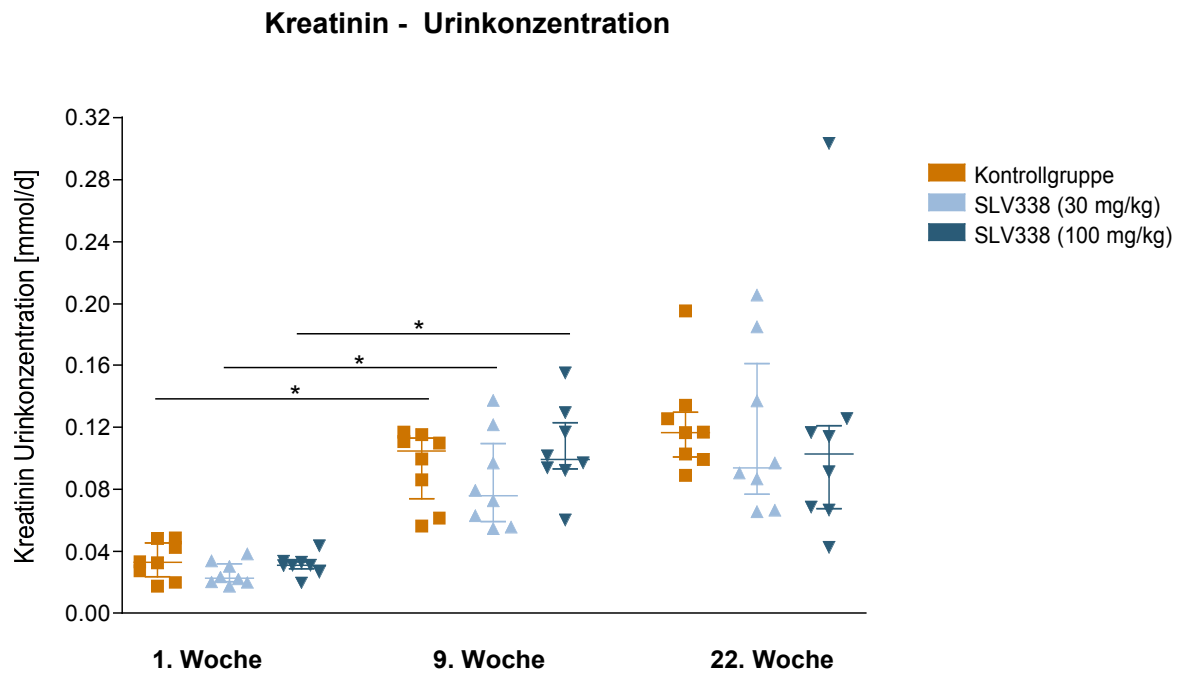
**Abbildung 37: Albumin – Urinkonzentration in Woche 22 Studie C**

Die in Woche 22 gemessene Albuminmenge im Urin pro Tag. \*p<0,05.



### Kreatinin

Die zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1, 9 und 22) ermittelte Kreatininmenge im Urin pro Tag stieg in allen Gruppen signifikant zwischen Woche 1 und 9 an (Abb. 38). In Woche 9 und 22 war der Median der ausgeschiedenen Kreatininmenge pro Tag in den mit SLV338 behandelten Gruppen etwas geringer, allerdings ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

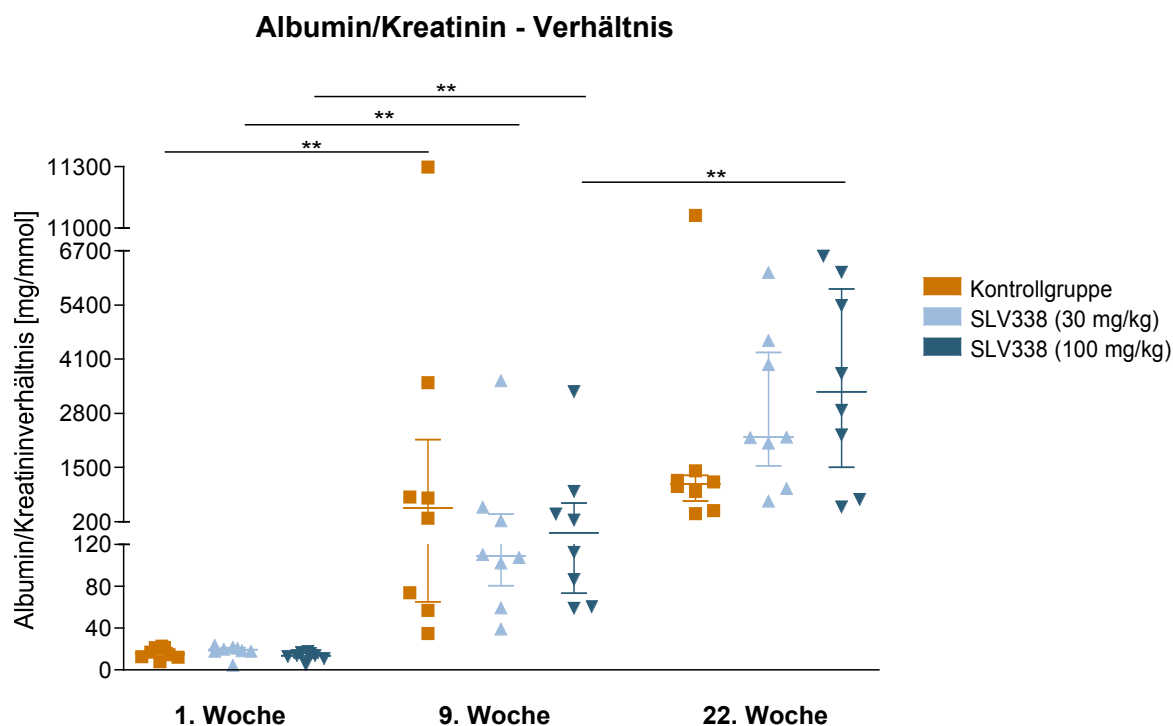


**Abbildung 38: Verlauf der Kreatinin – Urinkonzentration Studie C**

Die im Urin gemessene Menge Kreatinin pro Tag zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der Studie. \*p < 0,05.

*Albumin/ Kreatinin Verhältnis*

Da die Albuminkonzentration im Harn auch durch die Harnkonzentration beeinflusst wird und es zu falsch positiven (Harn ist sehr konzentriert) oder falsch negativen (geringe Harnkonzentration) Aussagen (Diuresefehler) über die Nierenfunktion kommen kann, wird das Albumin/ Kreatinin Verhältnis berechnet. Der Kreatininwert im Urin gilt als Maß für die Harnkonzentration und ist daher als Korrekturfaktor geeignet, um Diuresefehler zu vermeiden und einen von der Urinkonzentration unabhängigen Quotienten zu bilden. Mit Hilfe dieses Quotienten kann dann die Nierenfunktion beurteilt werden. In dieser Studie stieg das Verhältnis von Albumin zu Kreatinin während des Versuchs in allen Gruppen an, wobei dieser Anstieg in der Kontrollgruppe schneller war, so dass in Woche 9 der mediane Quotient der Kontrollgruppe 3, bzw. 5fach über dem der behandelten Gruppen lag (Kontrollgruppe: 542,9 mg/mmol; 30 mg/kg SLV338: 109,1 mg/mmol; 100 mg/kg SLV338: 171,4 mg/mmol) (Abb. 39). Innerhalb der einzelnen Gruppen gab es große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren.

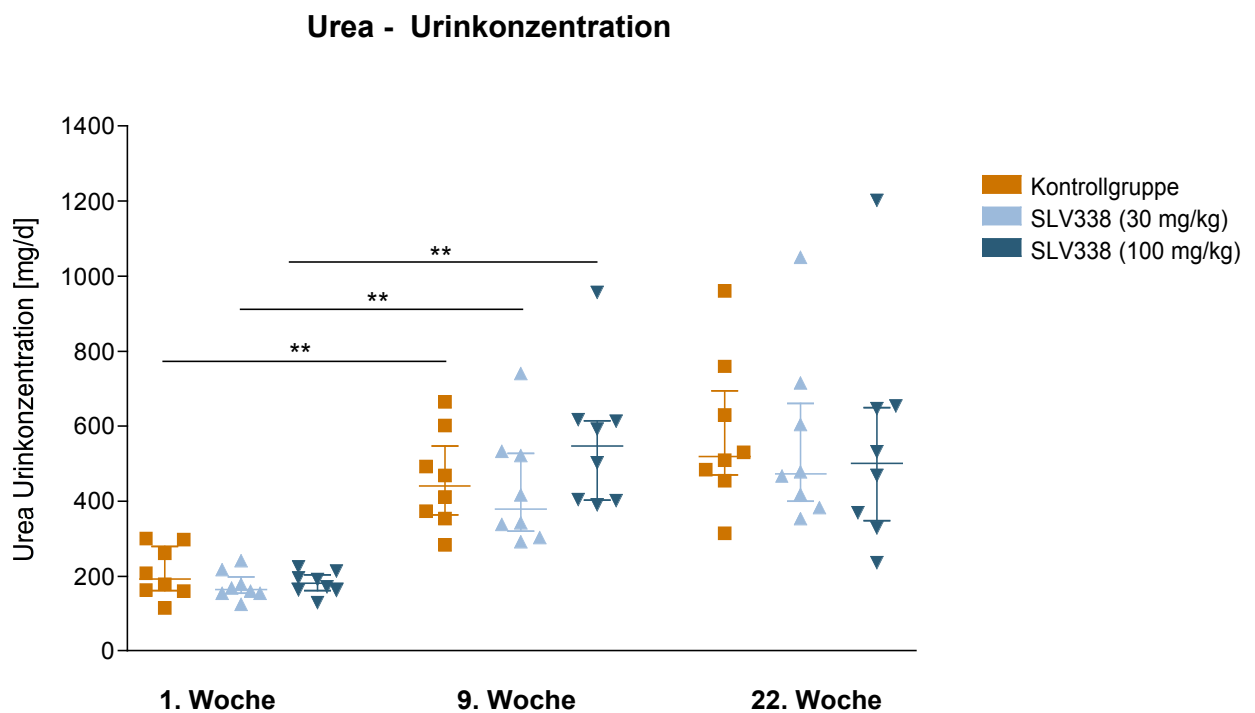


**Abbildung 39: Verlauf des Albumin/ Kreatininverhältnisses Studie C**

Das Albumin -Kreatinin Verhältnis im Laufe der Studie. \*\*p < 0,01.

### Harnstoff

Die Ureakonzentration im Urin wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die abgegebene Menge pro Tag berechnet. Der Median des ausgeschiedenen Harnstoffs stieg von Woche 1 bis Woche 9 in allen Gruppen signifikant an (von durchschnittlich 193, 165 und 182 mg/d auf 440, 379 und 547 mg/d), blieb danach jedoch relativ konstant bis zum Ende des Versuchs (Abb. 40). Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



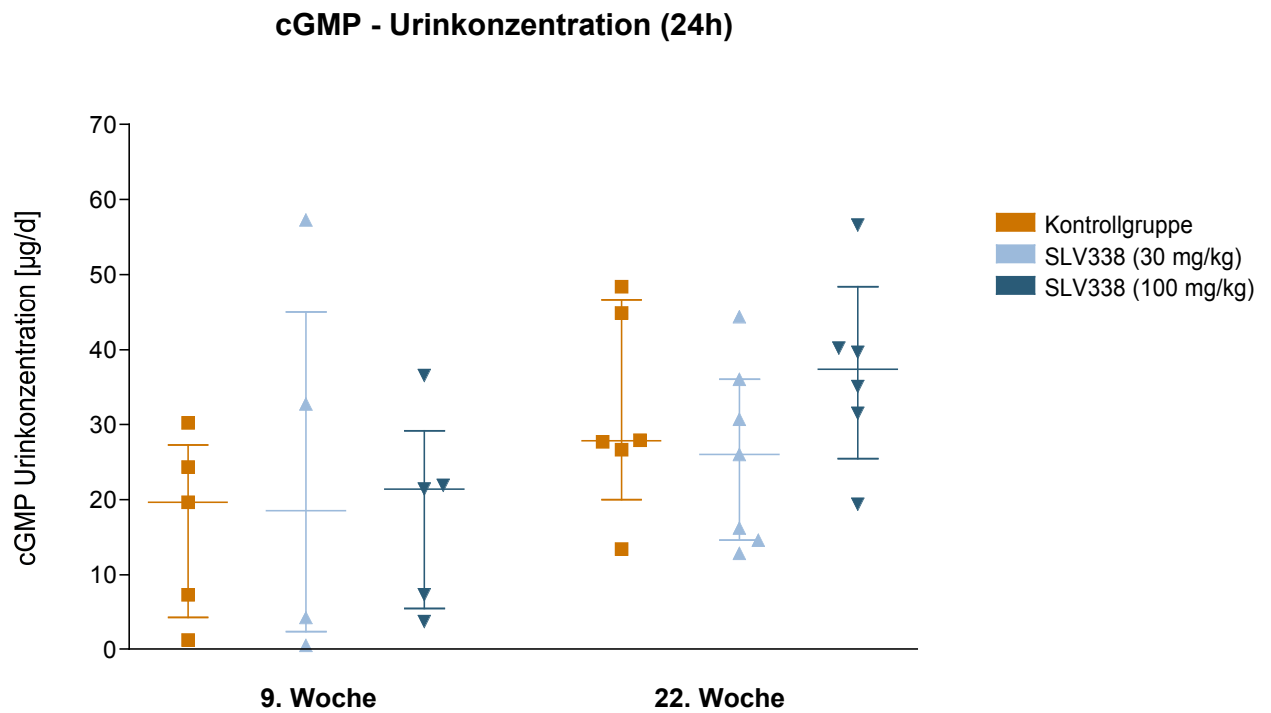
**Abbildung 40: Verlauf der Urea – Urinkonzentration Studie C**

Die im Urin gemessene Menge Harnstoff pro Tag zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der Studie. \*\*p < 0,01.

## Ergebnisse

### cGMP

Die cGMP Konzentration im Urin wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1 und 22) gemessen und die ausgeschiedene Menge pro Tag berechnet. Zwischen den Medianen der Gruppen gab es an den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede und die ausgeschiedene Menge stieg in allen Gruppen im Laufe der Studie geringfügig an (Abb. 41).

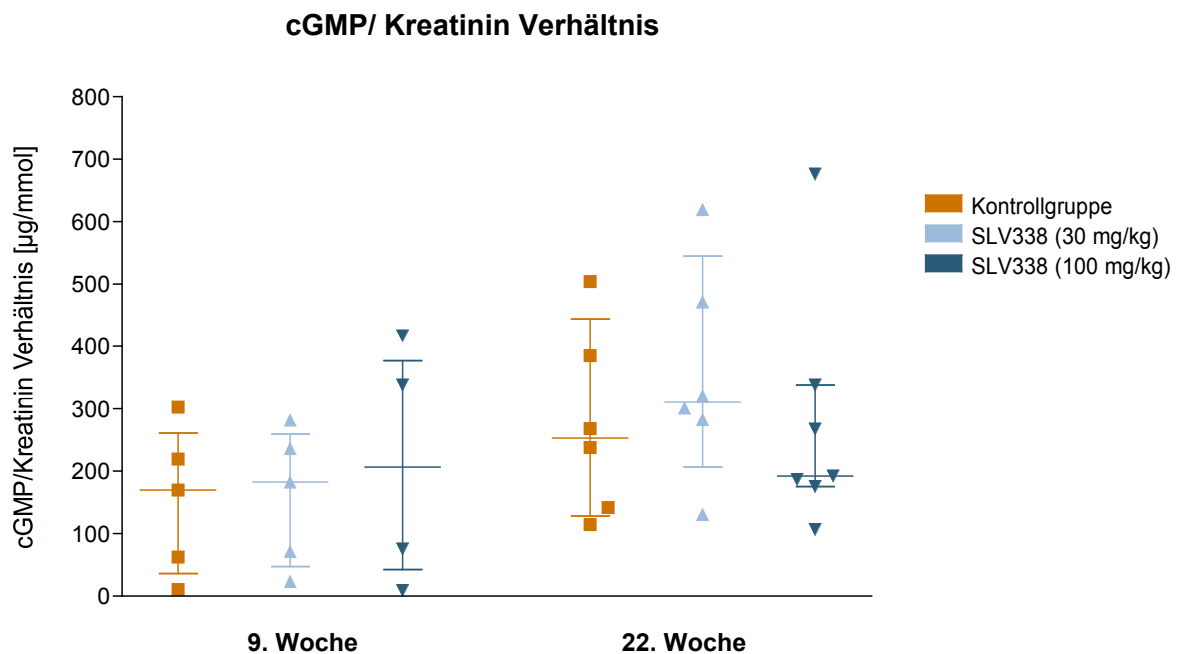


**Abbildung 41: Verlauf der Urin- cGMP Konzentration Studie C**

Die im Urin ausgeschiedene Menge cGMP pro Tag.

*cGMP/ Kreatinin Verhältnis*

Das cGMP/Kreatinin Verhältnis wurde berechnet, um mögliche Diuresefehler auszuschließen. Die mediane Ausscheidung nahm im Laufe der Studie in allen Gruppen unterschiedlich stark zu (Kontrollgruppe Median von 170 ng/mmol auf 253 ng/mmol, niedrig dosierte Gruppe von 183 ng/mmol auf 311 ng/mmol und hoch dosierte Gruppe von 207 ng/mmol auf 193 ng/mmol). Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren zu den gemessenen Zeitpunkten allerdings keine Unterschiede zu erkennen (Abb. 42).



**Abbildung 42: Verlauf des cGMP/ Kreatininverhältnisses Studie C**

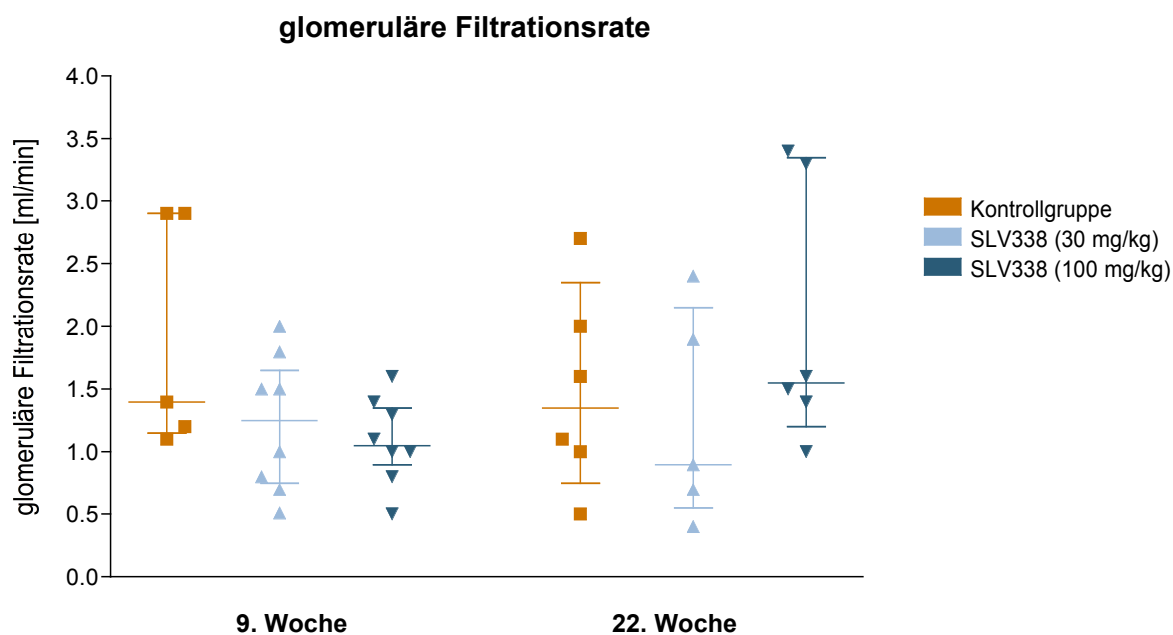
Das Verhältnis von cGMP bezogen auf die täglich ausgeschiedene Kreatininmenge zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während des Versuchs.

## Ergebnisse

### Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die mediane glomeruläre Filtrationsrate blieb während des Studienverlaufs relativ konstant (1,05 – 1,4 ml/min in Woche 1 und 0,9 – 1,55 ml/min in Woche 22) und es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Abb. 43).

Messungen in der Woche 1 konnten nicht berücksichtigt werden, da in zu wenigen Tieren eine zur Kreatininbestimmung ausreichende Plasmamenge gewonnen werden konnte.



**Abbildung 43: Verlauf der glomerulären Filtrationsrate Studie C**

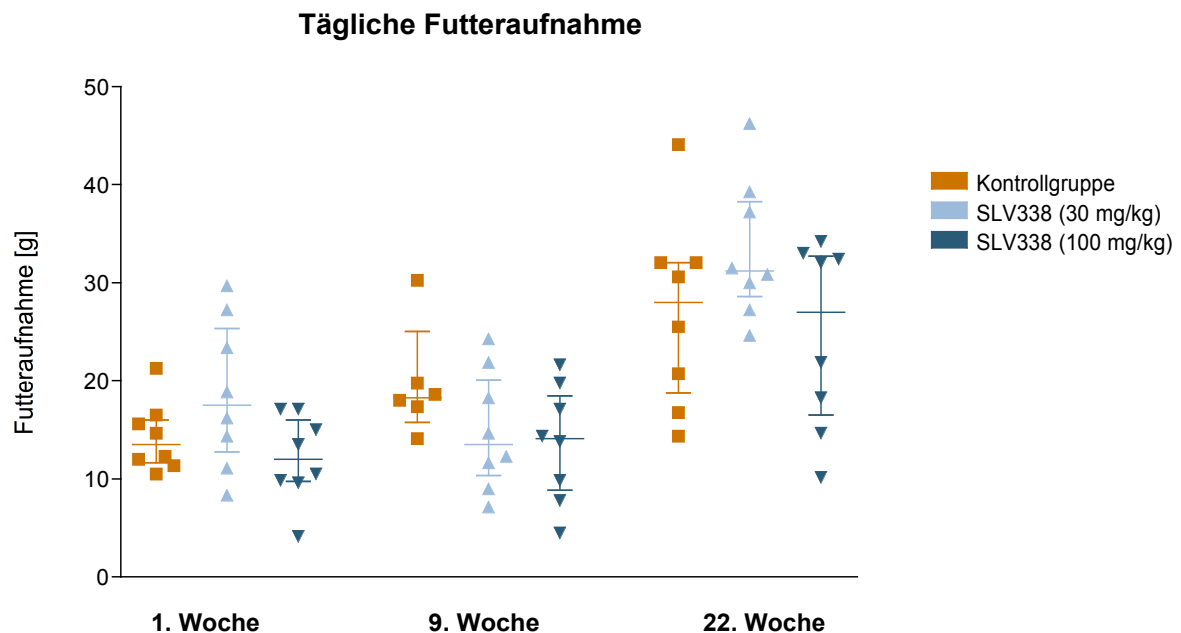
Die glomeruläre Filtrationsrate zu zwei verschiedenen Zeitpunkten.

#### 4.3.10 Stoffwechselkäfig

Zur Bestimmung der Futter- und Wasseraufnahme und der täglich abgegebenen Urinmenge wurden jeweils 8 Ratten pro Gruppe zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1, 9 und 22) für 8 h in den metabolischen Käfig gesetzt.

##### *Futtermittelaufnahme*

Die mediane tägliche Futtermittelaufnahme der Tiere stieg während der Studie in allen Gruppen zwischen Woche 9 und 22 deutlich an (Abb. 44), zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich die aufgenommenen Futtermengen jedoch nur geringfügig.



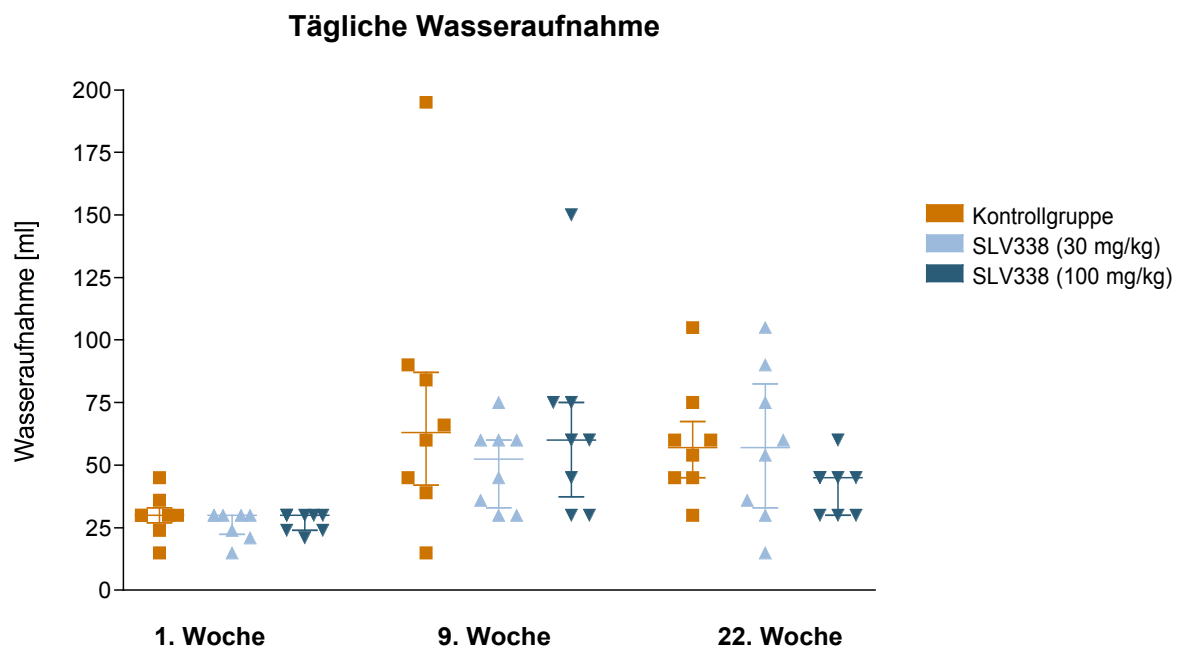
**Abbildung 44: Verlauf der Futtermittelaufnahme Studie C**

Die Futtermittelaufnahme der Tiere, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Stoffwechselkäfig.

## Ergebnisse

### Wasseraufnahme

Die mediane Wasseraufnahme der Tiere stieg zwischen Woche 1 und 9 in allen Gruppen deutlich an (Abb. 45) und blieb ab diesem Zeitpunkt konstant. Es sind keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu sehen.



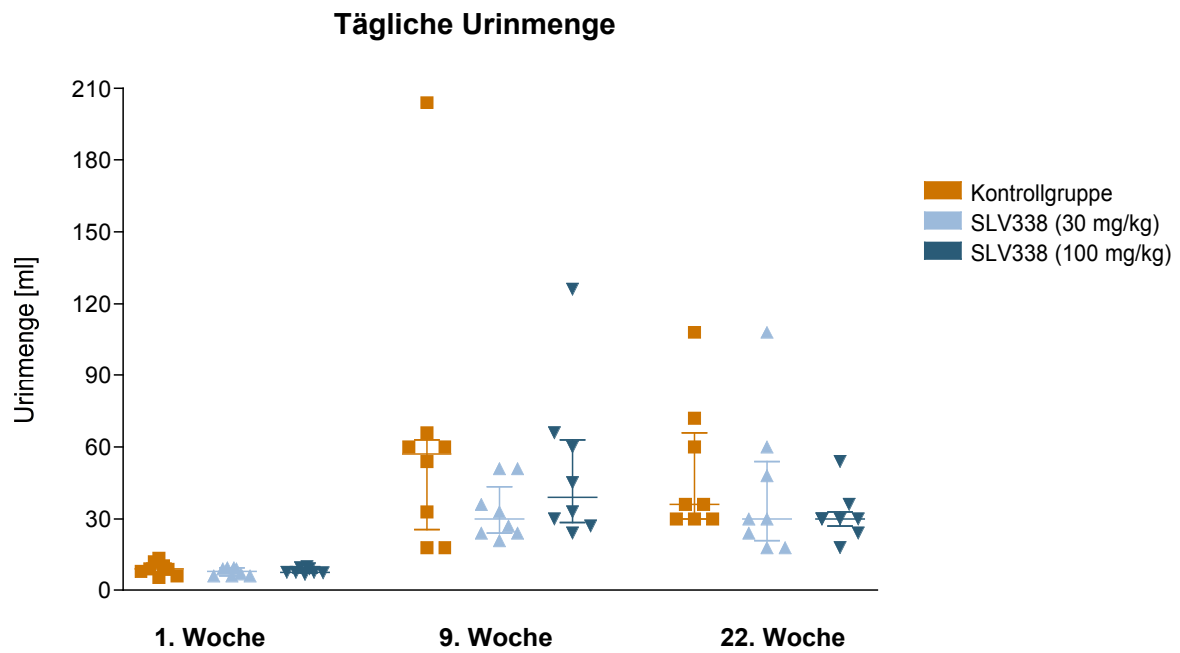
**Abbildung 45: Verlauf der Wasseraufnahme Studie C**

Die Wasseraufnahme der Tiere, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Stoffwechselkäfig.



### Urinmenge

Die täglich abgegebene Urinmenge der Tiere stieg besonders zwischen Woche 1 und 9 in allen Gruppen an (Abb. 46). Die mediane Urinmenge der Kontrollgruppe war in Woche 9 im Vergleich zu den behandelten Gruppen um das 1,9, bzw. 1,5fache erhöht (Kontrollgruppe: 57 ml, niedrig dosierte Gruppe: 30 ml, hoch dosierte Gruppe 39 ml).

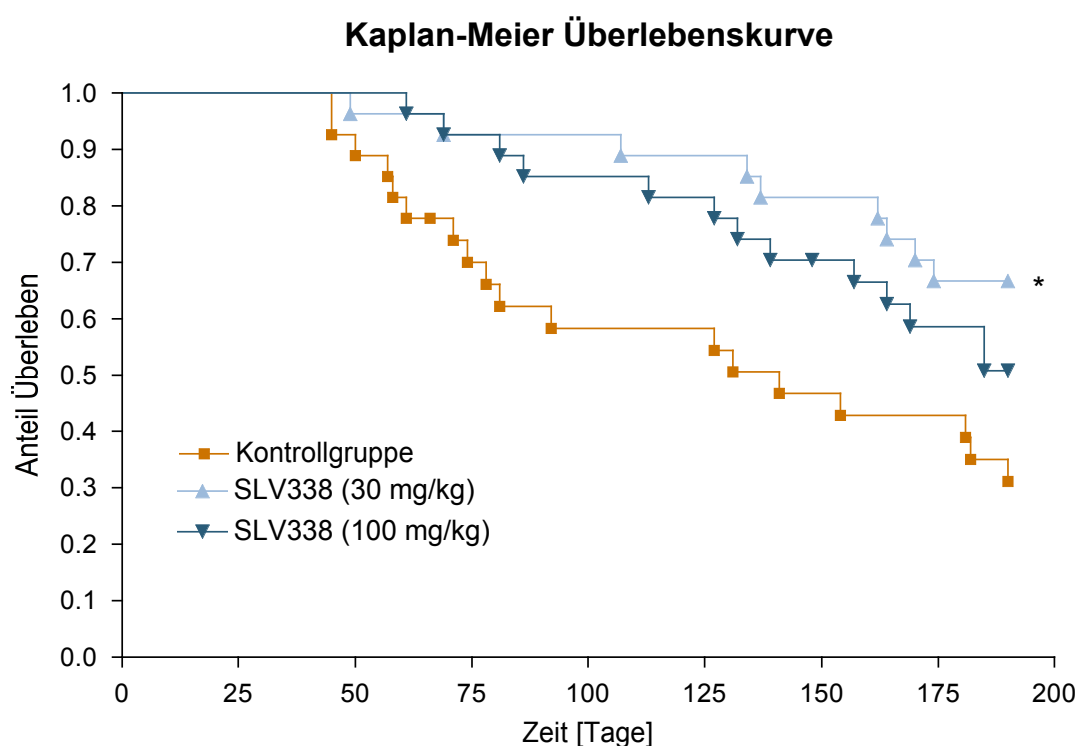


**Abbildung 46: Verlauf der abgegebenen Urinmenge Studie C**

Die tägliche Urinmenge der Tiere, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Stoffwechselkäfig.

### 4.3.11 Mortalität

Die Ratten, die mit SLV338 behandelt wurden, überlebten signifikant länger als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 47). Dies konnte in beiden Behandlungsgruppen beobachtet werden, war jedoch eindeutiger in der Gruppe, die mit 30 mg/kg SLV338 behandelt wurde. Hier waren die Schlaganfallhäufigkeit und damit auch die Todesfälle signifikant erniedrigt im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Am Ende des Versuchs lebten noch 2/3 der mit 30 mg/kg SLV338 behandelten Gruppe, die Hälfte der mit 100 mg/kg behandelten Gruppe und weniger als 1/3 der Kontrollgruppe.



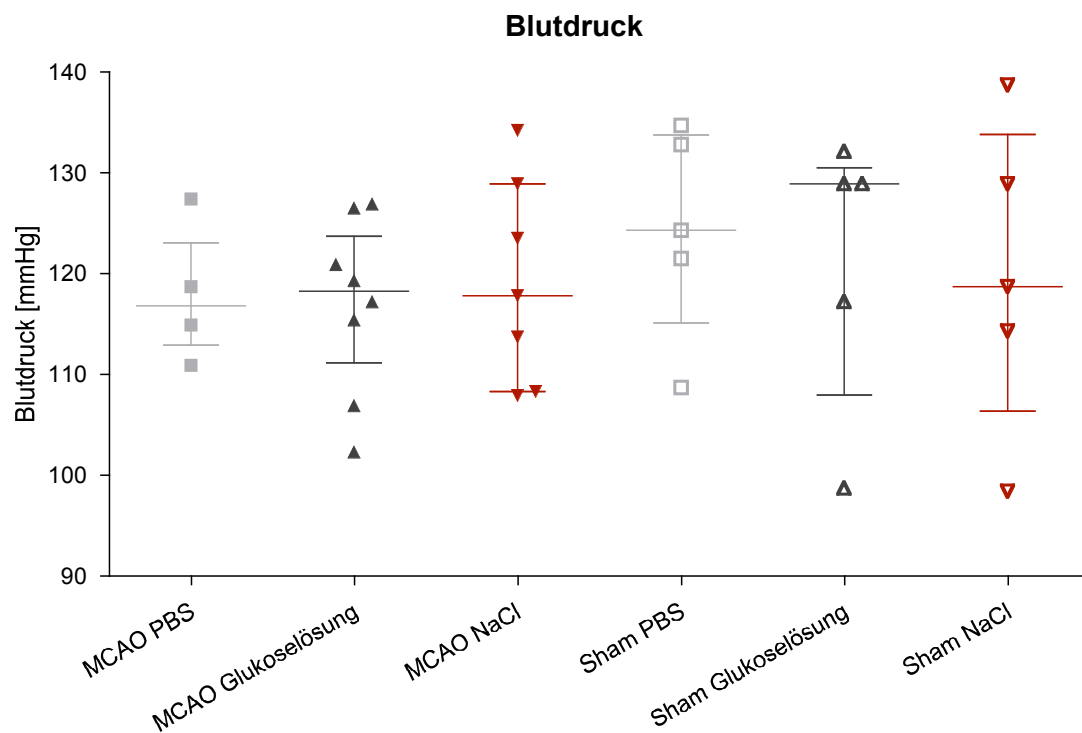
**Abbildung 47: Mortalitätskurve Studie C**

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Maier aller drei Behandlungsgruppen. \*p < 0,05.

## 4.4 Studie D

### 4.4.1 Blutdruck

Der Blutdruck der einzelnen Tiere wurde vor der Operation und damit vor Beginn der Behandlung initial mit der *tail cuff* Methode gemessen. Der Blutdruck aller Tiere lag im physiologischen Bereich (Median der einzelnen Gruppen lag zwischen 117 und 129 mmHg) (Abb. 48).



**Abbildung 48: Blutdruck Studie D**

Der Blutdruck der Ratten gemessen vor der Operation mit *tail cuff* Methode.

#### 4.4.2 Blutgase

Die Blutgase, der pH-Wert, die Glukose-, Natrium- und Kaliumkonzentration und der Hämatokrit wurden anschließend an die jeweilige Operation, MCAO oder Sham, in retrobulbär gewonnenem Blut gemessen. In Tabelle 5 sind die Medianwerte der einzelnen Gruppen mit dem 1. und dem 3. Quartil in Klammern angegeben. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Tieren zu erkennen. Eine leichte Hyperkapnie aufgrund der Narkose konnte in allen Tieren nachgewiesen werden.

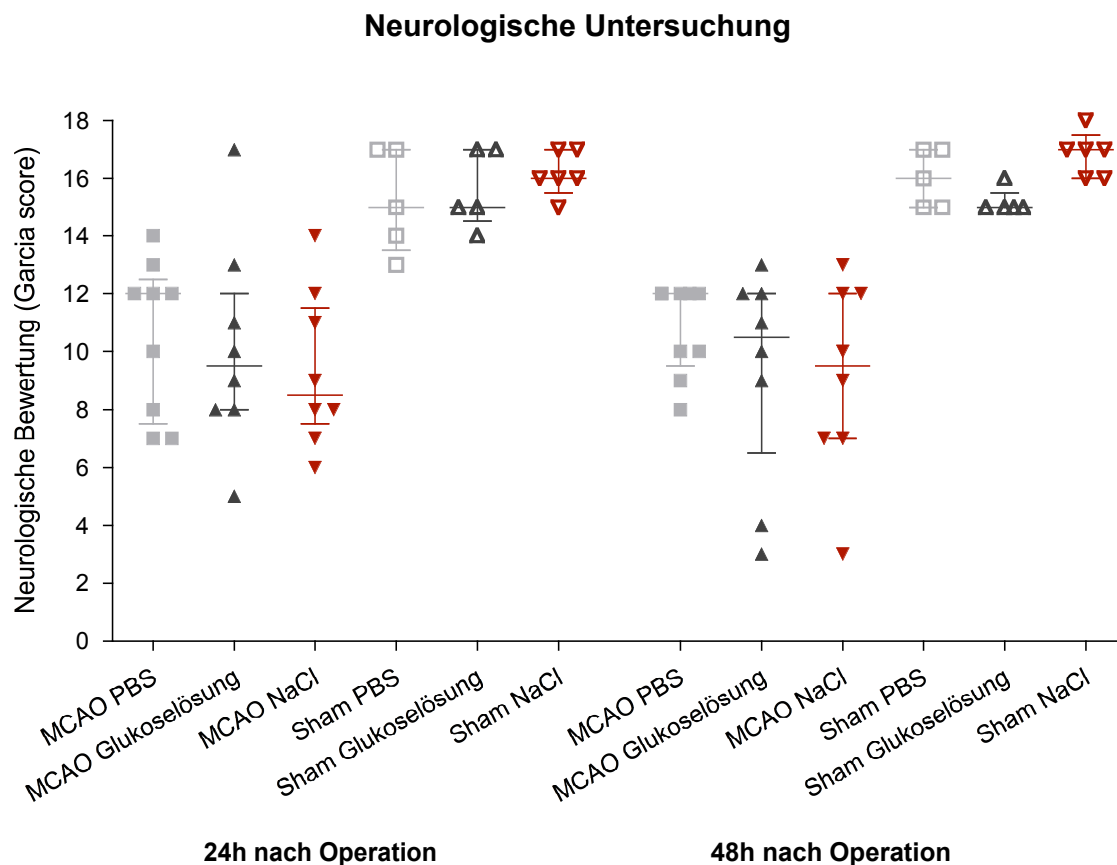
**Tabelle 5: Blutgase Studie D**

Bestimmung der Blutgase, des pH Wertes, der Glukosekonzentration, der Natrium- und Kaliumkonzentration und des Hämatokrits in retrobulbär gewonnenem Blut nach der MCAO oder Sham Operation. n=4.

	<b>MCAO PBS</b>	<b>Sham PBS</b>	<b>MCAO Glukoselsg</b>	<b>Sham Glukoselsg</b>	<b>MCAO NaCl</b>	<b>Sham NaCl</b>
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>76,6</b> (72,8 / 96,5)	<b>90,5</b> (85,5 / 98,9)	<b>80,1</b> (75,4 / 83,4)	<b>80,8</b> (79,4 / 82,1)	<b>66,3</b> (53,2 / 79,8)	<b>62,7</b> (61,8 / 99,6)
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>63,4</b> (55,8 / 69,5)	<b>74,6</b> (69,0 / 75,0)	<b>57,4</b> (54,3 / 73,1)	<b>65,1</b> (65,1 / 65,1)	<b>64,5</b> (58,4 / 64,7)	<b>52,2</b> (48,9 / 61,5)
<b>pH-Wert</b>	<b>7,36</b> (7,32 / 7,37)	<b>7,31</b> (7,30 / 7,33)	<b>7,28</b> (7,21 / 7,30)	<b>7,23</b> (7,19 / 7,26)	<b>7,31</b> (7,29 / 7,32)	<b>7,35</b> (7,30 / 7,38)
<b>Glukose [mmol/l]</b>	<b>12,0</b> (12,0 / 12,0)	<b>13,8</b> (13,3 / 14,1)	<b>12,0</b> (11,4 / 13,5)	<b>13,5</b> (13,0 / 13,9)	<b>12,4</b> (10,4 / 15,4)	<b>14,6</b> (14,0 / 14,6)
<b>Natrium [mmol/l]</b>	<b>135,0</b> (130,0 / 135,5)	<b>131,0</b> (129,5 / 133,0)	<b>134,0</b> (133,0 / 136,0)	<b>134,5</b> (134,3 / 134,8)	<b>130,0</b> (130,0 / 132,0)	<b>130,0</b> (129,8 / 133,0)
<b>Kalium [mmol/l]</b>	<b>5,63</b> (4,97 / 5,77)	<b>5,90</b> (5,60 / 6,30)	<b>7,00</b> (6,80 / 7,20)	<b>6,50</b> (6,30 / 6,70)	<b>7,60</b> (7,10 / 7,70)	<b>6,30</b> (6,30 / 7,25)
<b>Hämatokrit [%]</b>	<b>45,1</b> (43,0 / 45,8)	<b>42,9</b> (42,9 / 43,7)	<b>39,9</b> (39,2 / 41,2)	<b>43,6</b> (43,1 / 44,2)	<b>41,6</b> (4,3 / 43,2)	<b>38,4</b> (37,8 / 43,9)

#### 4.4.3 Neurologische Untersuchung

Die neurologischen Defizite jedes Tieres wurde 24 h und 48 h nach der jeweiligen Operation, MCAO oder Sham, mit dem Garcia score bestimmt. Die neurologische Beurteilung war zwischen der MCAO operierten Gruppe und der jeweiligen Sham operierten Gruppe in allen Fällen signifikant unterschiedlich ( $p < 0,01$ ), jedoch nicht zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Abb. 49). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese signifikanten Unterschiede jedoch nicht in die Abbildung eingezeichnet. Die mit PBS behandelte MCAO-Gruppe hatte im Median eine etwas bessere neurologische Bewertung als die anderen beiden Untersuchungsgruppen (Median PBS 24 h und 48 h: 12 bzw. 12 Punkte, Median Glukoselösung 24 h und 48 h: 9.5 bzw. 10.5 Punkte, Median NaCl 24 h und 48 h: 8.5 bzw. 9.5 Punkte).

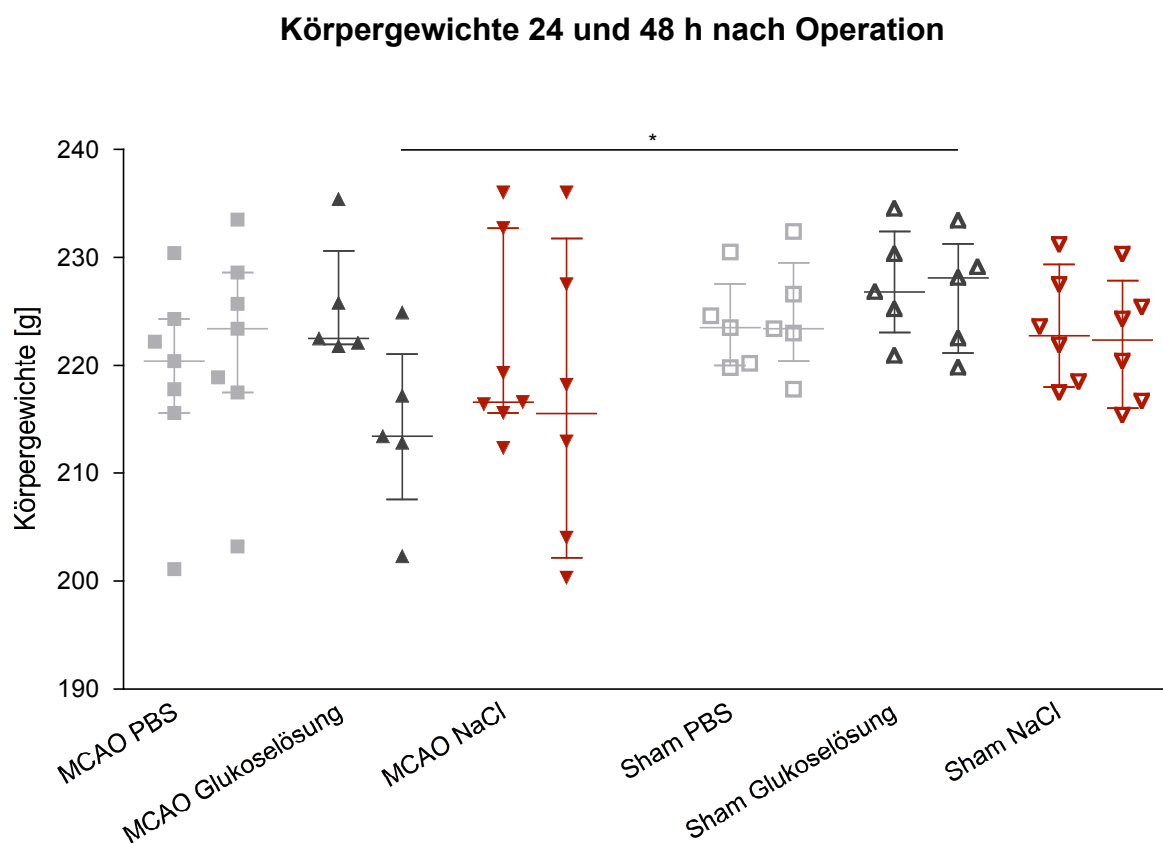


**Abbildung 49: Neurologische Defizite Studie D**

Die neurologischen Defizite, bestimmt 24 h und 48 h nach der MCAO oder Sham Operation.

#### 4.4.4 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde 24 und 48 h nach der MCAO oder Sham Operation ermittelt. Die Sham operierten Tiere wogen im Median in allen Gruppen etwas mehr als die entsprechende MCAO operierte Gruppe (3,1 g bei der PBS Gruppe bis 6,8 g bei der NaCl Gruppe), dieser Unterschied war bei der mit Glukoselösung behandelten Gruppe nach 48 h sogar signifikant (14,7 g) (Abb. 50). Das Körpergewicht der mit Glukoselösung und NaCl behandelten Tiere sank nach 48 h noch weiter ab (Glukoselösung: Median von 222,5 g auf 213,4 g; NaCl: Median von 216,6 g auf 215,6 g). Im Gegensatz dazu stieg bei den mit PBS behandelten Tieren das Körpergewicht nach 48 h schon wieder an (Median von 220,4 g auf 223,4 g).

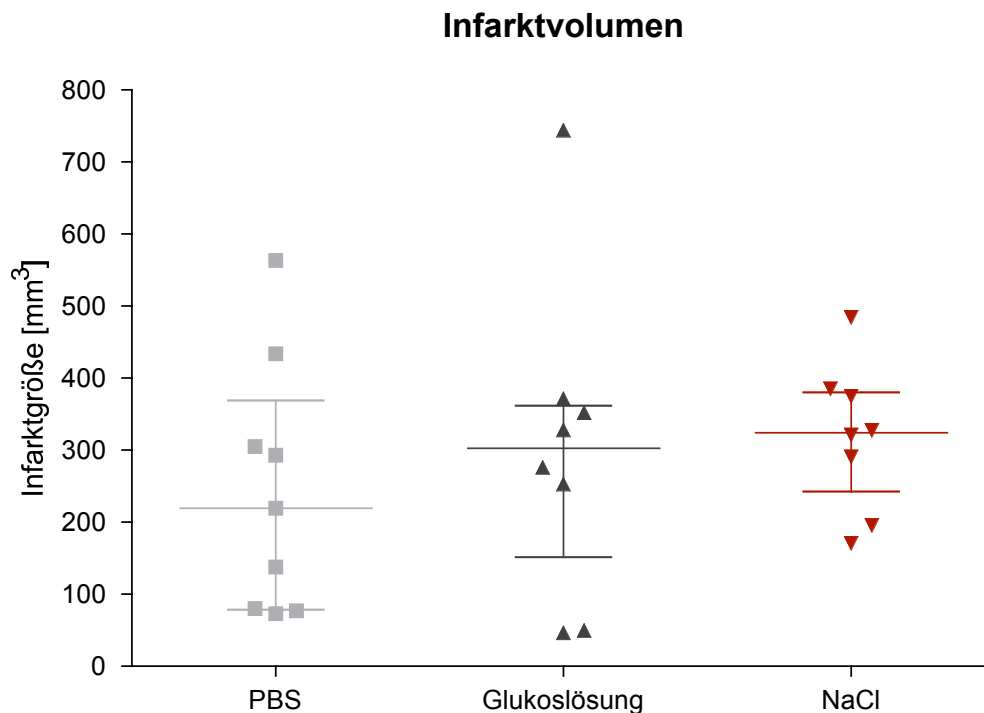


**Abbildung 50: Körpergewicht Studie D**

Die Körpergewichte der Tiere 24 und 48 h nach der MCAO oder Sham Operation. \*p < 0,05.

#### 4.4.5 Infarktgrößen

Die Infarktgröße wurde 48 h nach der Schlaganfaloperation im MRT bestimmt und anschließend berechnet (Abb. 51). Die mit PBS behandelte Gruppe wies im Vergleich mit den zwei anderen Behandlungsgruppen (Glukoselösung: 302,0 mm<sup>3</sup> und NaCl: 324,0 mm<sup>3</sup>) ein etwas geringeres medianes Infarktvolumen auf (219,2 mm<sup>3</sup>).



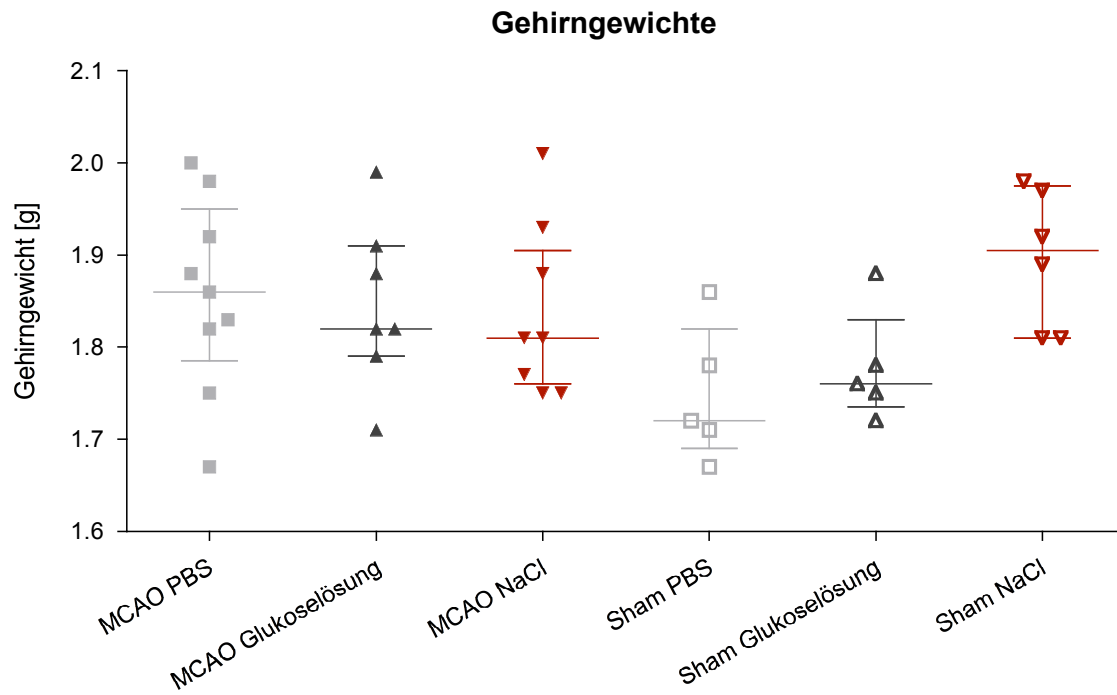
**Abbildung 51: Infarktgrößen Studie D**

Die im MRT bestimmten Infarktgrößen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen.

#### 4.4.6 Gehirngewicht

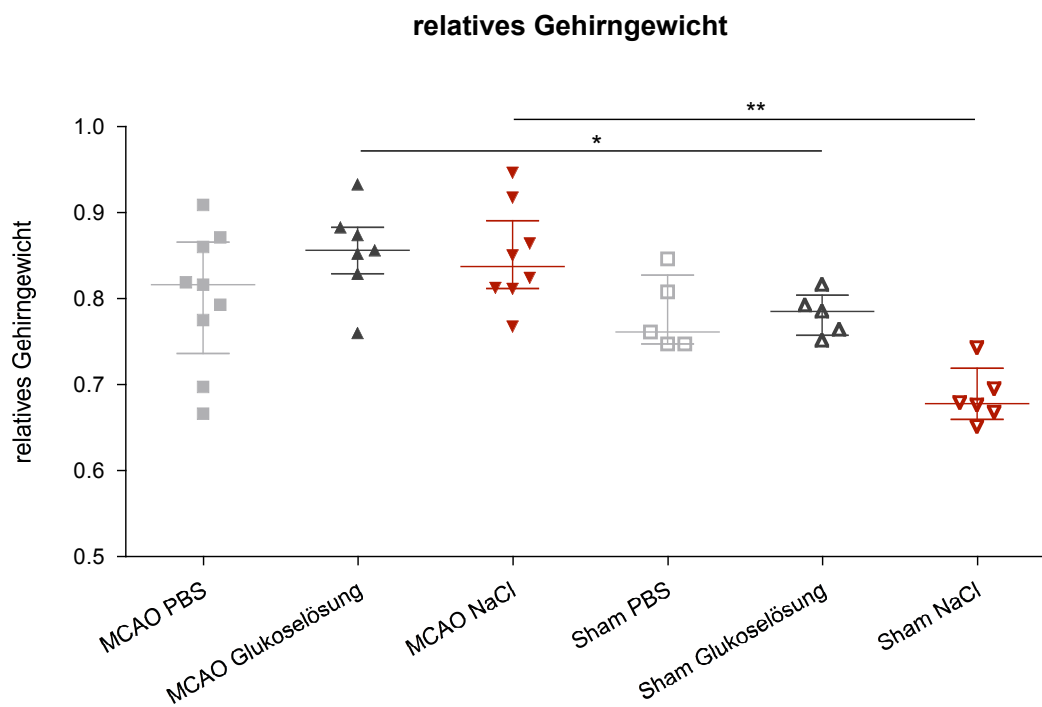
Die Gehirne aller Tiere (Abb. 52) wurden nach der Untersuchung im MRT gewogen und anschließend auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres bezogen (Abb. 53). Die deutlichen Unterschiede im absoluten Gehirngewicht zwischen der jeweiligen MCAO und Sham operierten Gruppe wurden noch deutlicher im relativen Gehirngewicht und bei den NaCl und Glukose Tieren waren diese Unterschiede auch signifikant.

## Ergebnisse



**Abbildung 52: Gehirngewicht Studie D**

Das Gewicht der Gehirne, bestimmt nach der Untersuchung im MRT.



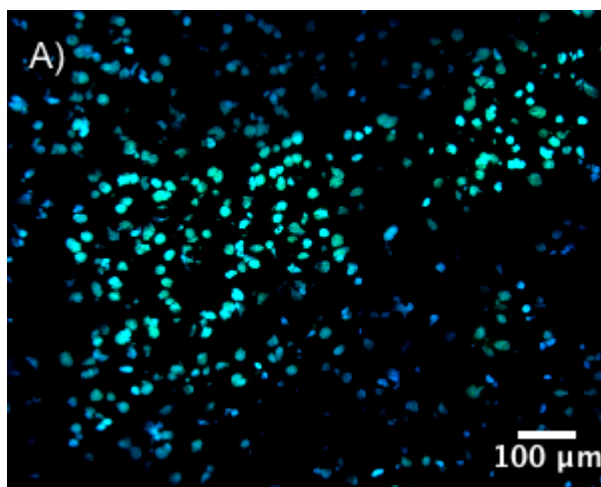
**Abbildung 53: Relatives Gehirngewicht Studie D**

Das relative Gehirngewicht bezogen auf das Körpergewicht. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .



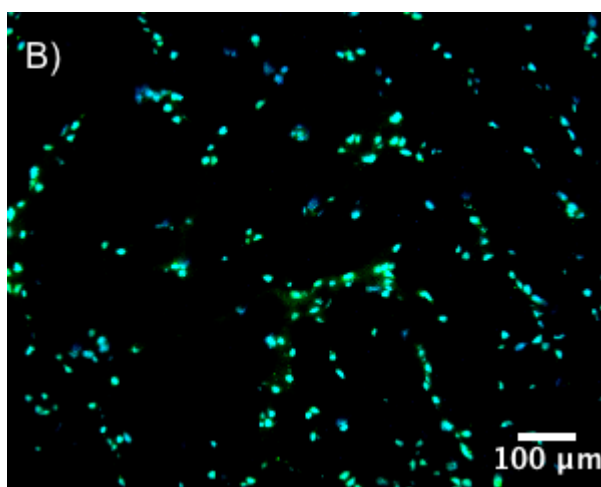
#### 4.4.7 Nisslfärbung

Die gefrorenen Gehirne wurden mit dem Kryostaten geschnitten und anschließend mit Nissifarbstoff gefärbt. Die angefärbten Neuronen im Kortex auf der ipsi- und der contralateralen Seite wurden unter dem Stereomikroskop ausgezählt (PBS: Abb. 54; Glukoselösung: Abb. 55; NaCl: Abb. 56). Auch hier war erkennbar, dass in der mit PBS behandelten Gruppe nach dem Schlaganfall noch deutlich mehr lebensfähige Neuronen vorhanden waren (216,0), als in den anderen zwei Gruppen (Glukoselösung: 172,5; NaCl: 180,0).



**Abbildung 54: Nisslfärbung PBS Studie D**

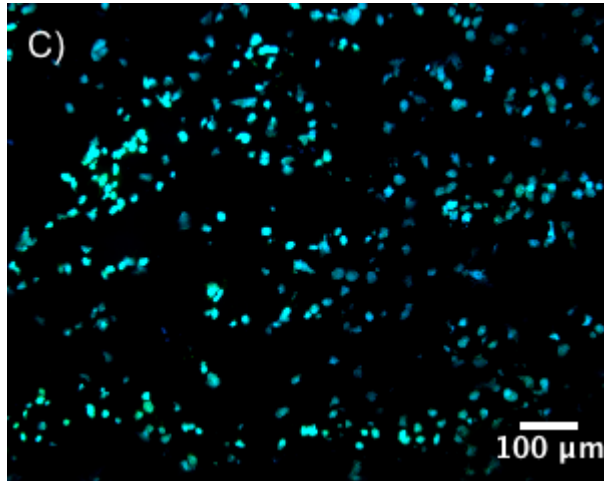
Mit Nissifarbstoff angefärbte Neuronen im Kortex auf der ipsilateralen Seite bei Behandlung mit PBS unter dem Stereomikroskop mit einer 400 fachen Vergrößerung.



**Abbildung 55: Nisslfärbung Glukoselösung Studie D**

Mit Nissifarbstoff angefärbte Neuronen im Kortex auf der ipsilateralen Seite bei Behandlung mit Glukoselösung unter dem Stereomikroskop mit einer 400 fachen Vergrößerung.

## Ergebnisse



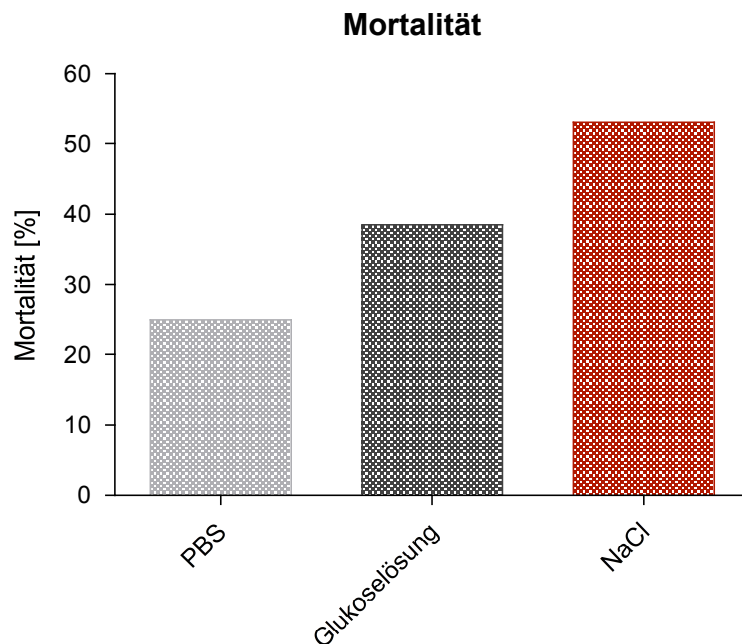
**Abbildung 56: Nisslfärbung NaCl Studie D**

Mit Nisslfarbstoff angefärbte Neuronen im Kortex auf der ipsilateralen Seite bei Behandlung mit NaCl unter dem Stereomikroskop mit einer 400 fachen Vergrößerung.

#### 4.4.8 Mortalität

Die Mortalität wurde im Anschluss an die Operation über 2 Tage in allen Gruppen ermittelt (Abb. 57). In der mit PBS behandelten Gruppe konnte dabei eine geringere Mortalität (25%) beobachtet werden als in den anderen zwei Behandlungsgruppen. In der mit Glukose behandelte Gruppe lag die Mortalität bei 38,5% und die Mortalität in der mit NaCl behandelten Gruppe lag, im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe, sogar mehr als doppelt so hoch (53%).

Durch die zusätzliche Implantation einer IV – Minipumpe lag die Mortalität bei diesem Versuch etwas höher als in anderen Studien mit MCAO Operation.



**Abbildung 57: Mortalität Studie D**

Die Mortalität bis zu 48 h nach der Operation der unterschiedlichen Behandlungsgruppen. (Anzahl der Tiere insgesamt pro Gruppe: PBS = 12; Glukose = 13; NaCl = 17)

## 5 Diskussion

### 5.1 SLV338 im Schlaganfall

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist Schlaganfall eine Erkrankung, die nicht nur in den meisten Fällen schwerwiegende Beeinträchtigungen der Gesundheit zur Folge hat, sondern häufig sogar letal endet. Trotz vielfältigster Ansätze konnte eine wirksame Therapie oder Schlaganfallprophylaxe aber bisher noch nicht entwickelt werden. In dieser Doktorarbeit wurde ein kombinierter Endothelin converting enzyme/ neutral endopeptidase Blocker (SLV338) auf seine therapeutischen und prophylaktischen Eigenschaften hin getestet.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem kombinierten ECE/NEP – Hemmer SLV338 die Schlaganfallhäufigkeit in SHR-SP Ratten unter Hochsalzdiät signifikant reduzierte, ohne dabei jedoch den Blutdruck zu beeinflussen. Dieser Effekt war in der Gruppe der Tiere mit niedrigerer Wirkstoffdosierung stärker zu beobachten als in der Gruppe mit hoher Wirkstoffdosierung.

Die beobachteten Effekte könnten auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zunächst ist an einen Einfluss auf den Blutdruck zu denken. Der Blutdruck stieg jedoch bei allen Tieren während des Versuchs gleichmäßig an und es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu sehen. Daher kann eine Reduktion des Blutdrucks als Grund für die geringere Schlaganfallhäufigkeit ausgeschlossen werden. Übereinstimmend damit wurde auch von anderen Gruppen gezeigt, dass die Schlaganfallhäufigkeit in SHR-SP durch eine Behandlung mit einem ETA-Rezeptor- Blocker deutlich reduziert werden kann, ohne den Blutdruck zu senken (Blezer et al., 1999, Touyz et al., 2000); während blutdrucksenkende Mittel wie Thromboxane A<sub>2</sub> Synthase-Hemmer, Hydralazin und Diuretika keinen Einfluss auf Schlaganfall- Inzidenz, Volumen oder die anschließenden neurologischen Defizite zu haben scheinen (Gries et al., 1989, Stier et al., 1988). Auch wurde bereits beschrieben, dass eine Hemmung der neutralen Endopeptidase im Gegensatz zu einer direkten Administration natriuretischer Peptide, die in einer Senkung des Blutdruckes resultiert, keinen Einfluss auf den Blutdruck hat. Dies kann dadurch erklärt werden, dass nicht nur der Abbau vasodilatierender Substanzen gehemmt wird, sondern auch der Abbau vasokonstriktiver Substanzen wie Endothelin und Angiotensin (McDowell et al., 1997, Richards et al., 1993).

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine prophylaktische Behandlung mit SLV338 die Schlaganfallhäufigkeit und damit auch die Mortalität deutlich senken kann, jedoch keinen Einfluss auf das Volumen, das Auskommen und das Überleben nach einem Schlaganfall hat. Dies konnte sowohl in dem Versuch mit SHR-SP Ratten gezeigt werden, als auch in den Interventionsstudien mit MCAO, in denen die Ratten nach oder erst kurz vor

der Operation mit SLV338 behandelt wurden. Denselben Effekt zeigten auch Blezer et al: Sie behandelten SHR-SP Ratten mit einem ETA-Rezeptor Blocker sobald sie erste Anzeichen eines zerebralen Ödems im MRT feststellten und verglichen diese Tiere am Ende mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. Dabei konnten keine Unterschiede in Schlaganfallvolumen oder Mortalität festgestellt werden (Blezer et al., 1999). Das legt den Schluss nahe, dass Endothelin und die natriuretischen Peptide an der Entwicklung, bzw. der Verhinderung von Organschäden beteiligt sind, jedoch in der akuten Schlaganfallsituation therapeutisch nicht wirksam sind.

Einer der möglichen Gründe für die positive prophylaktische Wirkung ist vielleicht der Einfluss von SLV338 auf den zerebralen Blutfluss. Genauere Untersuchungen zu der Pathologie des Schlaganfalls in SHR-SP zeigten, dass es, bevor überhaupt erste neurologische Defekte festgestellt wurden, zu einem deutlichen Abfall des zerebralen Blutflusses kam (Mies et al., 1999), direkt gefolgt von einem Anstieg der Gefäßendothelpermeabilität aufgrund von morphologischen Änderungen und endothelialen Umstrukturierungen (Tagami et al., 1991, Tagami et al., 1990, Volpe et al., 1996). Durch die Blockade von Endothelin -Rezeptoren konnten ein solcher Abfall des zerebralen Blutflusses und die entsprechenden Folgeschäden reduziert werden (Barone et al., 2000, Roux et al., 1995). Da SLV338 neben der Bildung von Endothelin auch den Abbau der natriuretischen Peptide hemmt, könnte deren vasodilatativer Effekt (Hirata et al., 1992, Rubattu et al., 2008) möglicherweise, zusätzlich zu der Endothelin-1 Hemmung, zu einem Anstieg des zerebralen Blutflusses und damit zu einer verminderten Schlaganfallhäufigkeit beitragen.

Auch eine Wirkung auf die Stabilität der Blut-Hirn-Schranke ist denkbar. Neben dem Abfall des zerebralen Blutflusses kommt es bei SHR-SP Ratten, wie oben erwähnt, auch zu Veränderungen in der Blut-Hirn Schranke, lange bevor sichtbare Veränderungen des Gehirngewebes vorliegen und Infarkte beobachtet werden. Durch diese Veränderungen steigt die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke zwischen Blutkreislauf und Gehirn an (Sironi et al., 2004, Lee et al., 2007). Dieser Zusammenbruch der Blut-Hirn Schranke ist gefolgt von Hämorrhagien (Lee et al., 2007) und hat einen Einstrom von Entzündungszellen in das Gehirngewebe zur Folge (Sironi et al., 2004). Durch die Aktivität von Endothelin wird die Blut-Hirn Schranke möglicherweise noch mehr geschädigt und das Risiko für Hämorrhagien und Gehirnödeme erhöht (Matsuo et al., 2001, Narushima et al., 2003). Eine Hemmung des Endothelinsystems durch Blockade der ECE könnte die Blut-Hirn Schranke in SHR-SP stabilisieren und so zu der verminderten Schlaganfallhäufigkeit in der mit SLV338 behandelten Gruppen beigetragen haben.

Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit der Albuminurie. Ein Anstieg der Albuminurie konnte in allen Tieren beobachtet werden, in den behandelten Tieren war er

jedoch deutlich verzögert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, in denen eine Blockade des ETA-Rezeptors ebenfalls zu einer verzögerten Proteinurie führte (Blezer et al., 1999, Stasch et al., 1995, ClinicalTrials.gov., 2008). Wahrscheinlich wird durch eine Reduktion der effektiven Filtrationsfraktion der intraglomeruläre Druck gesenkt und damit auch die Albuminurie (Goddard et al., 2004). Albuminurie ist nicht nur mit einem erhöhten Risiko für zerebrovaskuläre Erkrankungen verbunden (Dhaun et al., 2008, Ibsen et al., 2005, Duka and Bakris, 2008), sondern auch generell als Marker für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität anerkannt (Hillege et al., 2002, Hermans et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Albuminurie, sogar in Patienten mit Bluthochdruck, zu einer kardiovaskulären Protektion führte (Ibsen et al., 2005) und eine verdoppelte Albuminkonzentration im Urin führte zu einem Anstieg des Risikos für kardiovaskuläre Mortalität um 29% in der PREVEND Studie (Hillege et al., 2002). Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Albuminurie und kardiovaskulären Erkrankungen sind allerdings noch nicht genau bekannt. Die momentan vertretene Erklärung sieht die Albuminurie als einen generellen Marker für endotheliale Dysfunktionen mit lokalen Verletzungen der glatten Gefäßmuskel- und endothelialen Zellen durch vaskuläre Schärkräfte an. Dies resultiert in einer Veränderung der NO- Konzentration und einem Anstieg der Zytokine, wodurch es zu einer Zellproliferation kommt und schließlich zu einem Anstieg der Gefäßendothelpermeabilität (Al-Kateb et al., 2008, Ovbiagele, 2008, Khosla et al., 2006). Möglicherweise trägt diese verzögerte Proteinurie in den behandelten Gruppen zu der geringeren Mortalität bei.

Ein Anstieg der Natriurese und Diurese als einen ANP vermittelten Effekt (Cusson et al., 1990, Hirata et al., 1988) durch die Hemmung der neutralen Endopeptidase (Danilewicz et al., 1989, O'Connell et al., 1992), konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Durch die gleichzeitige Hemmung des ECE und die dadurch geringere ET-1 Konzentration kann es zu einer verminderten Aktivierung des tubulären ETB-Rezeptors gekommen sein, der unter physiologischen Bedingungen die Natriurese und Diurese steigern kann (Ahn et al., 2004, Bagnall et al., 2006, Dhaun et al., 2008, Ge et al., 2006). Durch SLV338 werden sowohl das Endothelinsystem, als auch das System der natriuretischen Peptide beeinflusst, so dass sich möglicherweise beide Effekte gegenseitig aufheben.

Eine ähnliche Situation wurde bei den BNP Messungen beobachtet. Die BNP Konzentrationen fielen in allen Gruppen während der Studie ab, obwohl in den behandelten Gruppen der Abbau von BNP durch die Blockade der NEP gehemmt wurde. Andererseits gilt BNP als ein wichtiger prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Berger et al., 2002, Rubattu et al., 2008) und hohe BNP Konzentration sind ein Anzeichen für linksventrikuläre Dysfunktionen, kongestives Herzversagen, Myokardinfarkt und Mortalität

(Berger et al., 2002, Campbell et al., 2005, Makikallio et al., 2005, Rubattu et al., 2008). Daher könnten die niedrigen BNP Konzentration in den behandelten Tieren auch auf eine kardioprotektive Wirkung von SLV338 zurückgeführt werden. Die Hemmung der neutralen Endopeptidase und der kardioprotektive Effekt haben einen divergenten Einfluss auf die BNP Konzentration und so heben sich auch hier die beiden Einflüsse gegenseitig auf und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Der Effekt der Verzögerung des Schlaganfalls durch eine Behandlung mit SV338 konnte in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, nach eingetretenem Schlaganfall konnten jedoch keine Unterschiede mehr zwischen den Tieren, weder in den neurologischen Defiziten, noch in dem gemessenen Infarkt volumen, beobachtet werden. Das war nicht nur der Fall in der SHR-SP Studie, auch in den Studien mit MCAO konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass Endothelin und seine Rezeptoren an den Prozessen, die einen Schlaganfall verursachen, beteiligt sind, aber nicht an denjenigen, die einem Schlaganfall folgen. Schon in mehreren Studien konnte die gewünschte Wirkung, eine Verminderung des Schlaganfallvolumens und eine Verringerung der neurologischen Defizite, durch eine gleichzeitige Blockade des ETB- und ETA-Rezeptors nicht gezeigt werden (Barone et al., 2000, McAuley et al., 1996, Patel and McCulloch, 1996) oder wirkte sogar gegenteilig (Chuquet et al., 2002). Es wird vermutet, dass dies an der Blockade des ETB-Rezeptors liegt, der im Gehirn hauptsächlich an Endothel- und Gliazellen lokalisiert ist (Fernandez-Durango et al., 1994, Harland et al., 1998, Lysko et al., 1995), dort eine vasodilatierende Eigenschaft hat (Szok et al., 2001) und so den zerebralen Blutfluss nach einer Ischämie aufrecht erhalten könnte (Park and Thornhill, 2001). Stenman et al. zeigten, dass es nach einer Ischämie zwar zu einem Anstieg vasokonstriktiver ETB-Rezeptoren kommt (Stenman et al., 2002), dies allerdings erst 24 h nach der Ischämie; früher gegebene Rezeptorblocker hemmen die hauptsächlich im Gehirn vorhandenen vasodilatierenden ETB-Rezeptoren und verschlechtern somit sogar die Situation nach einem Schlaganfall (Stenman et al., 2007). Auch andere für die Gehirnfunktion wichtige Eigenschaften werden der Vermittlung durch den astrozytären ETB-Rezeptor zugeschrieben: die Modulation der Aktivität der Astrozyten (Koyama et al., 1993), die Permeabilität der Gap-junctions (Blomstrand et al., 1999), astrozytäre Proliferation (Supattapone et al., 1989) und autoregulative Vorgänge (Ehrenreich et al., 1999). In verschiedenen Studien wurde sogar gezeigt, dass das Auskommen nach einer Ischämie oder Hypoxie in Tieren ohne ETB-Rezeptor verschlechtert wurde und man daher inzwischen von einer protektiven Wirkung des ETB-Rezeptors ausgeht (Ehrenreich et al., 2000, Siren et al., 2002, Ho et al., 2001). In der hier vorliegenden Studie wurden zwar nicht die Rezeptoren blockiert, allerdings kam es durch die Hemmung des ECE zu geringeren Endothelin-1 Konzentrationen und damit zu

einem Fehlen des Agonisten für den ETB-Rezeptor und somit zu einer ähnlichen Situation wie nach einer Hemmung des Rezeptors. Dies könnte der Grund für das schlechte Auskommen der behandelten Tiere nach operativer Schlaganfallinduktion sein.

Da die Wirkung von SLV338 auf die lokalen Systeme von Endothelin und der natriuretischen Peptide beschränkt ist (Hochoer et al., 1997b), und Endothelin auch als ein lokaler Regulatorfaktor gilt (Wilcox et al., 1997) sind im systemischen Kreislauf keine Unterschiede in gemessenen Plasmaspiegeln zu sehen und zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass SLV338 nach einem Schlaganfall keine therapeutische Wirkung aufwies, die prophylaktische Behandlung mit SLV338 jedoch das Überleben von Ratten unter Risikobedingungen durch ein vermindertes oder verzögertes Auftreten von Schlaganfällen signifikant erhöhte. Diesen Effekt konnte man in beiden behandelten SHR-SP Gruppen sehen, allerdings zeigte er sich deutlicher in der mit 30 mg/kg behandelten Gruppe. Ob dieser Effekt hauptsächlich durch die Blockade des ECE oder der NEP hervorgerufen wurde, bliebe in weiteren Untersuchungen zu klären, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

## **5.2 Das Lösungsmittel in der Schlaganfallforschung**

Neue, viel versprechende Substanzen in der medizinischen Forschung werden meist in Tiermodellen getestet, in der Schlaganfallforschung häufig auch im Modell der MCAO in der Ratte. Bereits in vielen vorherigen Studien wurde der Einfluss verschiedener experimenteller Parameter, z.B. des Rattenstammes (Duverger and MacKenzie, 1988, Walberer et al., 2006), der Anästhesie (Baughman et al., 1988, Soonthon-Brant et al., 1999) oder der angewandten Operationstechnik (Bouley et al., 2007, Prieto et al., 2005, Chu et al., 2008), auf die Ergebnisse nach operativer Schlaganfallinduktion beschrieben und bestätigt. Einer der wichtigsten Parameter wurde dabei bis jetzt jedoch noch nicht berücksichtigt und zwar, ob und inwieweit die Lösungsmittelsubstanz selbst einen Einfluss auf das Schlaganfallauskommen nach MCAO hat. In Studien zu der Wirksamkeit neuer Medikamente ist es üblich, diese gegenüber einem Lösemittel zu testen und die Ergebnisse zu vergleichen. Dabei sollten das Lösungsmittel, in dem die zu testende Substanz gelöst ist und das, das als Referenzlösung dient, dasselbe sein. Oft ist dies jedoch nicht angegeben. Daher ist es wichtig zu wissen, ob und inwieweit die Referenzlösung einen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Die hier getesteten Lösungen, PBS; 5% Gukoselösung und NaCl sollten, als Lösungsmittel, keinen der gemessenen Parameter beeinflussen. Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede bei neurologischen Untersuchungen oder den Körpergewichten 24 und 48 h



nach MCAO festgestellt werden, allerdings fielen die Ergebnisse für die mit PBS behandelte Gruppe in allen erhobenen Parametern etwas besser aus. Am deutlichsten war dieser Unterschied bei der Bestimmung der Mortalität zu sehen; die mit PBS behandelte Gruppe hatte eine Mortalität von 25% im Vergleich zu der mit 5% Glukose behandelten Gruppe (38%) und der mit NaCl behandelten Gruppe, deren Mortalität mehr als doppelt so hoch war (53%). Auch im Infarkt volumen spiegelte sich diese Tendenz wieder (PBS: 219,2 mm<sup>3</sup>; Glukose: 302,0 mm<sup>3</sup>; NaCl: 324,0 mm<sup>3</sup>).

Nach einem Schlaganfall kommt es zu einem pH – Wert Abfall im Gehirn (Jokivarsi et al., 2007, Nemoto and Frinak, 1981); eine mögliche Erklärung für das bessere Auskommen nach PBS Behandlung könnte sein, dass PBS durch seine Pufferkapazität (4,8 mM/pH) einen pH – Wert Abfall abfangen und so das Überleben verbessern kann. Andererseits wurde dieser pH – Abfall nach einem Schlaganfall nur als ein sehr kurzes Phänomen charakterisiert und bereits 30 Min nach Reperfusion liegt der pH – Wert wieder im Normbereich (Smith et al., 1986). Da wir in dieser Studie Minipumpen für die Applikation der zu testenden Lösungen verwendeten, mit einer Abgaberate von 10 µl/h, und obwohl direkt nach der Operation bereits PBS in das Blut abgegeben wurde, ist nicht davon auszugehen, dass bereits genügend PBS im Blut vorhanden war, um dessen Pufferkapazität signifikant zu verbessern.

Was den Einfluss von Glukose betrifft, so muss in Betracht gezogen werden, dass eine Hyperglykämie die Mortalität nach einem cerebralen Infarkt deutlich verschlechtert (Duverger and MacKenzie, 1988, Liu et al., 2007, Pulsinelli et al., 1982) und den Tod neuronaler Zellen erhöht (Cronberg et al., 2004). Allerdings war die hier genutzte Glukosekonzentration (5%), im Vergleich zu 25% (Wei et al., 2003) oder sogar 50% (Kawai et al., 1997) viel zu gering, um eine Hyperglykämie zu verursachen. Daher kann auch die Hyperglykämie als Ursache für das schlechtere Auskommen dieser Gruppe ausgeschlossen werden.

Dass die Mortalität in allen Gruppen deutlich über der ansonst erwarteten liegt, ist nicht zuletzt dem erheblichen Stress zuzuschreiben, den die Implantation der Minipumpen und deren Verbindung zu der *V. cava caudalis* für alle Tiere bedeutete.

Abschließend kann gesagt werden, dass die unterschiedlichen Lösemittel einen deutlichen und vor allem unterschiedlichen Einfluss auf das Auskommen nach einem Schlaganfall haben. Die Ursachen hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Aufgrund der hohen Unterschiede erscheint es jedoch sehr wichtig, dasselbe Lösungsmittel für die Behandlung der Referenzgruppe und die Lösung des zu testenden Medikaments zu verwenden.

## 6 Zusammenfassung

### **Interventions- und Präventionsstudien mit einem kombinierten ECE/NEP Blocker an Schlaganfallmodellen in Ratten**

Verschiedene Abläufe spielen sich nach einem Schlaganfall gleichzeitig in dem betroffenen Gebiet ab. Es kommt zu einem Abfall des zerebralen Blutflusses, einer Entzündungsreaktion, die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke wird verändert und eine Apoptose und Nekrose der Gehirnzellen findet statt.

In den ischämischen Gehirngebieten kommt es zu einer deutlich erhöhten Endothelin-1 Konzentration, einer der potentesten Vasokonstriktoren, und einer vermehrten Expression entsprechender Rezeptoren. Eine anti-inflammatorische und neuroprotektive Wirkung von Endothelin- Antagonisten wurde bereits in der Literatur beschrieben.

Vasodilatative und anti-inflammatorische Eigenschaften werden auch den natriuretischen Peptiden zugeschrieben. Um deren positive Eigenschaften nach einem Schlaganfall zu nutzen und auf Grund der oben erwähnten Ergebnisse, wurde in dieser Arbeit der protektive Effekt eines Endothelin-converting-enzym-/ Neutrale Endopeptidase- Antagonisten (ECE/NEP Blocker), SLV 338, in verschiedenen Schlaganfallmodellen in der Ratte getestet.

In Studie A wurden die Ratten 5 Tage vor einer Schlaganfalloperation (*middle cerebral artery occlusion* (MCAO)) über eine subkutane Minipumpe mit SLV338 oder Lösungsmittel (PBS) behandelt, in Studie B wurden die Ratten im Anschluss an die MCAO Operation über eine Minipumpe IV mit SLV338, PBS, SLV334 (eine bereits getestete Substanz mit SLV338 ähnlicher, aber weniger potenten Wirkweise) oder Glukoselösung behandelt. Von allen Tieren wurde der Blutdruck, die neurologischen Defizite nach der MCAO Operation und das Infarkt volumen ermittelt.

Im dritten Versuch, der Studie C, wurden 8 Wochen alte spontaneously hypertensive rats – stroke-prone (SHR-SP) auf Hochsalzdiät gesetzt; gleichzeitig erhielten 2 der 3 Gruppen über das Futter eine Behandlung mit 30 oder 100 mg/kg SLV338. Die Tiere erlitten auf Grund genetischer Disposition und der Salzdiät spontane Schlaganfälle. Der Blutdruck, die neurologischen Defzite, das Körpergewicht, Trinkwasser- und Futteraufnahme, Urinvolumen, Blutparameter und Urinparameter wurden während der Studie zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Zusätzlich wurden die entnommenen Gehirne aller Tiere auf Schlaganfälle hin untersucht und die Mortalität in den unterschiedlichen Gruppen ermittelt.

Bei keinem der behandelten Tiere traten Nebenwirkungen durch die Gabe von SLV338 auf. In Studie A und B konnten keine Unterschiede in den erhobenen Parametern zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

In Studie C konnte eine deutliche Verzögerung der Albuminurie in den behandelten Gruppen beobachtet werden und eine signifikante, blutdruckunabhängige Verringerung der Schlaganfallinzidenz und damit auch der Mortalität. Besonders deutlich war diese Reduktion in der niedrig dosierten Gruppe, aber auch in der höher dosierten Gruppe konnte dieser Effekt beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Endothelin-1 und die natriuretischen Peptide bei der Entstehung eines Schlaganfalls eine wichtige Rolle spielen, später jedoch, bei den Abläufen, die nach einem Schlaganfall auftreten, keinen Einfluss mehr haben. Die Wirkung von SLV338, eine deutliche Reduktion der Schlaganfallinzidenz, scheint auf einen vasoprotektiven Effekt zurückzuführen zu sein. Die Blockade des ECE und der NEP könnte so einen neuen therapeutischen Ansatz in der primären Schlaganfallprävention und der Verbesserung der Mortalität bieten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf das am häufigsten gebrauchte Tiermodell in der Schlaganfallforschung, der *middle cerebral artery occlusion* (MCAO), getestet. Bei diesem Modell werden im Anschluß an die operative Schlaganfallinduktion verschiedene Parameter, z.B. das Schlaganfallvolumen, die neurologischen Defizite und das Allgemeinbefinden, einer mit neuer Substanz behandelten Gruppe mit einer nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe verglichen. Der Einfluss verschiedener Faktoren, wie z.B. Operationstechnik, Anästhesie und Rattenstamm auf diese Parameter ist bekannt und veröffentlicht, der Einfluss des Lösungsmittels selber ist allerdings bisher noch nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit wurden 3 verschiedene häufig genutzte Lösungsmittel, PBS, 5% Glukoselösung und physiologisches NaCl, miteinander verglichen. Dafür wurden männlichen Wistar-Ratten im Anschluss an die MCAO Operation über 2 Tage IV über eine Minipumpe mit einem der Lösungsmittel behandelt. Die neurologischen Defizite, das Körpergewicht und die Infarktgröße wurden ermittelt. Anschließend wurden die Gehirne von allen Tieren entnommen, im Kryostaten geschnitten, gefärbt und die Neuronen auf der ipsi- und kontralateralen Seite unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und verglichen.

In allen ermittelten Parametern wies die mit PBS behandelte Gruppe, im Vergleich zu den anderen zwei Behandlungsgruppen, bessere Ergebnisse auf. Besonders deutlich konnte dies in der Mortalität beobachtet werden; in der mit PBS behandelten Gruppe lag die Mortalität bei 25%, in der mit Glukose behandelten Gruppe bei 38.5% und in der mit NaCl behandelten Gruppe bei 53%.

## Zusammenfassung

Diese Ergebnisse zeigen einen wesentlichen Einfluss des Lösungsmittels auf das Auskommen nach einer MCAO Operation und es wird deutlich, wie wichtig es für eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen ist das gleiche Lösungsmittel zur Lösung der zu testenden Substanz und zur Behandlung der Referenzgruppe einzusetzen.

## 7 Summary

### Intervention and prevention studies with a combined ECE/NEP blocker in stroke models in rats

Different parallel processes happen after stroke in the ischemic area: the cerebral blood flow decreases, an inflammation appears, permeability of the blood-brain barrier changes and apoptosis and necrosis of brain cells occurs.

In the ischemic area, a significant increase of the endothelin-1 concentration, one of the most potent vasoconstrictors, is measurable and corresponding receptors are increasingly expressed. An anti-inflammatory and neuroprotective effect of endothelin antagonists was described in literature previously.

Vasodilative and anti-inflammatory effects were also described for the natriuretic peptides. To use their positive properties after stroke and based on above-mentioned findings, the protective effect of a combined endothelin- converting- enzyme/ neutral endopeptidase blocker (ECE/ NEP blocker), SLV338, was tested in different stroke models in rats.

In study A, 5 days before stroke operation (*middle cerebral artery occlusion* (MCAO)), rats were treated subcutaneously over a minipump with SLV338 or vehicle (PBS), in study B, rats were treated intravenously, immediately after MCAO, over a minipump with either SLV338, PBS, SLV334 (an already tested substance with similar effects but not as potent as SLV338) or glucose solution. Blood pressure, neurological outcome after MCAO (24 and 48 h) and infarct volume (48 h) were evaluated of all animals.

In study C, 8 weeks old spontaneously hypertensive rats, stroke-prone were put on high salt diet; in 2 of 3 groups the food additionally contained either 30 or 100 mg SLV338/kg BW. Due to genetic disposition and the high salt diet, rats developed spontaneous strokes. Blood pressure, neurological outcome, body weight, water and food intake, urine volume, blood and urinary parameters were evaluated during the study at different time points. Additionally, removed brains were investigated in the MRI (magnet resonance imaging) for brain infarcts and mortality was evaluated in the different groups.

In none of the treated animals side effects due to SLV338 treatment were observed. In study A and B, no differences in the parameters evaluated were determined between groups.

In study C, a considerably retardation of albuminuria was observed in the treated groups as well as a significant, blood pressure independent reduction of stroke and therefore also of mortality. This finding was more obvious in the group treated with the low dose of SLV338, but was also observed in the group treated with 100 mg/kg SLV338.

## Summary

The results of these studies indicate a high influence of endothelin and the natriuretic peptides on the development of stroke, but only a minor influence on the processes happening after stroke. The significant reduction of stroke seems to be related to a vasoprotection due to SLV338 treatment. Thus, the combined ECE/ NEP inhibition could offer a new therapeutic approach in primary stroke prevention and improvement of mortality.

In the second part of this work, the influence of the vehicle on the most frequently used animal model in stroke research, the middle cerebral artery occlusion (MCAO), was determined. In this model of experimental induced stroke, a potentially new therapeutic agent is generally tested in comparison to a group treated solely with the vehicle. The influence of different parameters, like occlusion technique, anaesthetic or rat strain, on the outcome after MCAO has been previously described in literature, but the influence of the vehicle itself has not yet been assessed.

This study investigates the influence of three different frequently used vehicles, PBS, 5% glucose solution or NaCl, on outcome after experimental stroke. Therefore, male Wistar rats were treated intravenously over 2 days after MCAO with one of the vehicle solutions. Neurological outcome, body weight and infarct sizes were assessed of all animals. Thereafter, brains were removed; cut into slices using a cryostat, stained and neurons were counted under a fluorescence microscope on the ipsi- and contralateral side and compared.

Results of the group treated with PBS were in all evaluated parameters slightly better when compared to the other two treatment groups. This was plainest in mortality: mortality was 25% in the PBS treated group, 38.5% in the glucose treated group, and 53% in the NaCl treated group.

These findings strongly indicate a certain influence of the vehicle on the parameters evaluated in this study and underline the importance of using the very same vehicle composition in control groups and in the groups treated with the experimental compound for comparability between groups.

**Literaturverzeichnis**

- ABASSI, Z. A., GOLOMB, E., BRIDENBAUGH, R. & KEISER, H. R. (1993) Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11. *Br J Pharmacol*, 109, 1024-8.
- AHLUWALIA, A., MACALLISTER, R. J. & HOBBS, A. J. (2004) Vascular actions of natriuretic peptides. Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Res Cardiol*, 99, 83-9.
- AHN, D., GE, Y., STRICKLETT, P. K., GILL, P., TAYLOR, D., HUGHES, A. K., YANAGISAWA, M., MILLER, L., NELSON, R. D. & KOHAN, D. E. (2004) Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *J Clin Invest*, 114, 504-11.
- AKDEMIR, G., LUER, M. S., DUJOVNY, M. & MISRA, M. (1997) Intraventricular atrial natriuretic peptide for acute intracranial hypertension. *Neurol Res*, 19, 515-20.
- AL-KATEB, H., BORIGHT, A. P., MIREA, L., XIE, X., SUTRADHAR, R., MOWJOODI, A., BHARAJ, B., LIU, M., BUCKSA, J. M., ARENDS, V. L., STEFFES, M. W., CLEARY, P. A., SUN, W., LACHIN, J. M., THORNER, P. S., HO, M., MCKNIGHT, A. J., MAXWELL, A. P., SAVAGE, D. A., KIDD, K. K., KIDD, J. R., SPEED, W. C., ORCHARD, T. J., MILLER, R. G., SUN, L., BULL, S. B. & PATERSON, A. D. (2008) Multiple superoxide dismutase 1/splicing factor serine alanine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics study. *Diabetes*, 57, 218-28.
- ALBERTS, G. F., PEIFLEY, K. A., JOHNS, A., KLEHA, J. F. & WINKLES, J. A. (1994) Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*, 269, 10112-8.
- AMES, R. S., SARAU, H. M., CHAMBERS, J. K., WILLETTE, R. N., AIYAR, N. V., ROMANIC, A. M., LOUDEN, C. S., FOLEY, J. J., SAUERMECH, C. F., COATNEY, R. W., AO, Z., DISA, J., HOLMES, S. D., STADEL, J. M., MARTIN, J. D., LIU, W. S., GLOVER, G. I., WILSON, S., MCNULTY, D. E., ELLIS, C. E., ELSHOURBAGY, N. A., SHABON, U., TRILL, J. J., HAY, D. W., OHLSTEIN, E. H., BERGSMAN, D. J. & DOUGLAS, S. A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, 401, 282-6.
- ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348, 730-2.
- ARDAILLOU, R., STEFANOVIC, V., DUSSAULE, J. C. & ARDAILLOU, N. (1992) [Ectoenzymes of peptidic metabolism in renal glomerular and vascular cells]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 186, 626-34.
- ASTRUP, J., SIESJO, B. K. & SYMON, L. (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-5.
- ATTINA, T., CAMIDGE, R., NEWBY, D. E. & WEBB, D. J. (2005) Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, 91, 825-31.
- BAGNALL, A. J., KELLAND, N. F., GULLIVER-SLOAN, F., DAVENPORT, A. P., GRAY, G. A., YANAGISAWA, M., WEBB, D. J. & KOTELEVTSOV, Y. V. (2006) Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension*, 48, 286-93.

- BARDUTZKY, J., SHEN, Q., HENNINGER, N., BOULEY, J., DUONG, T. Q. & FISHER, M. (2005) Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. *Stroke*, 36, 2000-5.
- BARONE, F. C., OHLSTEIN, E. H., HUNTER, A. J., CAMPBELL, C. A., HADINGHAM, S. H., PARSONS, A. A., YANG, Y. & SHOHAMI, E. (2000) Selective antagonism of endothelin-A-receptors improves outcome in both head trauma and focal stroke in rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36, S357-61.
- BARONE, F. C., WHITE, R. F., ELLIOTT, J. D., FEUERSTEIN, G. Z. & OHLSTEIN, E. H. (1995) The endothelin receptor antagonist SB 217242 reduces cerebral focal ischemic brain injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 3, S404-7.
- BAUGHMAN, V. L., HOFFMAN, W. E., MILETICH, D. J., ALBRECHT, R. F. & THOMAS, C. (1988) Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N<sub>2</sub>O. *Anesthesiology*, 69, 192-8.
- BELAYEV, L., BUSTO, R., ZHAO, W. & GINSBERG, M. D. (1995) HU-211, a novel noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist, improves neurological deficit and reduces infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in the rat. *Stroke*, 26, 2313-9; discussion 2319-20.
- BERGER, R., HUELSMAN, M., STRECKER, K., BOJIC, A., MOSER, P., STANEK, B. & PACHER, R. (2002) B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 105, 2392-7.
- BLEZER, E. L., NICOLAY, K., GOLDSCHMEDING, R., JANSEN, G. H., KOOMANS, H. A., RABELINK, T. J. & JOLES, J. A. (1999) Early-onset but not late-onset endothelin-A-receptor blockade can modulate hypertension, cerebral edema, and proteinuria in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*, 33, 137-44.
- BLOMSTRAND, F., GIAUME, C., HANSSON, E. & RONNBACK, L. (1999) Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am J Physiol*, 277, C616-27.
- BLOOM, I. T., BENTLEY, F. R., WILSON, M. A. & GARRISON, R. N. (1993) In vivo effects of endothelin on the renal microcirculation. *J Surg Res*, 54, 274-80.
- BOULEY, J., FISHER, M. & HENNINGER, N. (2007) Comparison between coated vs. uncoated suture middle cerebral artery occlusion in the rat as assessed by perfusion/diffusion weighted imaging. *Neurosci Lett*, 412, 185-90.
- BROTT, T. & BOGOUSSLAVSKY, J. (2000) Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 343, 710-22.
- BROWN, J. & ZUO, Z. (1993) C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol*, 264, R513-23.
- BUNDESAMT (2005) Statistisches Jahrbuch 2005 für die Bundesrepublik Deutschland. IN BUNDESAMT, S. (Ed.). Wiesbaden, Statistisches Bundesamt.
- BURNETT, J. C., JR., COSTELLO-BOERRIGTER, L. C. & BOERRIGTER, G. (2004) Alterations in the kidney in heart failure: the cardiorenal axis in the regulation of sodium homeostasis. IN MANN, D. L. (Ed.) *Heart Failure: a companion to Braunwald's heart disease*. Philadelphia, Elsevier Inc.
- CAM, E. (2004) Occlusion of the Middle Cerebral Artery: A new method of focal cerebral ischaemia in rats. *Pferdeklunik und Veterinaer-Anatomisches Institut*. Zuerich, Vetsuisse-Fakultaet Universitaet Zuerich.
- CAMPBELL, D. J. (2003) Vasopeptidase inhibition: a double-edged sword? *Hypertension*, 41, 383-9.



- CAMPBELL, D. J., WOODWARD, M., CHALMERS, J. P., COLMAN, S. A., JENKINS, A. J., KEMP, B. E., NEAL, B. C., PATEL, A. & MACMAHON, S. W. (2005) Prediction of myocardial infarction by N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and renin in subjects with cerebrovascular disease. *Circulation*, 112, 110-6.
- CAPLAN, L. (2000) *Caplan's Stroke*, Butterworth Heinemann.
- CATTARUZZA, M., DIMIGEN, C., EHRENREICH, H. & HECKER, M. (2000) Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Faseb J*, 14, 991-8.
- CHEN, H. H. & BURNETT, J. C., JR. (2006) Clinical application of the natriuretic peptides in heart failure. *Eur Heart J Suppl*, 8 (Suppl E), E18-25.
- CHOU, W. H., CHOI, D. S., ZHANG, H., MU, D., MCMAHON, T., KHARAZIA, V. N., LOWELL, C. A., FERRIERO, D. M. & MESSING, R. O. (2004) Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 114, 49-56.
- CHU, X., QI, C., ZOU, L. & FU, X. (2008) Intraluminal suture occlusion and ligation of the distal branch of internal carotid artery: an improved rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Neurosci Methods*, 168, 1-7.
- CHUQUET, J., BENCHENANE, K., TOUTAIN, J., MACKENZIE, E. T., ROUSSEL, S. & TOUZANI, O. (2002) Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat. *Stroke*, 33, 3019-25.
- CLINICALTRIALS.GOV. (2008) To determine the effects of avosentan on doubling of serum creatinine, end stage renal disease and death in diabetic nephropathy.
- COWIE, M. R. & MENDEZ, G. F. (2002) BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*, 44, 293-321.
- CRACK, P. J. & TAYLOR, J. M. (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med*, 38, 1433-44.
- CRONBERG, T., RYTTER, A., ASZTELY, F., SODER, A. & WIELOCH, T. (2004) Glucose but not lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro. *Stroke*, 35, 753-7.
- CURRIE, M. G., GELLER, D. M., COLE, B. R., BOYLAN, J. G., YUSHENG, W., HOLMBERG, S. W. & NEEDLEMAN, P. (1983) Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science*, 221, 71-3.
- CUSSON, J. R., THIBAUT, G., CANTIN, M. & LAROCHELLE, P. (1990) Prolonged low dose infusion of atrial natriuretic factor in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens A*, 12, 111-35.
- D'ORLEANS-JUSTE, P., PLANTE, M., HONORE, J. C., CARRIER, E. & LABONTE, J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol*, 81, 503-10.
- DAHLOF, B. (2007) Prevention of stroke in patients with hypertension. *Am J Cardiol*, 100, 17J-24J.
- DAI, W. J., FUNK, A., HERDEGEN, T., UNGER, T. & CULMAN, J. (1999) Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke*, 30, 2391-8; discussion 2398-9.
- DANILEWICZ, J. C., BARCLAY, P. L., BARNISH, I. T., BROWN, D., CAMPBELL, S. F., JAMES, K., SAMUELS, G. M., TERRETT, N. K. & WYTHES, M. J. (1989) UK-69,578, a novel inhibitor of EC 3.4.24.11 which increases endogenous ANF levels and is natriuretic and diuretic. *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 58-65.

- DAVIDSON, A. O., SCHORK, N., JAQUES, B. C., KELMAN, A. W., SUTCLIFFE, R. G., REID, J. L. & DOMINICZAK, A. F. (1995) Blood pressure in genetically hypertensive rats. Influence of the Y chromosome. *Hypertension*, 26, 452-9.
- DAWSON, D. A., SUGANO, H., MCCARRON, R. M., HALLENBECK, J. M. & SPATZ, M. (1999) Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia. *Neurochem Res*, 24, 1499-505.
- DE BOLD, A. J., BORENSTEIN, H. B., VERESS, A. T. & SONNENBERG, H. (2001) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *J Am Soc Nephrol*, 12, 403-9; discussion 403-8, 408-9.
- DEVAULT, A., SALES, V., NAULT, C., BEAUMONT, A., ROQUES, B., CRINE, P. & BOILEAU, G. (1988) Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett*, 231, 54-8.
- DEVLIN, A. M., GORDON, J. F., DAVIDSON, A. O., CLARK, J. S., HAMILTON, C. A., MORTON, J. J., CAMPBELL, A. M., REID, J. L. & DOMINICZAK, A. F. (1995) The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 13, 211-8.
- DHAUN, N., GODDARD, J., KOHAN, D. E., POLLOCK, D. M., SCHIFFRIN, E. L. & WEBB, D. J. (2008) Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension*, 52, 452-9.
- DI ANGELANTONIO, E., DE CASTRO, S., TONI, D., SACCHETTI, M. L., BIRASCHI, F., PRENCIPE, M. & FIORELLI, M. (2007) Determinants of plasma levels of brain natriuretic peptide after acute ischemic stroke or TIA. *J Neurol Sci*, 260, 139-42.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- DOYLE, K. P., SIMON, R. P. & STENZEL-POORE, M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55, 310-8.
- DUKA, I. & BAKRIS, G. (2008) Influence of microalbuminuria in achieving blood pressure goals. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 17, 457-63.
- DUPUIS, J., GORESKY, C. A. & FOURNIER, A. (1996) Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol*, 81, 1510-5.
- DUVERGER, D. & MACKENZIE, E. T. (1988) The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, 449-61.
- DWYER, T. A., EARL, D. E. & WANG, L. (2008) The utility of a new in vitro model of the stroke penumbra. *J Neurosci*, 28, 6537-8.
- EDVINSSON, L. & KRAUSE, D. (2002) *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Lippincott Williams and Wilkins.
- EHRENREICH, H., NAU, T. R., DEMBOWSKI, C., HASSELBLATT, M., BARTH, M., HAHN, A., SCHILLING, L., SIREN, A. L. & BRUCK, W. (2000) Endothelin b receptor deficiency is associated with an increased rate of neuronal apoptosis in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 95, 993-1001.
- EHRENREICH, H., OLDENBURG, J., HASSELBLATT, M., HERMS, J., DEMBOWSKI, C., LOFFLER, B. M., BRUCK, W., KAMROWSKI-KRUCK, H., GALL, S., SIREN, A. L. &

- SCHILLING, L. (1999) Endothelin B receptor-deficient rats as a subtraction model to study the cerebral endothelin system. *Neuroscience*, 91, 1067-75.
- EMOTO, N. & YANAGISAWA, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*, 270, 15262-8.
- ESA (2008) Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. European Stroke Organisation Executive Committee.
- ESCHENFELDER CH, C., ZELLER, J. A. & STINGELE, R. (2006) [Stroke: causes and classification]. *Hamostaseologie*, 26, 298-308.
- ESTRADA, V., TELLEZ, M. J., MOYA, J., FERNANDEZ-DURANGO, R., EGIDO, J. & FERNANDEZ CRUZ, A. F. (1994) High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens*, 7, 1085-9.
- FERNANDEZ-DURANGO, R., DE JUAN, J. A., ZIMMAN, H., MOYA, F. J., GARCIA DE LA COBA, M. & FERNANDEZ-CRUZ, A. (1994) Identification of endothelin receptor subtype (ETB) in human cerebral cortex using subtype-selective ligands. *J Neurochem*, 62, 1482-8.
- FORSSMANN, W. G., RICHTER, R. & MEYER, M. (1998) The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol*, 110, 335-57.
- FUKUCHI, M. & GIAID, A. (1998) Expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 Suppl 1, S421-3.
- FUKUDA, Y., HIRATA, Y., YOSHIMI, H., KOJIMA, T., KOBAYASHI, Y., YANAGISAWA, M. & MASAKI, T. (1988) Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 155, 167-72.
- GARCIA, J. H., WAGNER, S., LIU, K. F. & HU, X. J. (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*, 26, 627-34; discussion 635.
- GE, Y., BAGNALL, A., STRICKLETT, P. K., STRAIT, K., WEBB, D. J., KOTELEVTSSEV, Y. & KOHAN, D. E. (2006) Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, F1274-80.
- GIANNOPOULOS, S., KOSMIDOU, M., HATZITOLIOS, A. I., SAVOPOULOS, C. G., ZIAKAS, A. & CARAMOUZIS, M. (2008) Measurements of endothelin-1, C-reactive protein and fibrinogen plasma levels in patients with acute ischemic stroke. *Neurol Res*.
- GINSBERG, M. D. (2003) Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*, 34, 214-23.
- GODDARD, J., ECKHART, C., JOHNSTON, N. R., CUMMING, A. D., RANKIN, A. J. & WEBB, D. J. (2004) Endothelin A receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition are synergistic via an endothelin B receptor-mediated and nitric oxide-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2601-10.
- GOETZ, K., WANG, B. C., LEADLEY, R., JR., ZHU, J. L., MADWED, J. & BIE, P. (1989) Endothelin and sarafotoxin produce dissimilar effects on renal blood flow, but both block the antidiuretic effects of vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 191, 425-7.
- GONZALEZ, R. G., HIRSCH, J. A., KOROSHETZ, W. J., LEV, M. H. & SCHAEFER, P. (2006) *Acute Ischemic Stroke. Imaging and Intervention*, Springer.

- GRIENDLING, K. K., TSUDA, T. & ALEXANDER, R. W. (1989) Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 264, 8237-40.
- GRIES, J., KRETZSCHMAR, R. & NEUMANN, B. W. (1989) Development of hypertension and life span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats during oral long-term treatment with various antihypertensive drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 13 Suppl 4, S79-82.
- GROTH, W., BLUME, A., GOHLKE, P., UNGER, T. & CULMAN, J. (2003) Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens*, 21, 2175-82.
- HANEHIRA, T., KOHNO, M. & YOSHIKAWA, J. (1997) Endothelin production in cultured vascular smooth muscle cells--modulation by the atrial, brain, and C-type natriuretic peptide system. *Metabolism*, 46, 487-93.
- HARLAND, S. P., KUC, R. E., PICKARD, J. D. & DAVENPORT, A. P. (1998) Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. *Neurosurgery*, 43, 890-8; discussion 898-9.
- HASEGAWA, K., FUJIWARA, H., DOYAMA, K., MIYAMAE, M., FUJIWARA, T., SUGA, S., MUKOYAMA, M., NAKAO, K., IMURA, H. & SASAYAMA, S. (1993) Ventricular expression of brain natriuretic peptide in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 88, 372-80.
- HASHIMOTO, Y., NAKAO, K., HAMA, N., IMURA, H., MORI, S., YAMAGUCHI, M., YASUHARA, M. & HORI, R. (1994) Clearance mechanisms of atrial and brain natriuretic peptides in rats. *Pharm Res*, 11, 60-4.
- HAYNES, W. G. & WEBB, D. J. (1993) The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin Sci (Lond)*, 84, 485-500.
- HEISS, W. D. (2000) Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1276-93.
- HEISS, W. D., THIEL, A., GROND, M. & GRAF, R. (1999) Which targets are relevant for therapy of acute ischemic stroke? *Stroke*, 30, 1486-9.
- HEMPEL, A., NOLL, T., BACH, C., PIPER, H. M., WILLENBROCK, R., HOHNEL, K., HALLER, H. & LUFT, F. C. (1998) Atrial natriuretic peptide clearance receptor participates in modulating endothelial permeability. *Am J Physiol*, 275, H1818-25.
- HERMANS, M. M., HENRY, R., DEKKER, J. M., KOOMAN, J. P., KOSTENSE, P. J., NIJPELS, G., HEINE, R. J. & STEHOUWER, C. D. (2007) Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: the Hoorn Study. *J Am Soc Nephrol*, 18, 1942-52.
- HESS, G., MOECKS, J. & ZDUNEK, D. (2005) N-Terminal-proBNP (NT-proBNP) as an indicator of cardiac dysfunction. A study in patients presenting with suspected cardiac disorders. *Z Kardiol*, 94, 247-54.
- HICKEY, K. A., RUBANYI, G., PAUL, R. J. & HIGHSMITH, R. F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 248, C550-6.
- HILLEGE, H. L., FIDLER, V., DIERCKX, G. F., VAN GILST, W. H., DE ZEEUW, D., VAN VELDHUISEN, D. J., GANS, R. O., JANSSEN, W. M., GROBBEE, D. E. & DE JONG, P. E. (2002) Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*, 106, 1777-82.

- HIRATA, K., AKITA, H., YOKOYAMA, M. & WATANABE, Y. (1992) Impaired vasodilatory response to atrial natriuretic peptide during atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb*, 12, 99-105.
- HIRATA, Y., EMORI, T., EGUCHI, S., KANNO, K., IMAI, T., OHTA, K. & MARUMO, F. (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 91, 1367-73.
- HIRATA, Y., ISHII, M., SUGIMOTO, T., MATSUOKA, H., FUKUI, K., SUGIMOTO, T., YAMAKADO, M., TAGAWA, H., MIYATA, A., KANGAWA, K. & ET AL. (1988) Hormonal and renal effects of atrial natriuretic peptide in patients with secondary hypertension. *Circulation*, 78, 1401-10.
- HO, M. C., LO, A. C., KURIHARA, H., YU, A. C., CHUNG, S. S. & CHUNG, S. K. (2001) Endothelin-1 protects astrocytes from hypoxic/ischemic injury. *Faseb J*, 15, 618-26.
- HOCHER, B., THONE-REINEKE, C., BAUER, C., RASCHACK, M. & NEUMAYER, H. H. (1997a) The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 35, 175-89.
- HOCHER, B., THONE-REINEKE, C., ROHMEISS, P., SCHMAGER, F., SLOWINSKI, T., BURST, V., SIEGMUND, F., QUERTERMOUS, T., BAUER, C., NEUMAYER, H. H., SCHLEUNING, W. D. & THEURING, F. (1997b) Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest*, 99, 1380-9.
- HOLLISTER, A. S., RODEHEFFER, R. J., WHITE, F. J., POTTS, J. R., IMADA, T. & INAGAMI, T. (1989) Clearance of atrial natriuretic factor by lung, liver, and kidney in human subjects and the dog. *J Clin Invest*, 83, 623-8.
- HOSODA, K., NAKAO, K., HIROSHI, A., SUGA, S., OGAWA, Y., MUKOYAMA, M., SHIRAKAMI, G., SAITO, Y., NAKANISHI, S. & IMURA, H. (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*, 287, 23-6.
- HOSODA, K., NAKAO, K., TAMURA, N., ARAI, H., OGAWA, Y., SUGA, S., NAKANISHI, S. & IMURA, H. (1992) Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*, 267, 18797-804.
- HUANG, J., UPADHYAY, U. M. & TAMARGO, R. J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*, 66, 232-45.
- HURN, P. D., SUBRAMANIAN, S., PARKER, S. M., AFENTOULIS, M. E., KALER, L. J., VANDENBARK, A. A. & OFFNER, H. (2007) T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1798-805.
- IBSEN, H., OLSEN, M. H., WACHTELL, K., BORCH-JOHNSEN, K., LINDHOLM, L. H., MOGENSEN, C. E., DAHLOF, B., DEVEREUX, R. B., DE FAIRE, U., FYHRQUIST, F., JULIUS, S., KJELDSSEN, S. E., LEDERBALLE-PEDERSEN, O., NIEMINEN, M. S., OMVIK, P., OPARIL, S. & WAN, Y. (2005) Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*, 45, 198-202.
- INAGAMI, T., MISONO, K. S., FUKUMI, H., MAKI, M., TANAKA, I., TAKAYANAGI, R., IMADA, T., GRAMMER, R. T., NARUSE, M., NARUSE, K. & ET AL. (1987) Structure and physiological actions of rat atrial natriuretic factor. *Hypertension*, 10, 1113-7.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2863-7.

- ISHIKAWA, T., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988) Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol*, 255, H970-3.
- JERNBERG, T., LINDAHL, B., SIEGBAHN, A., ANDREN, B., FROSTFELDT, G., LAGERQVIST, B., STRIDSBERG, M., VENGE, P. & WALLENTIN, L. (2003) N-terminal pro-brain natriuretic peptide in relation to inflammation, myocardial necrosis, and the effect of an invasive strategy in unstable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 42, 1909-16.
- JOHN, S. W., KREGG, J. H., OLIVER, P. M., HAGAMAN, J. R., HODGIN, J. B., PANG, S. C., FLYNN, T. G. & SMITHIES, O. (1995) Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science*, 267, 679-81.
- JOKIVARSI, K. T., GROHN, H. I., GROHN, O. H. & KAUPPINEN, R. A. (2007) Proton transfer ratio, lactate, and intracellular pH in acute cerebral ischemia. *Magn Reson Med*, 57, 647-53.
- KAASJAGER, K. A., VAN RIJN, H. J., KOOMANS, H. A. & RABELINK, T. J. (1995) Interactions of nifedipine with the renovascular effects of endothelin in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 306-11.
- KANGAWA, K. & MATSUO, H. (1984) Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*, 118, 131-9.
- KANSE, S. M., TAKAHASHI, K., LAM, H. C., REES, A., WARREN, J. B., PORTA, M., MOLINATTI, P., GHATEI, M. & BLOOM, S. R. (1991) Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci*, 48, 1379-84.
- KASHGARIAN, M. (1985) Pathology of small blood vessel disease in hypertension. *Am J Kidney Dis*, 5, A104-10.
- KASUYA, Y., TAKUWA, Y., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. (1989) Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 1049-55.
- KAWAI, N., KEEP, R. F. & BETZ, A. L. (1997) Hyperglycemia and the vascular effects of cerebral ischemia. *Stroke*, 28, 149-54.
- KHOSLA, N., SARAFIDIS, P. A. & BAKRIS, G. L. (2006) Microalbuminuria. *Clin Lab Med*, 26, 635-53, vi-vii.
- KIEMER, A. K., HARTUNG, T. & VOLLMAR, A. M. (2000) cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J Immunol*, 165, 175-81.
- KNAPPE, S., WU, F., MADLANSACAY, M. R. & WU, Q. (2004) Identification of domain structures in the propeptide of corin essential for the processing of proatrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*, 279, 34464-71.
- KNAPPE, S., WU, F., MASIKAT, M. R., MORSER, J. & WU, Q. (2003) Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin: design and characterization of a soluble corin. *J Biol Chem*, 278, 52363-70.
- KOBAYASHI, T., MIYAUCHI, T., SAKAI, S., YAMAGUCHI, I., GOTO, K. & SUGISHITA, Y. (1998) Endothelin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme in failing hearts of rats with myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 Suppl 1, S417-20.

- KOEDEL, U., LORENZL, S., GORRIZ, C., ARENDT, R. M. & PFISTER, H. W. (1998) Endothelin B receptor-mediated increase of cerebral blood flow in experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 67-74.
- KOGURE, K., BUSTO, R., SCHEINBERG, P. & REINMUTH, O. M. (1974) Energy metabolites and water content in rat brain during the early stage of development of cerebral infarction. *Brain*, 97, 103-14.
- KOHAN, D. E. (1992) Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. *J Lab Clin Med*, 119, 477-84.
- KOHAN, D. E. (1997) Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis*, 29, 2-26.
- KOIZUMI, J., YOSHIDA, Y., NAKAZAWA, T. & OONEDA, G. (1986) Experimental studies of ischaemic brain edema I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischaemic area. *Jpn J Stroke*, 8, 1-8.
- KOLLER, K. J., LOWE, D. G., BENNETT, G. L., MINAMINO, N., KANGAWA, K., MATSUO, H. & GOEDDEL, D. V. (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*, 252, 120-3.
- KOLLOCH, R. & OFFERS, E. (2001) [Vasopeptidase inhibition: a new pharmacological principle in the treatment of hypertension and cardiac insufficiency]. *Dtsch Med Wochenschr*, 126, 1342-7.
- KOMATSU, Y., NAKAO, K., SUGA, S., OGAWA, Y., MUKOYAMA, M., ARAI, H., SHIRAKAMI, G., HOSODA, K., NAKAGAWA, O., HAMA, N. & ET AL. (1991) C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology*, 129, 1104-6.
- KOYAMA, Y., ISHIBASHI, T., HAYATA, K. & BABA, A. (1993) Endothelins modulate dibutyryl cAMP-induced stellation of cultured astrocytes. *Brain Res*, 600, 81-8.
- KRIKOV, M., THONE-REINEKE, C., MULLER, S., VILLRINGER, A. & UNGER, T. (2008) Candesartan but not ramipril pretreatment improves outcome after stroke and stimulates neurotrophin BDNF/TrkB system in rats. *J Hypertens*, 26, 544-52.
- LAPOINTE, M. C. (2005) Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides*, 26, 944-56.
- LEE, J. M., ZHAI, G., LIU, Q., GONZALES, E. R., YIN, K., YAN, P., HSU, C. Y., VO, K. D. & LIN, W. (2007) Vascular permeability precedes spontaneous intracerebral hemorrhage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 38, 3289-91.
- LESETH, K. H., ADNER, M., BERG, H. K., WHITE, L. R., AASLY, J. & EDVINSSON, L. (1999) Cytokines increase endothelin ETB receptor contractile activity in rat cerebral artery. *Neuroreport*, 10, 2355-9.
- LEVIN, E. R., GARDNER, D. G. & SAMSON, W. K. (1998) Natriuretic peptides. *N Engl J Med*, 339, 321-8.
- LEWINGTON, S., CLARKE, R., QIZILBASH, N., PETO, R. & COLLINS, R. (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360, 1903-13.
- LI, C., ENGSTROM, G., HEDBLAD, B., BERGLUND, G. & JANZON, L. (2005a) Blood pressure control and risk of stroke: a population-based prospective cohort study. *Stroke*, 36, 725-30.
- LI, F., OMAE, T. & FISHER, M. (1999) Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke*, 30, 2464-70; discussion 2470-1.

- LI, J., CULMAN, J., HORTNAGL, H., ZHAO, Y., GEROVA, N., TIMM, M., BLUME, A., ZIMMERMANN, M., SEIDEL, K., DIRNAGL, U. & UNGER, T. (2005b) Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *Faseb J*, 19, 617-9.
- LIN, K. F., CHAO, J. & CHAO, L. (1999) Atrial natriuretic peptide gene delivery reduces stroke-induced mortality rate in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 33, 219-24.
- LINCOLN, T. M. & CORNWELL, T. L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J*, 7, 328-38.
- LIPTON, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 1431-568.
- LIU, L., WANG, Z., WANG, X., SONG, L., CHEN, H., BEMEUR, C., STE-MARIE, L. & MONTGOMERY, J. (2007) Comparison of two rat models of cerebral ischemia under hyperglycemic conditions. *Microsurgery*, 27, 258-62.
- LO, E. H., DALKARA, T. & MOSKOWITZ, M. A. (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, 4, 399-415.
- LONGA, E. Z., WEINSTEIN, P. R., CARLSON, S. & CUMMINS, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20, 84-91.
- LOVENBERG, W. & MILLER, R. C. (1990) Endothelin: a review of its effects and possible mechanisms of action. *Neurochem Res*, 15, 407-17.
- LUSCHER, T. F., OEMAR, B. S., BOULANGER, C. M. & HAHN, A. W. (1993a) Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors--Part I. *J Hypertens*, 11, 7-11.
- LUSCHER, T. F., OEMAR, B. S., BOULANGER, C. M. & HAHN, A. W. (1993b) Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors--Part II. *J Hypertens*, 11, 121-6.
- LUSCHER, T. F. & WENZEL, R. R. (1995) Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl*, 45, 237-53.
- LYSKO, P. G., ELSHOURBAGY, N. A., PULLEN, M. & NAMBI, P. (1995) Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 88, 96-101.
- MACMAHON, S. (1996) Blood pressure and the prevention of stroke. *J Hypertens Suppl*, 14, S39-46.
- MAGUIRE, J. J., JOHNSON, C. M., MOCKRIDGE, J. W. & DAVENPORT, A. P. (1997) Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 122, 1647-54.
- MAIR, J. (2008) Review: Biochemistry of B-type natriuretic peptide - where are we now? *Clin Chem Lab Med*.
- MAIR, J., HAMMERER-LEUCHER, A. & PUSCHENDORF, B. (2001) The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med*, 39, 571-88.
- MAKIKALLIO, A. M., MAKIKALLIO, T. H., KORPELAINEN, J. T., VUOLTEENAHO, O., TAPANAINEN, J. M., YLITALO, K., SOTANIEMI, K. A., HUIKURI, H. V. & MYLLYLA, V. V. (2005) Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke*, 36, 1016-20.
- MARSDEN, P. A., DORFMAN, D. M., COLLINS, T., BRENNER, B. M., ORKIN, S. H. & BALLERMANN, B. J. (1991) Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am J Physiol*, 261, F117-25.
- MASAKI, T., YANAGISAWA, M. & GOTO, K. (1992) Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev*, 12, 391-421.



- MASCIA, L., FEDORKO, L., STEWART, D. J., MOHAMED, F., TERBRUGGE, K., RANIERI, V. M. & WALLACE, M. C. (2001) Temporal relationship between endothelin-1 concentrations and cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 32, 1185-90.
- MATSUKAWA, N., GRZESIK, W. J., TAKAHASHI, N., PANDEY, K. N., PANG, S., YAMAUCHI, M. & SMITHIES, O. (1999) The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7403-8.
- MATSUO, Y., MIHARA, S., NINOMIYA, M. & FUJIMOTO, M. (2001) Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 32, 2143-8.
- MCAULEY, M. A., BREU, V., GRAHAM, D. I. & MCCULLOCH, J. (1996) The effects of bosentan on cerebral blood flow and histopathology following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Eur J Pharmacol*, 307, 171-81.
- MCDOWELL, G., COUTIE, W., SHAW, C., BUCHANAN, K. D., STRUTHERS, A. D. & NICHOLLS, D. P. (1997) The effect of the neutral endopeptidase inhibitor drug, candoxatril, on circulating levels of two of the most potent vasoactive peptides. *Br J Clin Pharmacol*, 43, 329-32.
- MCGRATH, M. F., DE BOLD, M. L. & DE BOLD, A. J. (2005) The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 469-77.
- MCNEILL, H., WILLIAMS, C., GUAN, J., DRAGUNOW, M., LAWLOR, P., SIRIMANNE, E., NIKOLICS, K. & GLUCKMAN, P. (1994) Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport*, 5, 901-4.
- MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, 19, 151-67.
- MIES, G., HERMANN, D., GANTEN, U. & HOSSMANN, K. A. (1999) Hemodynamics and metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats before manifestation of brain infarcts. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 1238-46.
- MINAMINO, T., KURIHARA, H., TAKAHASHI, M., SHIMADA, K., MAEMURA, K., ODA, H., ISHIKAWA, T., UCHIYAMA, T., TANZAWA, K. & YAZAKI, Y. (1997) Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation*, 95, 221-30.
- MIZUGUCHI, T., NISHIYAMA, M., MOROI, K., TANAKA, H., SAITO, T., MASUDA, Y., MASAKI, T., DE WIT, D., YANAGISAWA, M. & KIMURA, S. (1997) Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol*, 120, 1427-30.
- MORI, E., DEL ZOPPO, G. J., CHAMBERS, J. D., COPELAND, B. R. & ARFORS, K. E. (1992) Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke*, 23, 712-8.
- MORITA, R., UKYO, N., FURUYA, M., UCHIYAMA, T. & HORI, T. (2003) Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting phenotype through its receptor guanylyl cyclase-coupled receptor A. *J Immunol*, 170, 5869-75.
- MURTHY, K. S. & MAKHLOUF, G. M. (1999) Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J Biol Chem*, 274, 17587-92.
- NAGAOKA, A., IWATSUKA, H., SUZUOKI, Z. & OKAMOTO, K. (1976) Genetic predisposition to stroke in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 230, 1354-9.

- NAGAOKA, A., SHINO, A., SHIBOTA, M., FUJITA, T. & IWATSUKA, H. (1979) Pathogenesis of cerebral stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats; importance of renal perfusion pressure [proceedings]. *Jpn Heart J*, 20, 712.
- NARUSHIMA, I., KITA, T., KUBO, K., YONETANI, Y., MOMOCHI, C., YOSHIKAWA, I., OHNO, N. & NAKASHIMA, T. (2003) Highly enhanced permeability of blood-brain barrier induced by repeated administration of endothelin-1 in dogs and rats. *Pharmacol Toxicol*, 92, 21-6.
- NAWASHIRO, H., BRENNER, M., FUKUI, S., SHIMA, K. & HALLENBECK, J. M. (2000) High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1040-4.
- NAWASHIRO, H., MARTIN, D. & HALLENBECK, J. M. (1997a) Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 229-32.
- NAWASHIRO, H., MARTIN, D. & HALLENBECK, J. M. (1997b) Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 778, 265-71.
- NEMOTO, E. M. & FRINAK, S. (1981) Brain tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats. *Stroke*, 12, 77-82.
- NUSSENZVEIG, D. R., LEWICKI, J. A. & MAACK, T. (1990) Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem*, 265, 20952-8.
- O'CONNELL, J. E., JARDINE, A. G., DAVIDSON, G. & CONNELL, J. M. (1992) Candoxatril, an orally active neutral endopeptidase inhibitor, raises plasma atrial natriuretic factor and is natriuretic in essential hypertension. *J Hypertens*, 10, 271-7.
- OBRENOVITCH, T. P. (1995) The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 7, 297-323.
- OGATA, J., FUJISHIMA, M., TAMAKI, K., NAKATOMI, Y., ISHITSUKA, T. & OMAE, T. (1982) Stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an experimental model of malignant hypertension. A pathological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 394, 185-94.
- OISHI, S., SASAKI, M. & SATO, T. (1994) Elevated immunoreactive endothelin levels in patients with pheochromocytoma. *Am J Hypertens*, 7, 717-22.
- OKAMOTO, K. & AOKI, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27, 282-93.
- OKAMOTO, K., YAMORI, Y. & NAGAOKA, A. (1974) Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive Rats (SHR). *Circ Res*, 34/35, 143 - 153.
- OLNEY, J. W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164, 719-21.
- OVBIAGELE, B. (2008) Impairment in glomerular filtration rate or glomerular filtration barrier and occurrence of stroke. *Arch Neurol*, 65, 934-8.
- OVERGAARD, K., SEREGHY, T., BOYSEN, G., PEDERSEN, H., HOYER, S. & DIEMER, N. H. (1992) A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12, 484-90.
- PANDEY, K. N. (1992) Kinetic analysis of internalization, recycling and redistribution of atrial natriuretic factor-receptor complex in cultured vascular smooth-muscle cells. Ligand-dependent receptor down-regulation. *Biochem J*, 288 ( Pt 1), 55-61.

- PARK, L. & THORNHILL, J. (2001) Phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzymes modulate cerebral blood flow and neural damage of hypoxic rats. *Neurosci Lett*, 301, 95-8.
- PATEL, T. R. & MCCULLOCH, J. (1996) Failure of an endothelin antagonist to modify hypoperfusion after transient global ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16, 490-9.
- POTTER, L. R., ABBEY-HOSCH, S. & DICKEY, D. M. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27, 47-72.
- PRASS, K. & DIRNAGL, U. (1998) Glutamate antagonists in therapy of stroke. *Restor Neurol Neurosci*, 13, 3-10.
- PRIETO, R., CARCELLER, F., RODA, J. M. & AVENDANO, C. (2005) The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurol Res*, 27, 47-52.
- PULSINELLI, W. A., WALDMAN, S., RAWLINSON, D. & PLUM, F. (1982) Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology*, 32, 1239-46.
- RABELINK, T. J., KAASJAGER, K. A., BOER, P., STROES, E. G., BRAAM, B. & KOOMANS, H. A. (1994) Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathophysiology. *Kidney Int*, 46, 376-81.
- RADEMAKER, M. T., CHARLES, C. J., KOSOGLU, T., PROTTER, A. A., ESPINER, E. A., NICHOLLS, M. G. & RICHARDS, A. M. (1997) Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. *Am J Physiol*, 273, H2372-9.
- RAKUGI, H., NAKAMARU, M., SAITO, H., HIGAKI, J. & OGIHARA, T. (1988) Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun*, 155, 1244-7.
- REID, J. L., DAWSON, D. & MACRAE, I. M. (1995) Endothelin, cerebral ischaemia and infarction. *Clin Exp Hypertens*, 17, 399-407.
- RELTON, J. K., MARTIN, D., THOMPSON, R. C. & RUSSELL, D. A. (1996) Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol*, 138, 206-13.
- REMUZZI, G. & BENIGNI, A. (1993) Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet*, 342, 589-93.
- RICHARDS, A. M., WITTERT, G. A., CROZIER, I. G., ESPINER, E. A., YANDLE, T. G., IKRAM, H. & FRAMPTON, C. (1993) Chronic inhibition of endopeptidase 24.11 in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *J Hypertens*, 11, 407-16.
- ROBINSON, R. G., SHOEMAKER, W. J., SCHLUMPF, M., VALK, T. & BLOOM, F. E. (1975) Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature*, 255, 332-4.
- ROSS, A. M., HURN, P., PERRIN, N., WOOD, L., CARLINI, W. & POTEMPA, K. (2007) Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 16, 203-7.
- ROSSI, G. P., COLONNA, S., PAVAN, E., ALBERTIN, G., DELLA ROCCA, F., GEROSA, G., CASAROTTO, D., SARTORE, S., PAULETTO, P. & PESSINA, A. C. (1999) Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation*, 99, 1147-55.

- ROTHERMUND, L., LUCKERT, S., KOSSMEHL, P., PAUL, M. & KREUTZ, R. (2001) Renal endothelin ET(A)/ET(B) receptor imbalance differentiates salt-sensitive from salt-resistant spontaneous hypertension. *Hypertension*, 37, 275-80.
- ROTHWELL, P. M., COULL, A. J., GILES, M. F., HOWARD, S. C., SILVER, L. E., BULL, L. M., GUTNIKOV, S. A., EDWARDS, P., MANT, D., SACKLEY, C. M., FARMER, A., SANDERCOCK, P. A., DENNIS, M. S., WARLOW, C. P., BAMFORD, J. M. & ANSLOW, P. (2004) Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). *Lancet*, 363, 1925-33.
- ROUX, S., LOFFLER, B. M., GRAY, G. A., SPRECHER, U., CLOZEL, M. & CLOZEL, J. P. (1995) The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, 37, 78-85; discussion 85-6.
- RUBANYI, G. M. & POLOKOFF, M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46, 325-415.
- RUBATTU, S., SCIARRETTA, S., VALENTI, V., STANZIONE, R. & VOLPE, M. (2008) Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens*, 21, 733-41.
- RUOCCO, A., NICOLE, O., DOCAGNE, F., ALI, C., CHAZALVIEL, L., KOMESLI, S., YABLONSKY, F., ROUSSEL, S., MACKENZIE, E. T., VIVIEN, D. & BUISSON, A. (1999) A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 1345-53.
- SABATINE, M. S., MORROW, D. A., DE LEMOS, J. A., GIBSON, C. M., MURPHY, S. A., RIFAI, N., MCCABE, C., ANTMAN, E. M., CANNON, C. P. & BRAUNWALD, E. (2002) Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation*, 105, 1760-3.
- SABRANE, K., KRUSE, M. N., FABRITZ, L., ZETSCHKE, B., MITKO, D., SKRYABIN, B. V., ZWIENER, M., BABA, H. A., YANAGISAWA, M. & KUHN, M. (2005) Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest*, 115, 1666-74.
- SAIJONMAA, O., RISTIMAKI, A. & FYHRQUIST, F. (1990) Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 173, 514-20.
- SAITO, Y., NAKAO, K., ITOH, H., YAMADA, T., MUKOYAMA, M., ARAI, H., HOSODA, K., SHIRAKAMI, G., SUGA, S., MINAMINO, N. & ET AL. (1989) Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 158, 360-8.
- SAKURAI, T., YANAGISAWA, M., TAKUWA, Y., MIYAZAKI, H., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348, 732-5.
- SAPER, C. B., STANDAERT, D. G., CURRIE, M. G., SCHWARTZ, D., GELLER, D. M. & NEEDLEMAN, P. (1985) Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science*, 227, 1047-9.
- SATO, A., CANNY, B. J. & AUTELITANO, D. J. (1997) Adrenomedullin stimulates cAMP accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 230, 311-4.
- SCHIFFRIN, E. L. (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*, 43, 19-29.

- SCHIFFRIN, E. L., DENG, L. Y., SVENTEK, P. & DAY, R. (1997) Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens*, 15, 57-63.
- SCHINDLER, R., MANCILLA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S. C. & DINARELLO, C. A. (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, 75, 40-7.
- SCHIRGER, J. A., HEUBLEIN, D. M., CHEN, H. H., LISY, O., JOUGASAKI, M., WENBERG, P. W. & BURNETT, J. C., JR. (1999) Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc*, 74, 126-30.
- SCHMERBACH, K., SCHEFE, J. H., KRIKOV, M., MULLER, S., VILLRINGER, A., KINTSCHER, U., UNGER, T. & THOENE-REINEKE, C. (2008) Comparison between single and combined treatment with candesartan and pioglitazone following transient focal ischemia in rat brain. *Brain Res*, 1208, 225-33.
- SCHULZ, S., SINGH, S., BELLET, R. A., SINGH, G., TUBB, D. J., CHIN, H. & GARBERS, D. L. (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*, 58, 1155-62.
- SCHWEITZ, H., VIGNE, P., MOINIER, D., FRELIN, C. & LAZDUNSKI, M. (1992) A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem*, 267, 13928-32.
- SILBERBACH, M. & ROBERTS, C. T., JR. (2001) Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal*, 13, 221-31.
- SIMON, R. & XIONG, Z. (2006) Acidotoxicity in brain ischaemia. *Biochem Soc Trans*, 34, 1356-61.
- SIMON, R. P. (2006) Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol*, 63, 1368-71.
- SIMONSON, M. S. (1993) Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev*, 73, 375-411.
- SIMONSON, M. S. & DUNN, M. J. (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J*, 4, 2989-3000.
- SIREN, A. L., LEWCZUK, P., HASSELBLATT, M., DEMBOWSKI, C., SCHILLING, L. & EHRENREICH, H. (2002) Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. *Brain Res*, 945, 144-9.
- SIRONI, L., GUERRINI, U., TREMOLI, E., MILLER, I., GELOSA, P., LASCIALFARI, A., ZUCCA, I., EBERINI, I., GEMEINER, M., PAOLETTI, R. & GIANAZZA, E. (2004) Analysis of pathological events at the onset of brain damage in stroke-prone rats: a proteomics and magnetic resonance imaging approach. *J Neurosci Res*, 78, 115-22.
- SMITH, M. L., VON HANWEHR, R. & SIESJO, B. K. (1986) Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6, 574-83.
- SOONTHON-BRANT, V., PATEL, P. M., DRUMMOND, J. C., COLE, D. J., KELLY, P. J. & WATSON, M. (1999) Fentanyl does not increase brain injury after focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg*, 88, 49-55.
- STASCH, J. P., HIRTH-DIETRICH, C., FROBEL, K. & WEGNER, M. (1995) Prolonged endothelin blockade prevents hypertension and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 8, 1128-34.

- STENMAN, E., JAMALI, R., HENRIKSSON, M., MADDAHI, A. & EDVINSSON, L. (2007) Cooperative effect of angiotensin AT(1) and endothelin ET(A) receptor antagonism limits the brain damage after ischemic stroke in rat. *Eur J Pharmacol*, 570, 142-8.
- STENMAN, E., MALMSJO, M., UDDMAN, E., GIDO, G., WIELOCH, T. & EDVINSSON, L. (2002) Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat. *Stroke*, 33, 2311-6.
- STIER, C. T., JR., BENTER, I. F. & LEVINE, S. (1988) Thromboxane A2 in severe hypertension and stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 19, 1145-50.
- SUPATTAPONE, S., SIMPSON, A. W. & ASHLEY, C. C. (1989) Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*, 165, 1115-22.
- SUZUKI, T., YAMAZAKI, T. & YAZAKI, Y. (2001) The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 51, 489-94.
- SZOK, D., HANSEN-SCHWARTZ, J. & EDVINSSON, L. (2001) In depth pharmacological characterization of endothelin B receptors in the rat middle cerebral artery. *Neurosci Lett*, 314, 69-72.
- TAGAMI, M., KUBOTA, A., NARA, Y. & YAMORI, Y. (1991) Detailed disease processes of cerebral pericytes and astrocytes in stroke-prone SHR. *Clin Exp Hypertens A*, 13, 1069-75.
- TAGAMI, M., NARA, Y., KUBOTA, A., FUJINO, H. & YAMORI, Y. (1990) Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 21, 1064-71.
- TAKANO, K., TATLISUMAK, T., BERGMANN, A. G., GIBSON, D. G., 3RD & FISHER, M. (1997) Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci*, 153, 8-11.
- TARKOWSKI, E., ROSENGREN, L., BLOMSTRAND, C., WIKKELSO, C., JENSEN, C., EKHOLM, S. & TARKOWSKI, A. (1995) Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke*, 26, 1393-8.
- THOM, T., HAASE, N., ROSAMOND, W., HOWARD, V. J., RUMSFELD, J., MANOLIO, T., ZHENG, Z. J., FLEGAL, K., O'DONNELL, C., KITTNER, S., LLOYD-JONES, D., GOFF, D. C., JR., HONG, Y., ADAMS, R., FRIDAY, G., FURIE, K., GORELICK, P., KISSELA, B., MARLER, J., MEIGS, J., ROGER, V., SIDNEY, S., SORLIE, P., STEINBERGER, J., WASSERTHIEL-SMOLLER, S., WILSON, M. & WOLF, P. (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 113, e85-151.
- TORRE-AMIONE, G., YOUNG, J. B., COLUCCI, W. S., LEWIS, B. S., PRATT, C., COTTER, G., STANGL, K., ELKAYAM, U., TEERLINK, J. R., FREY, A., RAINISIO, M. & KOBIRIN, I. (2003) Hemodynamic and clinical effects of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, in patients hospitalized for acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 42, 140-7.
- TOURNIER-LASSERVE, E., JOUTEL, A., MELKI, J., WEISSENBACH, J., LATHROP, G. M., CHABRIAT, H., MAS, J. L., CABANIS, E. A., BAUDRIMONT, M., MACIAZEK, J. & ET AL. (1993) Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet*, 3, 256-9.
- TOUYZ, R. M., TURGEON, A. & SCHIFFRIN, E. L. (2000) Endothelin-A-receptor blockade improves renal function and doubles the lifespan of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36, S300-4.

- TREMBLAY, J., DESJARDINS, R., HUM, D., GUTKOWSKA, J. & HAMET, P. (2002) Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem*, 230, 31-47.
- TSURUDA, T., BOERRIGTER, G., HUNTLEY, B. K., NOSER, J. A., CATALIOTTI, A., COSTELLO-BOERRIGTER, L. C., CHEN, H. H. & BURNETT, J. C., JR. (2002) Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res*, 91, 1127-34.
- VALDENNAIRE, O., LEPAILLEUR-ENOUF, D., EGIDY, G., THOUARD, A., BARRET, A., VRANCKX, R., TOUGARD, C. & MICHEL, J. B. (1999) A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem*, 264, 341-9.
- VOLPE, M., IACCARINO, G., VECCHIONE, C., RIZZONI, D., RUSSO, R., RUBATTU, S., CONDORELLI, G., GANTEN, U., GANTEN, D., TRIMARCO, B. & LINDPAINTNER, K. (1996) Association and cosegregation of stroke with impaired endothelium-dependent vasorelaxation in stroke prone, spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest*, 98, 256-61.
- WALBERER, M., STOLZ, E., MULLER, C., FRIEDRICH, C., ROTTGER, C., BLAES, F., KAPS, M., FISHER, M., BACHMANN, G. & GERRIETS, T. (2006) Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI). *Lab Anim*, 40, 1-8.
- WEBB, D. J. (1997) Endothelin: from molecule to man. *Br J Clin Pharmacol*, 44, 9-20.
- WEI, J., COHEN, D. M. & QUAST, M. J. (2003) Effects of 2-deoxy-d-glucose on focal cerebral ischemia in hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 556-64.
- WEIDMANN, P., HASLER, L., GNADINGER, M. P., LANG, R. E., UEHLINGER, D. E., SHAW, S., RASCHER, W. & REUBI, F. C. (1986) Blood levels and renal effects of atrial natriuretic peptide in normal man. *J Clin Invest*, 77, 734-42.
- WENNBERG, P. W., MILLER, V. M., RABELINK, T. & BURNETT, J. C., JR. (1999) Further attenuation of endothelium-dependent relaxation imparted by natriuretic peptide receptor antagonism. *Am J Physiol*, 277, H1618-21.
- WHO (2007) World Health Report 2007 - A safer future: global public health security in the 21st century. World Health Organisation.
- WILCOX, J. G., HATCH, I. E., GENTZSCHEIN, E., STANCZYK, F. Z. & LOBO, R. A. (1997) Endothelin levels decrease after oral and nonoral estrogen in postmenopausal women with increased cardiovascular risk factors. *Fertil Steril*, 67, 273-7.
- WU, F., YAN, W., PAN, J., MORSER, J. & WU, Q. (2002) Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277, 16900-5.
- WU, Q., XU-CAI, Y. O., CHEN, S. & WANG, W. (2008) Corin: new insights into the natriuretic peptide system. *Kidney Int*.
- XU, D., EMOTO, N., GIAID, A., SLAUGHTER, C., KAW, S., DEWIT, D. & YANAGISAWA, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 78, 473-85.
- YAMADA, Y., GOTO, J. & YOKOTA, M. (1997) Brain natriuretic peptide is a sensitive indicator of impaired left-ventricular function in elderly patients with cardiovascular disease. *Cardiology*, 88, 401-7.

- YAMASAKI, Y., MATSUO, Y., ZAGORSKI, J., MATSUURA, N., ONODERA, H., ITOYAMA, Y. & KOGURE, K. (1997) New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. *Brain Res*, 759, 103-11.
- YAMORI, Y. (1989) Predictive and preventive pathology of cardiovascular diseases. *Acta Pathol Jpn*, 39, 683-705.
- YAMORI, Y. (1991) Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man. *Clin Exp Hypertens A*, 13, 631-44.
- YAN, W., WU, F., MORSER, J. & WU, Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8525-9.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-5.
- ZAREMBA, J., SKROBANSKI, P. & LOSY, J. (2001) Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomed Pharmacother*, 55, 258-63.
- ZHANG, B., TANAKA, J., YANG, L., YANG, L., SAKANAKA, M., HATA, R., MAEDA, N. & MITSUDA, N. (2004) Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience*, 126, 433-40.
- ZHANG, Y., BELAYEV, L., ZHAO, W., IRVING, E. A., BUSTO, R. & GINSBERG, M. D. (2005) A selective endothelin ET(A) receptor antagonist, SB 234551, improves cerebral perfusion following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 1045, 150-6.
- ZHANG, Z. G., ZHANG, L., JIANG, Q., ZHANG, R., DAVIES, K., POWERS, C., BRUGGEN, N. & CHOPP, M. (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 106, 829-38.
- ZIV, I., FLEMINGER, G., DJALDETTI, R., ACHIRON, A., MELAMED, E. & SOKOLOVSKY, M. (1992) Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke*, 23, 1014-6.



## Eigene Publikationen und Präsentationen

### Eingereichte Publikationen:

**Wengenmayer, C.**, Krikov, M., Mueller, S., Lucht, K., Villringer, A., Unger, T., Hoher, B., Thoene-Reineke, C. (2009) Novel therapie approach in primary stroke prevention: Simultaneous inhibition of the endothelin converting enzyme and the neutral endopeptidase in spontaneously hypertensive, stroke-prone rats improves survival. *Neurol Res* In Press.

**Wengenmayer, C.**, Krikov, M., Mueller, S., Lucht, K., Villringer, A., Steckelings, U., Unger, T., Thoene-Reineke, C. (2009) Stroke Research: Influence of the vehicle in the evaluation of new drugs in rats. *Lab Anim* Eingereicht.

Thoene-Reineke, C., Krikov M., Rumschuessel, K., Schmerbach, K., Namsolleck, P., **Wengenmayer, C.**, Mueller, S., Villringer, A., Steckelings, U., Unger T. (2009) Prevention and intervention studies with telmisartan, ramipril and their combination in different rat stroke models. *CNS Neurosci Ther.* Eingereicht.

### Veröffentlichte Posterpräsentationen:

46. Jahrestagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und 10.

Fortbildungsveranstaltung der IGTP

September 2008

**Christina Wengenmayer**, Krikov M, Lucht K, Müller S, Villringer A, Steckelings U, Unger T, Thoene-Reineke C.

Influence of the vehicle on stroke outcome in rats.

Danksagung

## **Danksagung**

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich als erstes bei Frau Prof. Dr. Fink für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der veterinärmedizinischen Fakultät bedanken.

Herrn Prof. Dr. T. Unger danke ich für seine Unterstützung und dafür, dass er es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. C. Thöne-Reineke für ihr Engagement und ihre anregenden Ideen und Ratschläge bedanken und bei Herrn Prof. Dr. B. Hoher für die immer wieder motivierenden Diskussionen und Vorschläge.

Desweiteren möchte ich mich bei dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der FU Berlin für ihre netten und hilfreichen Ratschläge bei der statistischen Auswertung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau K. Ströder und Frau K. Lucht für die freundschaftliche Unterstützung, hilfreichen Anregungen und gute Zusammenarbeit, Herrn M. Krikov für die tolle Einarbeitung in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit und all meinen Laborkollegen für das angenehme Arbeitsklima.

Frau S. Müller danke ich für ihre sehr nette und schnelle Hilfe bei den leider immer wieder auftretenden technischen Problemen im MRT.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für den stetigen Rückhalt bedanken.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Christina Wengenmayer, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mainz, den 16. November 2009

Christina Wengenmayer