

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethmann)  
und  
der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
(Direktor: Prof. Dr. med. J. - C. Tonn)  
  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems bei der fokalen zerebralen Ischämie

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
David Benjamin Lumenta  
aus  
Bonn

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. R. Schmid-Elsaesser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Chr. P. Sommerhoff  
Prof Dr. B. Walzog

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Zausinger

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2005

## **Publikation**

Aus Gründen der Aktualität wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bereits vorab in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zausinger, S.; Lumenta, D.B.; Pruneau, D.; Schmid-Elsaesser, R.; Plesnila, N.; Baethmann, A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia.

Brain Res., 2002. 950(1-2): S. 268-278.

Zausinger, S.; Lumenta, D. B.; Pruneau, D.; Schmid-Elsaesser, R.; Plesnila, N.; Baethmann, A. Therapeutical efficacy of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia.

Acta Neurochir Suppl, 2003. 86: S. 205-7.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1	Definition und Epidemiologie der zerebralen Ischämie.....	7
1.2	Pathophysiologische Grundbegriffe.....	10
1.3	Kallikrein-Kinin-System.....	14
1.3.1	Historie.....	14
1.3.2	Aktivierung, Synthese und Metabolismus.....	15
1.3.3	Rezeptoren.....	18
1.3.4	Rezeptorantagonisten.....	22
1.3.5	LF 16-0687 Ms.....	24
1.3.6	Allgemeine Pharmakologie und Funktion.....	26
1.3.6.1	Kardiovaskuläres System.....	28
1.3.6.2	Weitere Organsysteme.....	30
1.3.6.3	Trauma, Sepsis.....	32
1.3.7	Spezielle Funktion und Pharmakologie im Zentralen Nervensystem.....	32
1.3.7.1	Identifikation im ZNS.....	33
1.3.7.2	Interaktionen im ZNS.....	33
1.3.7.3	Neuroprotektion.....	34
1.3.7.4	Schädel-Hirn-Trauma (SHT).....	36
1.3.7.5	Schlaganfall.....	37
1.4	Ziel dieser Untersuchung.....	39
1.5	Fragestellung.....	40
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>41</b>
2.1	Versuchstiere.....	41
2.2	Intraluminale Fadenmodell.....	41
2.3	Narkose.....	43
2.4	Physiologische Kontrollparameter.....	43
2.4.1	Blutdruck.....	43
2.4.2	Arterielle Blutgasanalyse, Glukose und Laktat.....	44
2.4.3	Hämoglobin und Hämatokrit.....	44
2.4.4	Temporale und rektale Temperatur.....	44
2.4.5	Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF).....	45
2.5	Präparation.....	48
2.6	Auswertung.....	49

2.6.1	Gewichtsentwicklung.....	49
2.6.2	Funktionelle neurologische Erholung.....	49
2.6.3	Infarktvolumen.....	51
2.6.4	Hirnschwellung und Wassergehalt einer Hemisphäre .....	53
2.6.5	Statistische Analyse.....	54
2.7	Versuchsgruppen .....	56
2.7.2	Studie I: Neuroprotektive Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms .....	56
2.7.3	Studie II: Einfluss auf die postischämische Hirnschwellung .....	58
2.7.4	Studie III: Dosisbereich und postischämische Wirksamkeit.....	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
3.1	Studie I.....	62
3.1.1	Physiologische Kontrollparameter .....	62
3.1.2	Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF).....	63
3.1.3	Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit.....	64
3.1.4	Infarktvolumen.....	65
3.2	Studie II.....	67
3.2.1	Physiologische Kontrollparameter .....	67
3.2.2	Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF).....	68
3.2.3	Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit.....	69
3.2.4	Hirnschwellung und Wassergehalt .....	69
3.3	Studie III.....	71
3.3.1	Physiologische Kontrollparameter .....	71
3.3.2	Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF).....	72
3.3.3	Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit.....	73
3.3.4	Infarktvolumen.....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1	Methodik.....	76
4.1.1	Intraluminales Fadenmodell.....	76
4.1.2	Funktionelle Erholung .....	79
4.1.3	Gravimetrie .....	80
4.1.4	Infarktvolumen.....	82
4.2	Ergebnisse.....	84
4.2.1	Studie I.....	84
4.2.1.1	Dosierung und Applikationsintervall .....	84
4.2.1.2	Low Dose versus High Dose.....	86

4.2.2	Studie II .....	90
4.2.2.1	B <sub>2</sub> -Rezeptorblockade und Ödembildung .....	90
4.2.3	Studie III .....	95
4.2.3.1	Wahl der Dosierung .....	95
4.2.3.2	Infarktvolumen.....	96
4.2.3.3	Neurologische Erholung .....	98
4.2.3.4	Postischämische Wirksamkeit .....	99
4.3	Zusammenfassung.....	101
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>116</b>
A	Abkürzungsverzeichnis .....	116
B	Begriffsdefinitionen.....	118
C	Danksagung .....	119
D	Lebenslauf.....	120
E	Erklärung .....	121

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Epidemiologie der zerebralen Ischämie

Die zerebrale Ischämie bezeichnet das Unterschreiten eines kritischen Grenzwertes der Hirndurchblutung mit Abnahme der aktuellen Substrat- und Sauerstoffversorgung unter den Bedarf des Gehirns, der zur Aufrechterhaltung eines Funktions- und Strukturstoffwechsel notwendig ist. Sie führt innerhalb kürzester Zeit zu funktionellen (reversiblen) und strukturellen (irreversiblen) Schäden. Zum allgemeinen Verständnis ist es wichtig zwei Formen der zerebralen Ischämie zu unterscheiden: Globale und fokale zerebrale Ischämie.

Bei einer globalen zerebralen Ischämie liegt eine Durchblutungsstörung vor, die das gesamte Gehirn betrifft. Sie entsteht auf dem Boden eines Herz-Kreislauf-Stillstandes sowie im Rahmen von geburtshilflichen Komplikationen (Blutverlust oder unzureichender venöser Rückfluss durch Gewebekompression), Narkosezwischenfällen (generalisierter Blutdruckabfall als Unverträglichkeitsreaktion oder Folge einer Überdosierung eines Medikaments) oder Polytraumata (Gefäßrupturen oder Blutverlust).

Eine fokale zerebrale Ischämie ist auf ein von entsprechenden Hirnarterien versorgtes Territorium beschränkt. Eine plötzlich auftretende fokale zerebrale Ischämie kann sich unter dem klinischen Bild eines Schlaganfalls darstellen. Je nach betroffenem Hirnareal kann er zu Körperpartienlähmungen, Sprach- und Verhaltensstörungen sowie im weiteren Verlauf zu Vigilanz-, Atem-, Kreislauf-, Schluck- und Affektstörungen führen.

Haupttrisikofaktoren für die Entstehung eines Schlaganfalls sind:

- erhöhtes Alter, erbliche Disposition, ethnische Herkunft (unbeeinflussbar)
- Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Rauchen, Adipositas, verminderte körperliche Aktivität, Ernährung und Stress (beeinflussbar) [196].

Nach einer Studie des *National Heart Lung and Blood Institute* (NHLBI) aus den USA entstehen 83 % der untersuchten neu eingetretenen Schlaganfälle durch eine zerebrale Ischämie auf dem Boden von Thrombosen, kardiogenen Embolien, Vaskulitiden und Hirnvenen- bzw. Sinusvenenthrombosen. Andere Ursachen des Schlaganfalls sind

Hirnblutungen, bei denen die intrazerebrale Blutung (ICB) einen Anteil von zehn und die Subarachnoidalblutung (SAB) einen von sieben Prozent einnimmt [193].

Die Definition des Schlaganfalls (engl. *stroke*) berücksichtigt beide unterschiedlichen Genesen, Ischämie und Blutung, orientiert sich vor allem an der Symptomatik und definiert sich als ein klinisches Syndrom mit einem sich plötzlich entwickelnden neurologischen Defizit, rein vaskulären Ursprungs, von mehr als 24 Stunden (h) Dauer [122]. Eine weitere Ursache einer fokalen zerebralen Ischämie ist die temporäre Unterbindung einer Hirnarterie mittels Clipping oder Ligatur während neurochirurgischer Operationen. Sie ist vor allem bei Aneurysmaoperationen, Gefäßtranspositionen, extra-/intrakraniellen Bypassoperationen und Carotisendarterektomien unumgänglich, da hierbei das Risiko einer vorzeitigen Ruptur eines Aneurysmas verhindert bzw. die Operation überhaupt erst möglich wird.

Detaillierte epidemiologische Daten zum Schlaganfall sind vorwiegend aus den USA verfügbar und können aufgrund der vergleichbaren Bevölkerungsstruktur auf die westlichen Industrienationen übertragen werden:

Im Jahr 2001 erlitt in den USA durchschnittlich alle 45 Sekunden eine Person einen Schlaganfall und war mit circa 500.000 Erst- und 200.000 Rezidivfällen, einer Prävalenz von 2,0 % sowie mit 163.538 Verstorbenen die dritthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen [4]. 8-12 % der ischämischen Schlaganfälle und 37-38 % der Hirnblutungen führen innerhalb der ersten 30 Tage zum Tod [193, 250].

Aus der *Framingham Heart Study* geht hervor, dass 15-30 % der Überlebenden eines Schlaganfalls in den USA trotz eingehender neurologischer Rehabilitation mit permanenten Behinderungen der motorischen und sprachlichen Kompetenz zu kämpfen haben. Dieser Anteil ist umso größer, je älter die Patienten sind [4]. Der Schlaganfall ist damit in den USA die häufigste Ursache für Behinderungen im hohen Alter [226]. Die dadurch entstehenden direkten und indirekten Kosten werden jährlich auf etwa 30-50 Billionen US-Dollar geschätzt [225].

Vergleichbar detaillierte Statistiken stehen in Deutschland nicht zur Verfügung. 1994 wurde das Erlanger Schlaganfall Projekt (ESPro) als erstes bevölkerungsbasiertes Schlaganfall-Register Deutschlands gegründet, welches eine speziellere Datenerhebung zur Erforschung von Epidemiologie, Prognose und Versorgung des Schlaganfalls als das Statistische Bundesamt ermöglicht [110, 111].

Aus den vorliegenden Zahlen lässt sich die gesundheitspolitische und volkswirtschaftliche Bedeutung des Schlaganfalls ersehen. Umso wichtiger ist der wissenschaftliche Fortschritt in Prävention und Therapie, um die aus der Erkrankung entstehenden Folgen einzudämmen.

## 1.2 Pathophysiologische Grundbegriffe

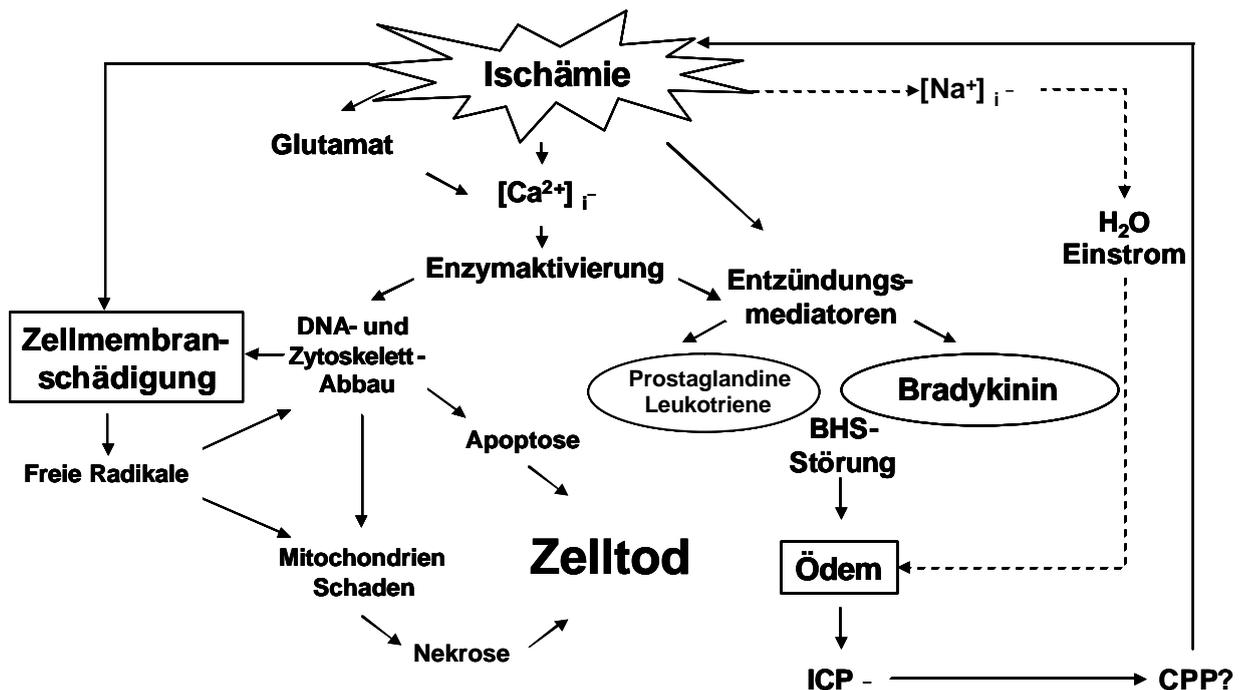


Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener intrazellulärer Schädigungsmechanismen und Ihrer Interaktionen während fokaler zerebraler Ischämie

Die Unterbrechung der Blutversorgung eines von einer Hirnarterie versorgten Areals führt zu einer fokalen zerebralen Ischämie. Durch den Zusammenbruch der Energieversorgung versagen die Ionenpumpen: Kalzium- ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Natrium- ( $\text{Na}^+$ ), Kalium\*- und Chloridionen\* strömen in die Zelle ein und die Zellmembran depolarisiert. Exzitatorische Neurotransmitter, wie Glutamat, häufen sich im synaptischen Spalt an und öffnen nach Rezeptorbindung weitere Ionenkanäle.

Dem Einstrom von Natrium in die Zelle folgt entlang des osmotischen Gradienten Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ), was zu einer intrazellulären Flüssigkeitsansammlung, einem Ödem, führt. Neu gebildete und in das Gewebe eingedrungene Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Bradykinin zerstören die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Der Einstrom von Wasser in das Hirnparenchym wird verstärkt. Dadurch steigt der Hirndruck (ICP) an und der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) wird weiter verringert.

Durch die intrazelluläre Kalziumüberladung kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung von verschiedenen Enzymsystemen, die unter anderem einen Desoxyribonukleinsäure- (DNA) und Zytoskelettabbau sowie Apoptosemechanismen in Gang setzen. Der vermehrte Anfall von freien Radikalen verstärkt die Zellschädigung. Der Mitochondrienausfall führt zur Zellnekrose. Die Zellstruktur und -funktion kann nicht mehr aufrechterhalten werden und die Zelle geht unter.

\* nicht abgebildet

Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Schädigungsmechanismen und Ihrer Interaktionen. Statt von einer ischämischen Schädigungskaskade spricht man besser von einem Netzwerk sich gegenseitig beeinflussender und überschneidender Kaskaden. Das Schema wurde dem folgenden Kapitel vorangestellt, um eine kompakte Übersicht über dieses Netzwerk zu ermöglichen.

Der exakte Ablauf der pathophysiologischen Prozesse, die zur Ausbildung des Schadens nach zerebraler Ischämie führen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben dem primären, durch die Ischämie bedingten Schaden bildet sich im weiteren Verlauf der sekundäre Hirnschaden aus. Er wird definiert als der Schaden, der nicht unmittelbar nach einem Insult vorhanden ist, sondern der sich mit einer zeitlichen Verzögerung von Stunden bis Tagen entwickelt [10, 215].

Die Penumbra, die den ischämischen Kern perifokal umgibt, wird als das Gewebe definiert, dessen Funktionsstoffwechsel stark reduziert ist, aber dessen Strukturstoffwechsel erhalten geblieben ist. In der Penumbra ist die synaptische Übertragung eingestellt, das Ionengleichgewicht aber noch erhalten. Der Ausfall der synaptischen Übertragung ist reversibel, falls rechtzeitig eine Perfusion wiederhergestellt werden kann. Die Penumbra ist damit ein Zielpunkt von neuroprotektiven Therapieansätzen, da es sich hierbei um potentiell zu rettendes Gewebe handelt. Bei länger andauernder Ischämie tritt in der Penumbra ebenfalls der irreversible Zelltod ein [9, 152].

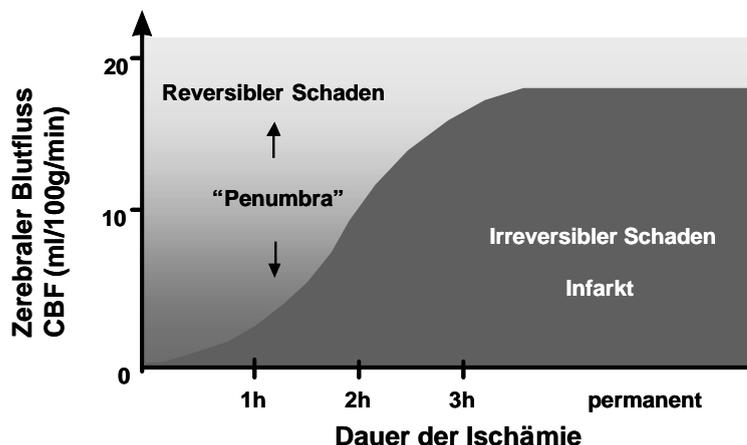


Abbildung 2: Entwicklung eines zerebralen Infarkts in Abhängigkeit von Schwere und Dauer einer fokalen Ischämie [87, 99]

Die durchschnittliche Durchblutung des menschlichen Kortex beträgt circa 55 ml/100g/min. Bei einer Durchblutung von unter 23 ml/100g/min zeigt das EEG (Elektroenzephalogramm) eine isoelektrische Nulllinie, als Zeichen des Funktionsverlustes von Nervenzellen, der Strukturstoffwechsel ist hierbei noch intakt. Unterhalb von etwa 18 ml/100g/min ist es abhängig von der Dauer der Ischämie, ob ein Infarkt entstehen kann [87]. Bei einem zerebralen Blutfluss unter 8 ml/100g/min kann selbst bei kurzer Ischämiedauer eine Nervenzellnekrose eintreten. In der Penumbra herrschen Durchblutungswerte um etwa 15 ml/100g/min [9]. Je geringer die Restdurchblutung desto kürzer ist aber auch das therapeutische Fenster für protektive Maßnahmen [99].

Das Hirnödem wird nach H.M. Pappius (1974) definiert als eine Zunahme des Hirnwassergehaltes, die zu einer Expansion des Hirnvolumens führt [11]. Es wird eine zytotoxische von einer vasogenen Komponente des Hirnödems unterschieden [108].

Beim zytotoxischen Hirnödem kommt es zu einer intrazellulären Flüssigkeitsansammlung, die aufgrund einer Störung des zellulären Stoffwechsels wie zum Beispiel im Rahmen einer zerebralen Ischämie entsteht. Beim vasogenen Hirnödem steigt der extrazelluläre Flüssigkeitsanteil aufgrund einer erhöhten kapillären Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und plasmaproteinhaltige Ödemflüssigkeit tritt in das Hirnparenchym über. Die Blut-Hirn-Schranke dient der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase des Gehirns und reguliert den Eintritt von Substanzen aus dem Intravasalraum. Sie wird von Endothelzellen des Gehirngefäßsystems und deren Verbindungen zueinander, den tight junctions, gebildet. Spezifische Transportsysteme stellen die Versorgung des Gehirns sicher [1].

Bei der fokalen zerebralen Ischämie sind beide Komponenten des Hirnödems präsent, das vasogene Hirnödem setzt später als das zytotoxische Hirnödem ein [153]. Bei Ratten können frühestens zwei bis drei Stunden nach dem primären Insult Signalintensitätsveränderungen in den T2 gewichteten Sequenzen, die mit dem Ausmaß des vasogenen Hirnödems korrelieren, im Magnet-Resonanz-Tomogramm (MRT) nachgewiesen werden [130]. Je größer das Ausmaß des vasogenen Hirnödems, desto schlechter ist die Prognose und größer die Gefahr einer intrazerebralen Blutung von Patienten innerhalb der ersten Stunden nach zerebraler Ischämie [43, 113].

Für den Durchtritt von Flüssigkeit aus dem Intravasalraum in das Gehirn [79] sind insbesondere Mediatorstoffe (vgl. Tabelle 1) verantwortlich, welche die Entstehung des vaskulären und parenchymalen Schadens fördern [238].

---

**Bradykinin**, Serotonin (via 5-HT Rezeptoren), Histamin

Purinnukleotide: ATP, ADP, AMP

Phospholipase A<sub>2</sub>, Plättchen aktivierender Faktor (PAF)

Arachidonsäure, Prostaglandine, Leukotriene

Interleukine: IL-1a, IL-1b, IL-2

Inflammatorische Proteine der Makrophagen: MIP-1, MIP-2

Complement-derived polypeptide C3a-desArg

Freie Radikale, NO

---

**Tabelle 1: Vasoaktive Mediatorsubstanzen, welche die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen [1]**

Wahl et al. haben folgende fünf Bedingungen gestellt [239]. Um als Mediator eines Hirnödems zu gelten, muss / müssen:

1. ein physiologischer Effekt auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar sein
2. vasodilatierende Eigenschaften vorhanden sein, welche den transmuralen *Bulk Flow* erhöhen
3. er die Fähigkeit haben, ein Hirnödem zu verursachen
4. die Konzentration im Gewebe unter pathophysiologischen Bedingungen erhöht sein
5. eine Reduktion der Ödembildung durch pharmakologische Antagonisierung nachweisbar sein.

Bradykinin erfüllt alle fünf Bedingungen und hat sich als ein Mediator für die Entwicklung des Hirnödems und sekundären Hirnschadens herausgestellt [238].

Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems und damit verbundene Freisetzung von Bradykinin verursacht eine Reihe von schädigenden Folge-mechanismen, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

## 1.3 Kallikrein-Kinin-System

### 1.3.1 Historie

Die Beobachtung, dass die intravenöse Gabe von humanem Urin in die Zirkulation von anästhesierten Hunden eine Blutdrucksenkung bewirkt [3], führte zur Entdeckung des Kallikrein-Kinin-Systems, das von dem Chirurgen Emil Karl Frey und dem Physiologen Heinrich Kraut (Ludwig-Maximilians-Universität, München) im Jahre 1928 erstmals beschrieben wurde [66]. Sie charakterisierten diese Substanzgruppe aufgrund ihrer hypotensiven Eigenschaften als Kreislaufhormone und konnten sie auch aus Speichel, Plasma und einer ganzen Reihe von Organsystemen isolieren. Da das Pankreas eine auffällig hohe Konzentration dieser Substanz enthält, wurde sie, nach dem griechischen Wort für Bauchspeicheldrüse *kallikrēas*, als Kallikrein bezeichnet. Im Jahre 1937 entdeckten Werle, Götze und Keppler, dass die Wirkung des Kallikreins über die Aktivierung eines inaktiven Zwischenstoffs stattfindet, welche eine Kontraktion von glatter Muskulatur bewirkt [246]. Die aktive Substanz bezeichneten Werle und Berek im Jahre 1948 [245] als Kallidin, welches ein Polypeptid ist und aus seiner inaktiven Form (Kininogen) abgespalten wird.

Durch die Arbeit von Rocha e Silva [191] im Jahre 1949 wurde erstmals über eine als Bradykinin bezeichnete Substanz im Blutplasma berichtet. Bradykinin wird durch Trypsin aus einem Globulin freigesetzt und bewirkt eine Blutdrucksenkung sowie eine langsam progrediente Kontraktion der glatten Darmmuskulatur. Der Name rührt von eben dieser beobachteten langsamen Kontraktion aus dem Griechischen: *bradys* für langsam und *kinein* für Bewegung.

Schließlich konnte im Jahre 1960 Bradykinin erstmals isoliert [53] und synthetisiert [23] werden. Es war daraufhin nur eine Frage der Zeit bis die genaue chemische Struktur von Kallidin entschlüsselt war: es ist ein Dekapeptid, oder vereinfacht Bradykinin mit einem zusätzlichen Lysinrest. Beide sind Angehörige einer Substanzgruppe, die seitdem als Kinine bezeichnet werden.

Die 1980 veröffentlichte Systematik von Regoli und Barabé [181] unterschied schließlich zwei unterschiedliche Kininrezeptoren: den B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor. Die in den Jahren darauf entwickelten Kininantagonisten erwiesen sich als nützliche Werkzeuge bei der Erforschung der durch Kinine induzierten Mechanismen.

### 1.3.2 Aktivierung, Synthese und Metabolismus

Die bei Tier und Mensch am häufigsten vorkommenden Vertreter des Kallikrein-Kinin-Systems sind Bradykinin, dessen Abbauprodukt des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin und Kallidin. Diese Peptide sind klassische Entzündungsmediatoren, die Ihre Wirkung vor allem lokal an Orten der Gewebedestruktion nach Trauma oder Ischämie, als Teilkomponenten der allergischen Reaktion oder nach Endotoxinkontakt ausüben. Ihre physiologischen Haupteffekte sind die Induktion von Schmerz durch Reizung nozizeptiver Neurone, Vasodilatation von Arterien, erhöhte Gefäßpermeabilität, Venokonstriktion, Auslösung einer weiteren Aktivierungskaskade mit Freisetzung von unter anderem Prostanoiden und NO, deren Summationseffekt sich klinisch durch die Ausbildung eines Ödems manifestiert.

Bradykinin und Kallidin werden jeweils aus unterschiedlichen Peptidvorstufen, den sogenannten Kininogenen, die in der Leber synthetisiert werden und bei der Eiweiß-Elektrophorese in der  $\alpha_2$ -Globulin-Bande wandern, gebildet: *high molecular weight kininogen* (HMWK) und *low molecular weight kininogen* (LMWK) [200].

Die hochspezifischen Proteasen, welche die Bildung von Kinin stimulieren, werden als Kallikrein bezeichnet.

Bradykinin gilt unter den aufgeführten Kininen als potentester endogener Schmerz- und Entzündungsmediator und wird im Blutplasma aus seiner Vorstufe dem HMWK durch Plasma Kallikrein (Molekulargewicht [MG]: 36 kDa) abgespalten. Plasma Prekallikrein ist ein inaktives Protein (MG: 88 kDa), welches einen 1:1 Komplex mit seinem Substrat (= HMWK) bildet. Analog wird Kallidin im Gewebe aus seiner Vorstufe LMWK gebildet: die dabei aktive Protease heisst Tissue Kallikrein (MG: 29 kDa) und wird unter anderem im Zentralen Nervensystem (ZNS), in den Speicheldrüsen, den Nieren und dem Herz-Kreislauf-System synthetisiert [38].

Bei der Ratte wird zusätzlich ein T-Kinin (Ile-Ser-Bradykinin) unterschieden, welches von T-Kininogen freigesetzt wird [20].

Plasma und Tissue Kallikrein werden durch sogenannte Kallikreinasen aktiviert. Die wichtigste Kallikreinase im Blut ist der aktivierte Hageman Faktor (Faktor XIIa), der durch Kontakt an negativ geladenen Oberflächen wie z.B. Kollagen gebildet wird. Durch die Aktivierung von Kallikrein wird ein positiver Feedbackmechanismus ausgelöst: Kallikrein fördert wiederum die Bildung von aktiviertem Hageman-Faktor (XII  $\rightarrow$  XIIa) [39]. Hierbei wird der enge Zusammenhang des Kallikrein-Kinin-Systems mit dem Gerinnungssystem verdeutlicht. Tissue Kallikrein wird bei der Gewebsreaktion auf fremde und schädliche Noxen

durch Kallikreinasen wie z.B. Trypsin, Thrombin und C1-Esterase gebildet. Die Aktivierung der Kaskade wird durch Proteaseinhibitoren wie z.B. Plasmin, C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH),  $\alpha_1$ -Anti-Trypsin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin [20, 181] verhindert.

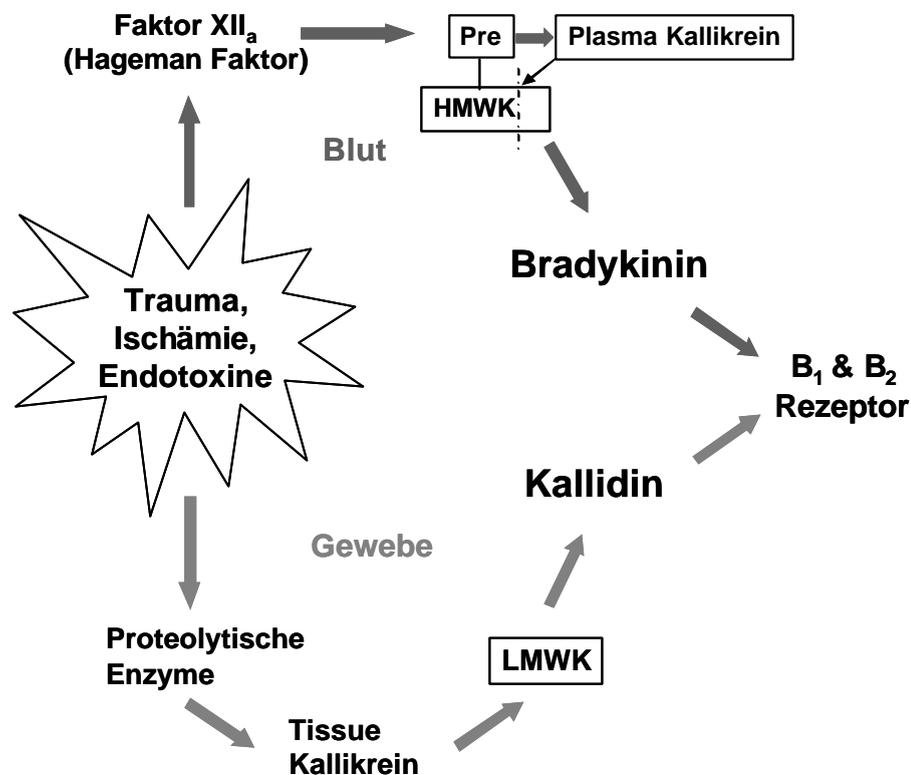


Abbildung 3: Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems

Ein initial schädigendes Ereignis setzt die zwei Aktivierungskaskaden des Kallikrein-Kinin-Systems in Gang. Im Blut kommt es zu einer Aktivierung des Kontaktsystems durch die Bindung von Hageman Faktor (Faktor XII<sub>a</sub>) an negativ geladenen Flächen mit Freisetzung von Bradykinin aus seiner Vorstufe High Molecular Weight Kininogen (HMWK) durch Plasma Kallikrein. Im Gewebe werden proteolytische Enzyme freigesetzt, die Tissue Kallikrein aktivieren und zu einer Abspaltung von Kallidin aus Low Molecular Weight Kininogen (LMWK) führen.

Eine weitere Möglichkeit der Kininbildung ist kallikrein-unabhängig: auf zellulärer Ebene werden Proteasen aus Mastzellen und Granulozyten freigesetzt, die eine Kininfreisetzung stimulieren [169].

Das Nonapeptid Bradykinin ist hauptsächlich für die physiologischen Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems verantwortlich. Kallidin kann zwar mit Hilfe einer Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt werden, benötigt diesen Schritt allerdings nicht, um seine Wirkung zu entfalten. Diese Konversion läuft im Verhältnis zur Geschwindigkeit der Umwandlung der

Kinine durch die Carboxypeptidase, auch als Kininase I bezeichnet, bedeutend langsamer ab. Die durch die Carboxypeptidase generierten Stoffe des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin und des-Arg<sup>9</sup>-Kallidin sind potente Agonisten am Bradykinin B<sub>1</sub>-Rezeptor. Kallidin hat eine etwa gleich hohe Affinität für beide Rezeptoren [28].

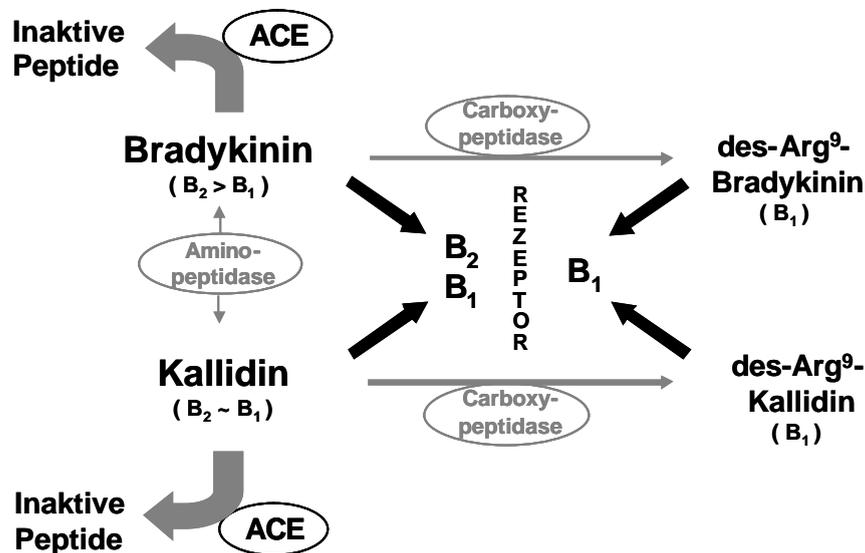


Abbildung 4: Physiologische Umwandlung von Kininen

Bradykinin und Kallidin können reversibel durch die Aminopeptidase umgewandelt werden. Ihre Inaktivierung wird von Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) katalysiert. Die Carboxypeptidase bildet aus Bradykinin und Kallidin jeweils des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin und des-Arg<sup>9</sup>-Kallidin, die starke Agonisten am B-Rezeptor sind. Bradykinin weist eine stärkere Affinität zum B<sub>2</sub>-Rezeptor als zum B<sub>1</sub>-Rezeptor auf (B<sub>2</sub> > B<sub>1</sub>), bei Kallidin ist diese etwa gleich stark für beide Rezeptoren ausgebildet (B<sub>2</sub> ~ B<sub>1</sub>).

Der Abbau der Kinine wird durch das Enzym Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das auch als Kininase II bezeichnet wird, katalysiert. Die Halbwertszeit von Kininen im Plasma liegt bei circa 15 Sekunden, im ZNS ebenfalls unter 30 Sekunden [105]. Noch schneller ist der Abbau im Lungenparenchym, dem Hauptsyntheseort für ACE, wo bereits 80-90% der Kinine abgebaut werden [228].

### 1.3.3 Rezeptoren

Die Vielzahl der Effekte, die durch das Kallikrein-Kinin-System generiert werden, entsteht aufgrund der Interaktion von Kininen mit ihren Rezeptoren, von denen zwei unterschieden werden: der B<sub>2</sub>-Rezeptor, der konstitutiv vorhanden ist [181] und von vielen unterschiedlichen Zellarten exprimiert wird, und der B<sub>1</sub>-Rezeptor, dessen Expressierung durch Zytokine, insbesondere Interleukin-1-β, stimuliert wird [42, 186].

Beide Rezeptoren besitzen sieben Transmembran-Domänen und gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [90, 145, 181].

GPCR sind an die Zellmembran gebundene hydrophobe Proteine. Die physiologischen Effekte von GPCR werden über die Aktivierung von an den Rezeptor gebundenen G-Proteinen vermittelt. G-Proteine sind heterotrimere Moleküle, d.h. sie bestehen aus einer α-, β- und γ-Untereinheit.

Die α-Untereinheit besitzt eine hochspezifische Bindungsstelle für GDP (Guanosin-diphosphat) bzw. GTP (Guanosin-tri-phosphat) und eine weitere Bindungsstelle für die Interaktion des Rezeptors mit seinem Effektor.

Im inaktiven Zustand ist GDP an die α-Untereinheit gebunden. Die Bildung eines Agonist-Rezeptor-Komplexes (z.B. Bradykinin am B<sub>2</sub>-Rezeptor) ermöglicht eine Konformationsänderung an der α-Untereinheit, welche die Bindung von GTP und die Abspaltung von GDP ermöglicht. GTP aktiviert die α-Untereinheit (vgl. Abbildung 5). Das G-Protein löst sich vom Rezeptor und die α- trennt sich von der β/γ-Untereinheit (β/γ-Heterodimer) ab.

Die α-Untereinheit tritt darauf mit einem membrangebundenen Effektor in Interaktion (vgl. Abbildung 6). Die Dauer der Signalübertragungskaskade wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α-Untereinheit bestimmt: sie katalysiert die Hydrolyse von GTP zu GDP, was eine Konformationsänderung bewirkt, die Wiederangliederung an die β/γ-Untereinheit ermöglicht und damit die Signalübertragung des GPCR beendet. Das G-Protein steht für einen neuen GPCR-regulierten Aktivierungszyklus bereit [89].

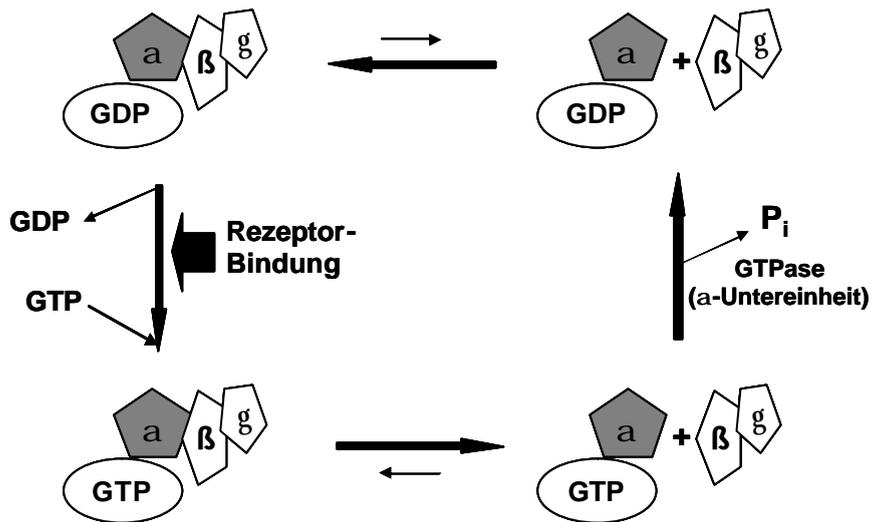


Abbildung 5: Aktivierungszyklus eines G-Proteins nach Rezeptor-Bindung

Der Zyklus der G-Protein-abhängigen Aktivierung eines Effektors wird sowohl durch die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit als auch durch die Trennung/Wiederangliederung der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit reguliert.

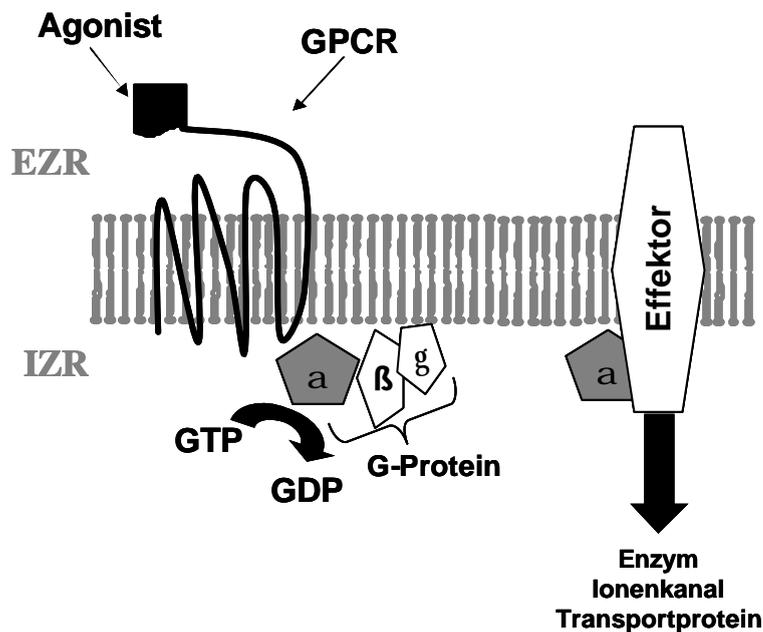


Abbildung 6: G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) [148]

Abhängig von der  $\alpha$ -Untereinheit, nach der das G-Protein benannt wird, wird der Effektor inhibiert oder stimuliert. Die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit wirkt ebenfalls regulierend auf die Folgeprozesse, ihr Einfluss auf den Signaltransduktionsprozess ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Bindung eines Liganden an den GPCR ist spezifisch, die nachfolgende Signaltransduktion ist komplex: so können auf der einen Seite mehrere Rezeptoren ein einziges G-Protein, auf der anderen Seite kann ein Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren. Die Wirkung der G-Proteine ist außerdem abhängig von der Art der aktivierten  $\alpha$ -Untereinheit, die inhibierend (z.B.  $\alpha_i$ ,  $\alpha_o$ ) und stimulierend (z.B.  $\alpha_s$ ,  $\alpha_q$ ) auf die Folgeprozesse wirken kann. Das G-Protein wird entsprechend der ihr zugehörigen  $\alpha$ -Untereinheit benannt: so wird z.B. das G-Protein mit einer  $\alpha_q$ -Untereinheit als  $G_q$ -Protein bezeichnet.

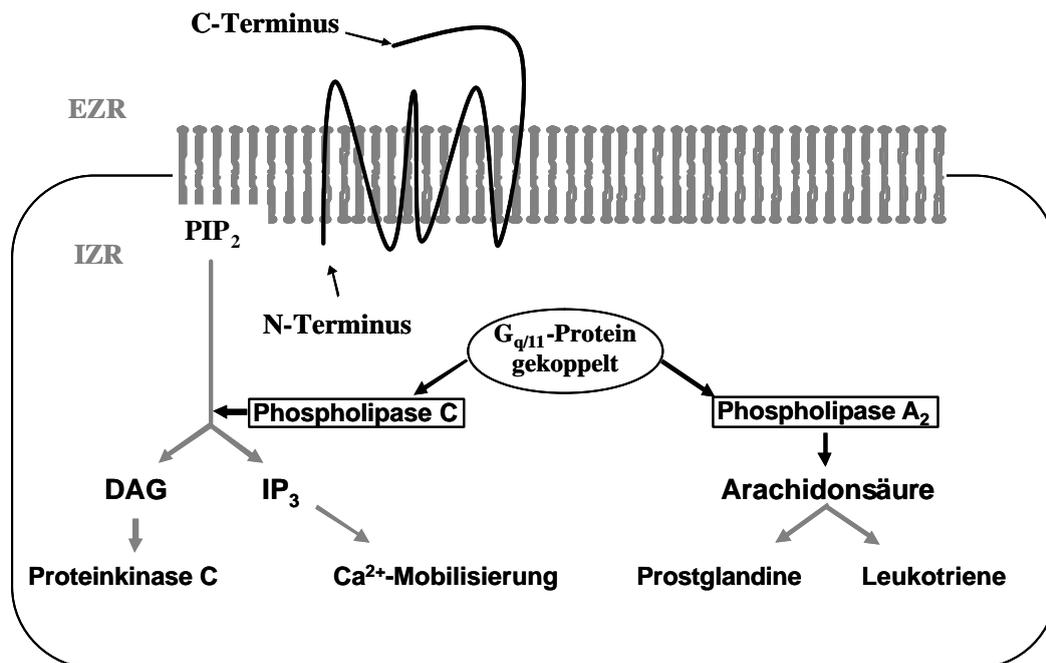


Abbildung 7: Struktur und Transduktionssysteme der Kinin-Rezeptoren  
EZR = Extrazellulärraum, IZR = Intrazellulärraum

In dieser Abbildung ist schematisch der gemeinsame Aufbau von  $B_1$ - und  $B_2$ -Rezeptor mit seinen 7 Transmembran-Abschnitten dargestellt.  $B_1$ - und  $B_2$ -Rezeptor unterscheiden sich strukturell im Aufbau des C-Terminus. Die Kinin-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Näheres siehe unten). Zwei Signalkaskaden werden nach Bindung von Kinin am Rezeptor unterschieden: Die Hydrolyse von Phosphoinositoldiphosphat ( $PIP_2$ ) durch die Phospholipase C (PLC) katalysiert die Bildung sowohl von Inositol-(1,4,5)-triphosphat ( $IP_3$ ) mit anschließender Mobilisierung von Kalzium ( $Ca^{2+}$ , intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung) bewirkt, als auch von Diacylglycerin (DAG), welche die Proteinkinase C (PKC) stimuliert. Die Phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) setzt Arachidonsäure frei, aus der die Entzündungsmediatoren Prostaglandin (PG) und Leukotriene (LT) gebildet werden.

Die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit wirkt ebenfalls regulierend auf die Interaktionen von  $\alpha$ -Untereinheit und Effektor ein [33, 125], ihr genauer Einfluss auf die Aktivierungskaskade ist noch nicht vollständig aufgeklärt [37, 148]. Es wurden bereits 20  $\alpha$ -, 3  $\beta$ - und 7 verschiedene  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert [216]. Effektoren der G-Proteine sind unter anderem Enzyme (z.B. Adylatzyklasten, Phospholipasen) und Ionenkanäle (unter anderem für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). GPCR-aktivierte Systeme sind komplexe Netzwerke von sich gegenseitig beeinflussenden Signaltransduktionssystemen zur Regulation der Zellfunktion.

Die Bradykinin-Rezeptoren sind an ein  $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt, welche die Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphoinositoldiphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositol-(1,4,5)-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerin (DAG).  $\text{IP}_3$  bindet an  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC), die unter anderem Phospholipasen  $A_2$  phosphoryliert.

$\text{PLA}_2$  setzt Arachidonsäure frei, aus der die beiden Entzündungsmediatoren Prostaglandin (PG) mittels des Enzyms Cyclooxygenase und Leukotrien (LT) mittels Lipoxygenase gebildet werden.

Der  $B_2$ -Rezeptor hat, wie bereits erwähnt, eine hohe Affinität für Bradykinin, der  $B_1$ -Rezeptor für Lys-des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin (des-Arg<sup>9</sup>-Kallidin). Der  $B_1$ -Rezeptor unterliegt im Gegensatz zum  $B_2$ -Rezeptor keiner Desensibilisierung oder Internalisierung und hat bei mehrmaliger Applikation von Agonisten ein gleichbleibendes Aktivitätsschema [120, 185]. Der Bradykinin  $B_2$ -Rezeptor wird bei Bindung durch Agonisten desensibilisiert und anschließend internalisiert, was die schnelle Reversibilität seiner biologischen Wirkung erklärt und vermutlich auf die veränderte C-Terminal Schleife des Bradykinin  $B_2$ -Rezeptors, der dort Tyrosin und Serin-Anteile aufweist, zurückzuführen ist [128].

Die wichtigsten Eigenschaften der beiden Rezeptoren sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>
<b>Klasse</b>	Transmembran-Protein mit 7 Domänen	
<b>Aminosäuren</b>	353	364
<b>Ahnlichkeit B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub></b>	36%	
<b>Ahnlichkeit AT<sub>1</sub></b>	35%	29%
<b>Rezeptortransduktionssysteme</b>	G-Protein ( $G_{q/11}$ ) PLC PLA <sub>2</sub>	
<b>Expressionsmuster</b>	induzierbar	konstitutiv
<b>Desensibilisierung</b>	keine	vorhanden
<b>Internalisierung</b>	keine	vorhanden

Tabelle 2: Molekularbiologische Eigenschaften der Kinin  $B_1$ - und  $B_2$ -Rezeptoren, modifiziert nach Regoli et al. und Abe et al. [2, 183]

B<sub>1</sub>- wie B<sub>2</sub>-Rezeptoren konnten bereits in verschiedenen Spezies unter anderem bei Hase, Maus, Ratte, Hamster, Kaninchen, Hund, Schwein und beim Menschen nachgewiesen werden. B<sub>1</sub>-Rezeptoren weisen zu 35% Ähnlichkeit mit dem Angiotensin<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) auf, B<sub>2</sub>-Rezeptoren zu 29% [2, 88].

Neben den molekularbiologischen Eigenschaften unterscheiden sich die Bradykinin-Rezeptoren in ihrem zeitlichen Aktivierungsmuster. B<sub>2</sub>-Rezeptoren sind für den Großteil der physiologischen Effekte verantwortlich, sie sind konstitutiv vorhanden und induzieren die akuten Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems [183]. B<sub>1</sub>-Rezeptoren werden beim Menschen unter physiologischen Bedingungen normalerweise nicht exprimiert [168]. Die in der Literatur vorherrschende Meinung ist, dass B<sub>1</sub>-Rezeptoren erst unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei Trauma, Ischämie oder Infektion induziert werden. Dies soll die anfängliche B<sub>2</sub>-Rezeptorüberaktivierung weitervermitteln und die inflammatorische Antwort des Gewebes verstärken [41, 137, 164]. Die Induktionsdauer der B<sub>1</sub>-Rezeptoren nach Stimulation mit Lipopolysacchariden, die Oberflächenbestandteile der Membran gram-negativer Bakterien sind, beträgt beispielsweise beim Hasen circa fünf Stunden [186] und bei der Ratte sogar 12-24 Stunden [227].

Die Existenz eines B<sub>3</sub>-Rezeptors wurde bereits Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts kontrovers diskutiert [183, 228, 243]. Boels und Schaller entdeckten im Jahre 2003 einen GPCR, der durch Bindung von Bradykinin und Kallidin, eine Calcium-Mobilisation bewirkt, dessen biochemische Struktur nicht identisch mit dem B<sub>1</sub>- oder B<sub>2</sub>-Rezeptor ist. Der Rezeptor wird unter anderem in menschlichen Zellen des Pankreas, Herzens, Skelettmuskels, der Speicheldrüsen, Harnblase, Niere, Leber, Plazenta, Schilddrüse, Ovarien, des Knochenmarks, aber auch des Gehirns exprimiert [21].

### 1.3.4 Rezeptorantagonisten

Name	Struktur	Funktion
Bradykinin (BK)	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Agonist, B <sub>2</sub> >B <sub>1</sub>
Kallidin =Lys -BK	<b>Lys</b> -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Agonist, B <sub>2</sub> =B <sub>1</sub>
des-Arg <sup>9</sup> -Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	Agonist, B <sub>1</sub>
des-Arg <sup>10</sup> -Kallidin	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	Agonist, B <sub>1</sub>

**Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten endogenen Kinine**

Der Einsatz von spezifischen Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten ermöglichte erst die genaue Erforschung des Kallikrein-Kinin-Systems. Tabelle 3 gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten endogenen Kinine und Tabelle 4 über B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten.

Antagonisten der ersten (nicht aufgeführt) und zweiten Generation, wie HOE-140 und CP-0127, sind Peptide. Trotz ihrer therapeutischen Wirksamkeit haben sie wegen ihrer Peptideigenschaften für die klinische Anwendung nur einen eingeschränkten Nutzen: Die Produktion von Peptid-Antagonisten erfordert aufwendige Verfahren und ist mit erhöhten Herstellungskosten verbunden. Sie haben eine verkürzte Haltbarkeitsdauer im Vergleich zu Nicht-Peptiden. Ein weiterer Vorteil der Nicht-Peptide liegt in der oralen Verfügbarkeit, da sie nicht wie Peptide im Gastrointestinaltrakt abgebaut werden. Nicht-Peptide haben außerdem eine längere Halbwertszeit im Körper und sind daher auch für eine orale ambulante Behandlung von chronischen Erkrankungen geeignet [88].

HOE 140, Icatibant	[D-Arg]-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-Tic-Oic-Arg*	Antagonist, B <sub>2</sub>	Standardmedikament in der Forschung
CP-0127, Deltibant, Bradycor	[D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Phe-Leu-Arg] <sub>2</sub> BSH	Antagonist, B <sub>2</sub>	Häufig verwendeter Antagonist, zwei klinische Neurotraumastudien
WIN 64338	Nicht-Peptid	Antagonist, B <sub>2</sub>	im Vergleich zu anderen Nicht-Peptid-Antagonisten geringe Spezifität, hohe Affinität zu muskarinischen Rezeptoren, hohe Speziesvariabilität mit geringer Affinität zu menschlichen B <sub>2</sub> -Rez.
FR-167344	Nicht-Peptid	Antagonist, B <sub>2</sub>	Erste Bradykinin B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisten der 3. Generation
FR-173657	Nicht-Peptid	Antagonist, B <sub>2</sub>	
Bradyzide	Nicht-Peptid	Antagonist, B <sub>2</sub>	Speziesabhängig, selektiver für den B <sub>2</sub> -Rez. bei Ratten als bei Menschen
LF 16-0687 Ms	Nicht-Peptid	Antagonist, B <sub>2</sub>	hochselektiv für B <sub>2</sub> -Rez., geringe Affinität zu muskarinischen M <sub>1</sub> - und M <sub>2</sub> -Rezeptoren

**Tabelle 4: Übersicht über B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Auswahl) [88, 172, 228]**

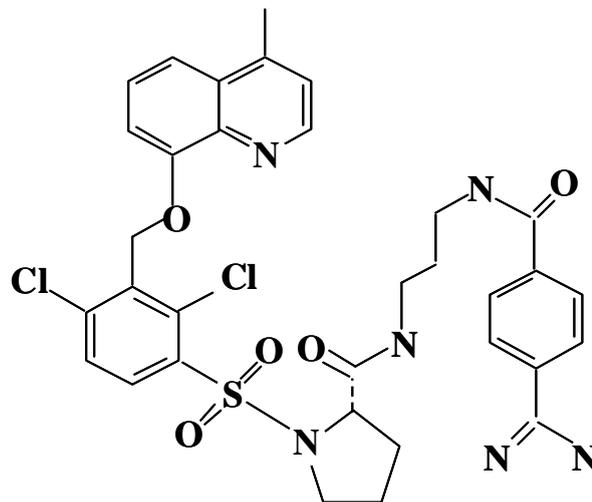
\* Hyp = trans-4-hydroxy-Pro, Thi = b-(2-thienyl)-Ala, Tic = [D]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3yl-carbonyl, Oic = (3as,7as)-octahydroindol-2yl-carbonyl

Die ersten klinischen Studien, welche die Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung bei chronischem Asthma bronchiale [5], beim Schwere Systemischen Inflammationsreaktions Syndrom (SIRS, *severe systemic inflammatory response syndrome*) [58] und bei Schädel-Hirn-Trauma [138, 151] untersuchten, brachten keine überzeugenden Ergebnisse hervor, die eine breite klinische Anwendung rechtfertigen würden. In allen Studien wurden B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten verwendet, die auf Peptid-Basis beruhten.

Erst Ende der neunziger Jahre des vorherigen Jahrhunderts wurden Nicht-Peptid-Antagonisten der Bradykinin-Rezeptoren entwickelt [88]. Richtungweisend war dabei die Arbeit der Forscher der Firma Fujisawa, die mit FR-167344 und FR-173657 den Grundstein für die dritte Generation der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten legten [2, 88].

Eine der Substanzen, die strukturell auf diesen Antagonisten aufbaut, ist LF-16-0687 Ms, welche in Untersuchungen alle günstigen Eigenschaften eines Nicht-Peptid Antagonisten aufweist. Er ist hochselektiv für den Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor, hat keine intrinsische Bradykinin-Aktivität und besitzt eine geringe Selektivität für muskarinische M<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptoren [172].

### 1.3.5 LF 16-0687 Ms



**Abbildung 8:** LF 16-0687 Ms (1-[[2,4-dichloro-3-[[2,4-di-methylquinolin-8-yl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)phenyl]carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidinecarboxamid, MG 989) [172]

Für unsere Versuche verwendeten wir LF 16-0687 Ms (1-[[2,4-dichloro-3-[[2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)phenyl]carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidinecarboxamid, MG 989, vgl. Abbildung 8). LF 16-0687 Ms ist ein Nicht-Peptid Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist, der von Laboratoires Fournier (Dijon, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde.

LF 16-0687 Ms wurde bei mehr als vierzig verschiedenen Rezeptoren auf seine Bindungsfähigkeit untersucht. LF 16-0687 Ms bindet spezifisch an den rekombinanten

Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor von Mensch, Ratte und Meerschwein mit K<sub>i</sub>-Werten von jeweils 0,67 nM, 1,74 nM and 1,37 nM. Bei nativen B<sub>2</sub>-Rezeptoren, die der menschlichen Umbilikalvene, dem Uterus der Ratte und dem Ileum des Meerschweinchens entstammten, konnten K<sub>i</sub>-Werte von jeweils 0,89 nM, 0,28 nM und 0,98 nM gemessen werden. K<sub>i</sub>-Werte sind Gleichgewichtswerte, die in einem Agonist-Antagonist-Rezeptor-System ermittelt werden. Je kleiner ein K<sub>i</sub>-Wert ist, desto potenter ist der Inhibitor (=Antagonist). K<sub>i</sub> ist die Konzentration eines Antagonisten, die nötig ist, um die maximale Umwandlungsgeschwindigkeit V<sub>max</sub> um 50% zu reduzieren.

Bindungsstudien an über 40 verschiedenen Rezeptoren ergaben, dass LF 16-0687 Ms, bis auf eine Affinität für die humanen muskarinischen M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub>-Rezeptoren ab IC<sub>50</sub>-Werten von jeweils 0,30 µM und 0,46 µM, hochspezifisch für den B<sub>2</sub>-Rezeptor ist. IC<sub>50</sub> ist die Konzentration, die nötig ist, um einen 50%igen Hemmeffekt an einem Rezeptor herbeizuführen (Screening-Untersuchung).

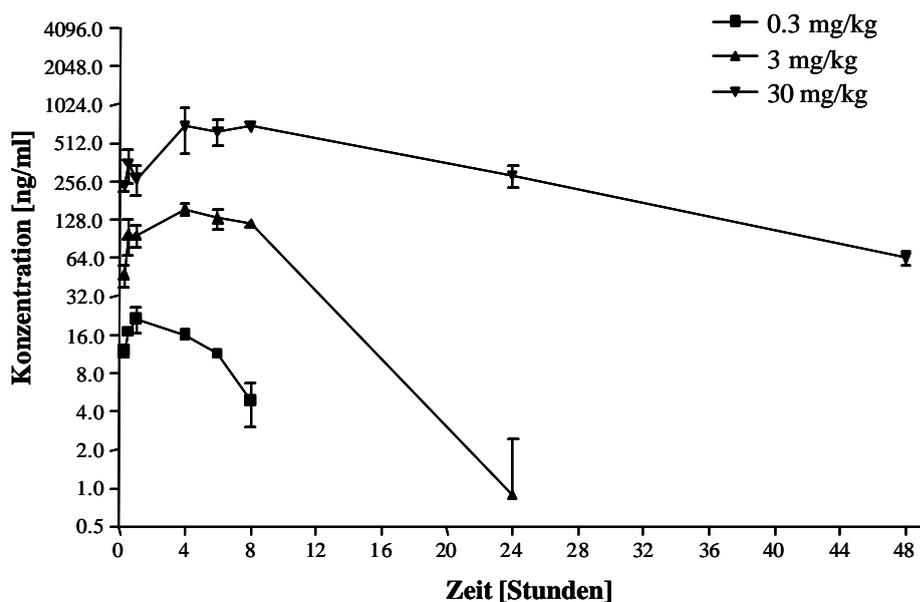


Abbildung 9: Plasmaspiegel von LF16-0687 Ms nach einmaliger subkutaner Gabe bei der Ratte; unveröffentlichte Daten, Laboratoires Fournier (Dijon, Frankreich)

LF 16-0687 Ms verhinderte effektiv die normalerweise durch Bradykinin-bedingte Freisetzung von IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub> und IP<sub>3</sub> in INT 407 Zelllinien. Die subkutane Gabe von LF 16-0687 Ms mit einer Dosis von 1,1 mol/kg konnte bei der Ratte ein durch Bradykinin-Gabe

ausgelöstes Ödem in Magen (-69%), Duodenum (-65%) und Pankreas (-56%) signifikant reduzieren [172].

Nach einmaliger subkutaner Gabe von 3 mg/kg bzw. 30 mg/kg (s.c.) wird eine maximale Plasmakonzentration von 0,2 µM bzw. 1,2 µM erreicht. Eine ausreichende Bindungsaffinität wird bei Ratten an geklonten und natürlichen B<sub>2</sub>-Rezeptoren ab einer Konzentration von 1,74 bzw. 0,28 nM erreicht (vgl. Abbildung 9).

### 1.3.6 Allgemeine Pharmakologie und Funktion

Kinine fördern die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität. Hierfür sind Ihre Einflüsse auf das Endothel und die glatte Muskulatur verantwortlich, die in Venolen und Arteriolen unterschiedlichen Mechanismen folgen [59].

Eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung führt unmittelbar in Endothelzellen von Arteriolen zu einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium, wodurch das Enzym NO-Synthase stimuliert wird. NO-Synthase katalysiert die Bildung von NO [147], welcher in die Zellen der glatten Muskulatur diffundiert und dort das Enzym Guanylatzyklase aktiviert. Guanylatzyklase fördert die Umwandlung zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus GTP, was zu einer Erschlaffung der glatten Gefäßmuskulatur der Arteriolen führt [59, 184, 199].

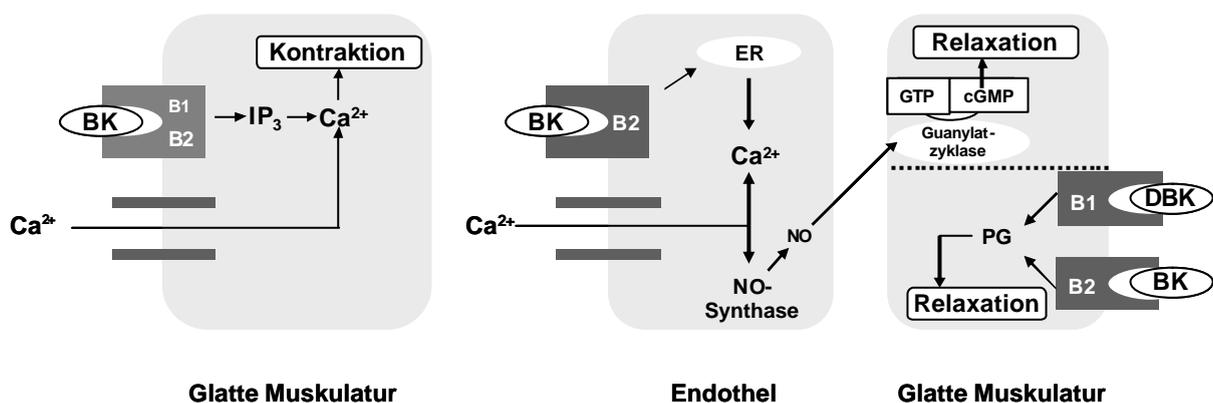


Abbildung 10: Molekulare Mechanismen an Kinin-Rezeptoren im Endothel, die zur Kontraktion und Relaxation an Zellen der glatten Gefäßmuskulatur führen nach Regoli et al. [184]

Ca<sup>2+</sup> = Kalzium, BK = Bradykinin, IP<sub>3</sub> = Inositol-(1,4,5)-triphosphat, B<sub>1</sub> = B<sub>1</sub>-Rezeptor, B<sub>2</sub> = B<sub>2</sub>-Rezeptor, GTP = Guanosintriphosphat, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, PG = Prostaglandin, DBK = des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin, ER = Endoplasmatisches Retikulum

Eine B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung stimuliert in Arteriolen die Bildung von Prostaglandinen, welche die Gefäßmuskulatur relaxieren [93, 184].

In präkapillären Venolen hingegen wird durch eine B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung eine Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskulatur und damit eine Vasokonstriktion der Venolen ausgelöst [71]. Dieser Mechanismus wird über eine GPCR aktivierte PIP<sub>3</sub>-Hydrolyse vermittelt, wodurch es zu einer intrazellulären Anhäufung von IP<sub>3</sub> kommt. IP<sub>3</sub> mobilisiert Ca<sup>2+</sup> aus seinen intrazellulären Speichern, was schließlich die Kontraktion der Venolen auslöst [184, 252].

Die von Kininen in Arteriolen und Venolen ausgelösten Mechanismen begünstigen nach Ischämie eine Plasmaextravasation und damit die Ödembildung (vgl. Abbildung 10).

Bradykinin stimuliert an sympathischen, parasympathischen und nozizeptiven Nervenenden die Bildung von Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA), welche hochpotente Schmerzmediatoren sind [36, 182, 183, 243]. SP fördert die Extravasation von Plasmabestandteilen und damit die Ödembildung [251]. Bradykinin vermittelt die Freisetzung dieser Substanzen in der Akutphase durch die Aktivierung von B<sub>2</sub>-Rezeptoren [18, 73, 219]. Bei chronischen Inflammationszuständen werden vermehrt B<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimiert, welche die Bildung von Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) fördern [41, 50].

Der Befund, dass sowohl B<sub>1</sub>- als auch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten Zymosan-induzierte Schmerzen in einem Tiermodell signifikant reduzieren bzw. rückgängig machen konnten, untermauert die Rolle von Kininen als Schmerzmediatoren [18, 29].

Kinine fördern die Migration von Zellen aus dem Blut in das Gewebe [20] und stimulieren verschiedene gewebsständige Zellen wie Mastzellen [167], Fibroblasten, Makrophagen und Zellen des Immunsystems, wie z.B. Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN), auf deren Oberfläche B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten [19, 61].

### **B<sub>2</sub>-Rezeptor (konstitutiv, v.a. akute Effekte)**

- Vasodilatation (↑Blutfluss und ↓Blutdruck)
- Venokonstriktion (Anteil an Plasmaextravasation und Ödembildung)
- Schmerzauslösung an sensorischen Neuronen
- Kontraktion von glatter Muskulatur (Darmperistaltik und Bronchokonstriktion)
- Zellmigration (Inflammation)

### **B<sub>1</sub>-Rezeptor (nach Induktion, subakut bis chronische Effekte)**

- Vasokonstriktion / Vasodilatation (je nach Stimulationsort)
- Venokonstriktion
- Schmerzauslösung an sensorischen Neuronen
- Kontraktion von glatter Muskulatur (Darmperistaltik und Bronchokonstriktion)

**Tabelle 5: Verschiedene physiologische Effekte nach B<sub>2</sub>- und B<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung, modifiziert nach Regoli et al. [185]**

Die beschriebenen pharmakologischen Effekte haben unterschiedlichen Einfluss auf einzelne Organsysteme.

#### **1.3.6.1 Kardiovaskuläres System**

Der Gefäßtonus wird durch eine Basalsekretion von relaxierenden, wie z.B. NO, und konstringierenden Faktoren, wie z.B. Noradrenalin (NA) oder Angiotensin II (AT-II), aus dem Endothel beeinflusst. NO kann zusätzlich nach Stimulation von Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptoren [80] oder als mechanische Reaktion bei erhöhtem Blutfluss freigesetzt werden.

Relaxierende und kontraktionsfördernde Faktoren stehen bei Herz- und Gefäßgesunden im Gleichgewicht [159]. Die Endothelfunktion ist aber beispielsweise bei koronarer Herzkrankheit oder essentieller Hypertonie eingeschränkt: die Sekretion von NO ist vermindert und gefäßkontrahierende Faktoren überwiegen. Die Medikamentengruppe der ACE-Inhibitoren (ACE-I) hat in den letzten Jahren die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen revolutioniert. Ihre Wirkung besteht zum einen in der Reduktion der Angiotensin-II-Konzentration, einem starken Vasokonstriktor, zum anderen in der Erhöhung der Bradykinin-Konzentration, einem wichtigen Vasodilatator in vivo (vgl. Abbildung 11) [124].

Diese Wirkung von Bradykinin als Vasodilatator konnte durch die Blockade von B<sub>2</sub>-Rezeptoren bei gesunden Studienteilnehmern mit HOE-140 und der daraus resultierenden

inhibierten Vasodilatation in Widerstandsgefäßen des Unterarms sowie in epikardialen Arterien nachgewiesen werden [80, 94]. Des Weiteren konnte in verschiedenen experimentellen Studien beobachtet werden, dass B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonismus die positiven Effekte einer verlängerten Bradykinin-Wirkung durch Hemmung von ACE signifikant abschwächt [124, 253].

ACE-I konnten bei Patienten mit essentieller Hypertonie [149], koronarer Herzerkrankung [254] und bei Diabetikern [131] äusserst günstige Langzeitergebnisse hervorbringen. Der hierfür postulierte Wirkmechanismus ist, neben der Senkung des Blutdruckes, die Verbesserung der Funktion des Endothels durch ACE-Inhibition.

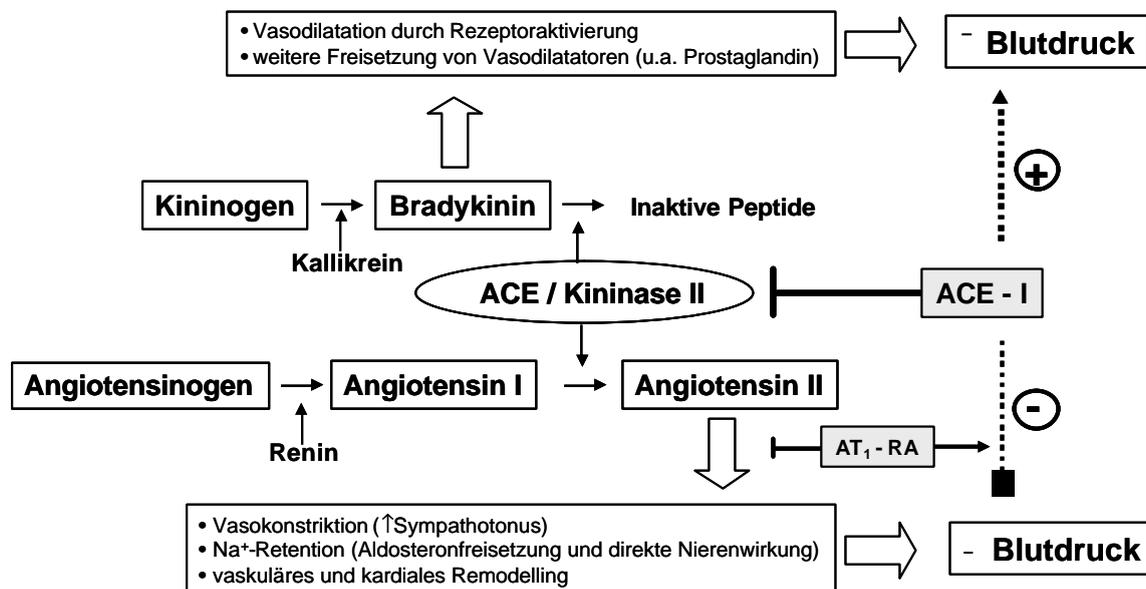


Abbildung 11: Beziehung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) zum Kallikrein-Kinin-System und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die bei Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems häufig eingesetzten ACE-Inhibitoren (ACE-I) hemmen das Enzym ACE. Sie verlängern dadurch die Wirkzeit von Bradykinin und hemmen die Bildung von Angiotensin II. Die vasopressorischen und Natrium-Retention fördernden Effekte von Angiotensin II werden dadurch verhindert. Im Endeffekt führt dies zu einer Erniedrigung des Blutdrucks (gestrichelte Linien). Bei der Herzinsuffizienz sind die blutdrucksenkenden Effekte von ACE-I wesentlich schwächer ausgeprägt, hier stehen die hemmenden Eigenschaften hinsichtlich des vaskulären und kardialen Remodellings im Vordergrund.

Häufige Nebenwirkungen von ACE-I wie trockener Reizhusten, Urtikaria und Angioödem werden durch Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt [140, 228].

Die bei etwa 30% der mit ACE-I behandelten Patienten auftretende Nebenwirkung eines nicht-produktiven Hustens wird einer erhöhten Bradykinin-Konzentration zugeschrieben. Das gilt ebenfalls für die seltener auftretenden Nebenwirkungen Urtikaria und Angioödem [228].

#### **1.3.6.2 Weitere Organsysteme**

Die im folgenden aufgeführten Kininwirkungen in verschiedenen Organsystemen sind beispielhaft in Tabelle 6 aufgeführt, auf sie wird in der weiteren Arbeit nicht detaillierter eingegangen.

<b>Lunge</b>	<b>Asthma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vor allem bei Asthmatikern hat Bradykinin (pathologische Prädisposition) eine bronchokonstriktorische Komponente [13, 167]</li> <li>- Bronchokonstriktion durch direkte lokale oder indirekte Wirkung auf Mastzellen mit konsekutiver Histaminfreisetzung [116]</li> <li>- Klinische Studie mit Icatibant zeigte positive Effekte für die Wirksamkeit der B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade, allerdings ist der Antagonist im Akutstadium nicht wirksam [5]</li> </ul>
	<b>Rhinitis</b>	Nasalsekrete von Patienten mit allergischer Rhinitis haben nach Provokation mit Antigenen oder bei symptomatischen rhino-viralen Infektionen erhöhte Konzentrationen von HMWK, LMWK, Bradykinin und Kallidin [169]
	<b>Allergie</b>	Bei Hämodialysepatienten, bei denen eine Polyacrylonitril AN69 Membran verwendet worden ist, konnten anaphylaktische Reaktionen beobachtet werden, die als Folge einer Kinin-induzierten Vasodilatation und Angioödem durch Kontaktaktivierung mit Faktor XII entstanden sind [234]
<b>Niere</b>	<b>RBF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erhöhung des renalen Blutflusses durch Erhöhung des elektrogenen Chlorid-Transportes im Sammelrohr durch Stimulation der Rezeptoren an der basolateralen Tubulusoberfläche</li> <li>- Diuretische Effekte von Furosemid (Schleifendiuretikum) und der Einfluss von ACE-I auf die Natrium (Na<sup>+</sup>) und Wasserkonzentration werden durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten signifikant verringert [132]</li> </ul>
<b>Stoffwechsel</b>	<b>Zelle</b>	Bradykinin erleichtert die Translokations von GLUT-1 und GLUT-4 Transportern, damit verbesserte Glucoseaufnahme in die Zelle [190].
	<b>Muskel</b>	Verbesserung der endogenen Glucoseaufnahme in das Muskelgewebe im menschlichen Muskelquetschmodell durch ACE-Inhibition und damit vermehrter B <sub>2</sub> -Rezeptor-Stimulation [44]
<b>Knochen</b>	<b>Entzündung</b>	Proinflammatorische Rolle bei der rheumatoiden Arthritis [20]
	<b>Stoffwechsel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bradykinin induziert PIP<sub>2</sub> -&gt; Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> und Synthese von PGE<sub>2</sub> durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation bei Osteoblasten [119]</li> <li>- Vor allem junge Osteoblasten reagieren sensibel auf eine Stimulation mit Bradykinin. Abnahme dieser Empfindlichkeit mit zunehmenden Alter der Zellen [249]</li> </ul>
<b>Sekretionsdrüsen</b>	<b>TK/Aprotinin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis von Tissue Kallikrein in Speichel- und Schweißdrüsen [20]</li> <li>- Einsatz von Aprotinin (Protease-Inhibitor von Plasma und Tissue Kallikrein) bei der Behandlung von Sialadenitiden (Stimulation der pathologisch verminderten Speichelsekretion) [22]</li> </ul>
<b>Fortpflanzung</b>	<b>männlich</b>	Erhöhung der Spermienmotilität und -genese, vermutlich B <sub>2</sub> -Rezeptor vermittelt [198]
	<b>weiblich</b>	Uteruskontraktion: besonders hohe Empfindlichkeit auf B <sub>2</sub> -Rezeptor-Stimulation [20]
<b>Gastro-Intestinal</b>	<b>Ösophagus-CA</b>	Wichtige Rolle von Bradykinin bei der Tumormetastasierung und -genese (erhöhte vaskuläre Permeabilität), Tissue Kallikrein und B <sub>2</sub> -Rezeptoren: Nachweis in Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus [49]
	<b>Pankreatitis</b>	Tiermodell der Pankreasischämie: B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisierung (CP-0597) verhindert morphologische oder klinische Schadensparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe [92]

**Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Wirkung von Kininen in verschiedenen Organsystemen**

### **1.3.6.3 Trauma, Sepsis**

Im Rahmen von Traumata konnte in verschiedenen Studien eine lokale oder systemische Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems nachgewiesen werden. Dies konnte bei Thoraxtraumen, im Rahmen des Akuten Respiratorischen Atemnot Syndroms (ARDS), bei Schädel-Hirn-Trauma und bei Studien, die sich mit dem systemischen inflammatorischen Reaktionssyndrom (SIRS) beschäftigten, nachgewiesen werden [58, 192].

### **1.3.7 Spezielle Funktion und Pharmakologie im Zentralen Nervensystem**

Die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems bei pathologischen Zuständen im Zentralen Nervensystem (ZNS) wurde von der Arbeitsgruppe um Baethmann et al. in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts gezeigt. In drei richtungweisenden Studien wurden die Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems nacheinander untersucht [135, 230, 231]. Zunächst wurden die Ventrikelsysteme von Hunden mit Plasma oder Bradykininlösung perfundiert und anschließend der zerebrale Wasser- und Elektrolytgehalt ermittelt. Bei Perfusion mit Plasma konnte ein signifikanter Kininogenverbrauch nachgewiesen werden, Perfusion mit Bradykinin führte zu der Entwicklung eines Hirnödems. In zwei Versuchen konnte als mögliches Zeichen einer zytotoxischen Reaktion des Hirngewebes nach Bradykininadministration eine Erhöhung des Glutamatspiegels gemessen werden [230]. In der nächsten Versuchsreihe wurde mittels fokaler Kälteläsion ein vasogenes Hirnödem verursacht. Im Bereich des nekrotischen und perifokal ödematösen Gewebes kam es zu einer Erhöhung von Kininogenen, die durch die nachfolgende zerebrale Ischämie verstärkt wurde. Es wurde daraus geschlossen, dass in Bereichen einer Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), es zu einer Extravasation von Plasmabestandteilen mit nachfolgender Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems kommt [135]. In der dritten Studie wurde schließlich in einem Kaninchenmodell nach fokaler Kälteläsion 15 Minuten (min) nach Trauma bis einschließlich zum Versuchsende nach 24 h kontinuierlich intravenös entweder Aprotinin, Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) oder beide in Kombination gegeben. SBTI ist ein Inhibitor des Plasma Kallikreins. Nach beiden Infusionen wurde eine signifikante Verminderung der postraumatischen Hirnschwellung beobachtet; nicht jedoch bei Gabe von SBTI alleine. Beide Substanzen alleine oder in Kombination hatten keinen Einfluss auf den systemischen Blutdruck [231].

Diese Untersuchungen gaben den Ausschlag für weitere Studien über die Funktion des Kallikrein-Kinin-Systems bei Erkrankungen des ZNS.

### 1.3.7.1 Identifikation im ZNS

Sämtliche Bestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems wurden im ZNS bei verschiedenen Spezies identifiziert. Von besonderem Interesse in dieser Arbeit war das Vorhandensein des Kallikrein-Kinin-Systems bei Ratte [32] und Mensch [163], um die in der Studie bei der Ratte gesammelten Ergebnisse auf den Menschen übertragen und für weitere experimentelle bzw. klinische Untersuchungen verwenden zu können.

Konzentrationen von Bradykinin, Kallidin [106], Tissue Kallikrein [107, 177] und Plasma Kallikrein [230, 231] konnten im Gehirn nachgewiesen werden. Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren konnten im Gehirn bei Maus [6], Ratte [32] und Mensch [91, 134, 168] identifiziert werden.

B<sub>2</sub>-Rezeptoren sind auf gezüchteten Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia nachgewiesen worden [35, 74, 95, 154]. Funktionelle in vitro und in vivo Bindungsstudien konnten den B<sub>1</sub>- [168] und B<sub>2</sub>-Rezeptor auf zerebralen endothelialen Zellen lokalisieren [178, 232, 241, 242, 247]. Eine konstitutive Expressierung von B<sub>2</sub>-Rezeptoren im Gehirn konnte für Neurone des Kortex und Striatums bestätigt werden [32, 176, 177, 223]. Beide Regionen sind von einem neuronalen Schaden nach fokaler zerebraler Ischämie betroffen.

### 1.3.7.2 Interaktionen im ZNS

Bradykinin erhöht die Permeabilität zerebraler Mikrogefäße und führt im ZNS zu einer Vasodilatation, welche durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung vermittelt wird [180, 240]. Neben zerebraler Ischämie und Schädel-Hirn-Trauma konnte dieser Einfluss des Kallikrein-Kinin-Systems im ZNS sowohl bei astrozytischen Tumoren als auch bei Rückenmarksquerschnittslähmungen nachgewiesen werden.

Im Randgebiet astrozytischer Tumore [179] und Gliome [229] konnte eine erhöhte Anzahl von B<sub>2</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden. In einer Studie von Liu et al. konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Anzahl an B<sub>2</sub>-Rezeptoren mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn bzw. Blut-Tumor-Schranke korrelierte [126].

B<sub>2</sub>-Rezeptoren werden innerhalb der ersten sieben Tage nach Rückenmarkstrauma vermehrt in Hinterstrangganglien des Rückenmarks exprimiert [117]. Die Gabe von Bradykinin-

Antagonisten führt zu einem verminderten Ausmaß des Zusammenbruchs der Blut-Rückenmarks-Schranke nach experimentellem Rückenmarkstrauma [160].

Bei Entzündungsprozessen im ZNS, wie z.B. der Multiplen Sklerose, werden nach Aktivierung von B<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Akutphase der Inflammation, in der chronischen Phase B<sub>1</sub>-Rezeptoren hochreguliert, welche nach Aktivierung mit Rezeptorantagonisten die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch Freisetzung von IP<sub>3</sub> und NO erhöhten [41, 168].

Die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Parkinson-Erkrankung [25] oder der Alzheimer-Demenz [100] wird noch weiter untersucht.

### 1.3.7.3 Neuroprotektion

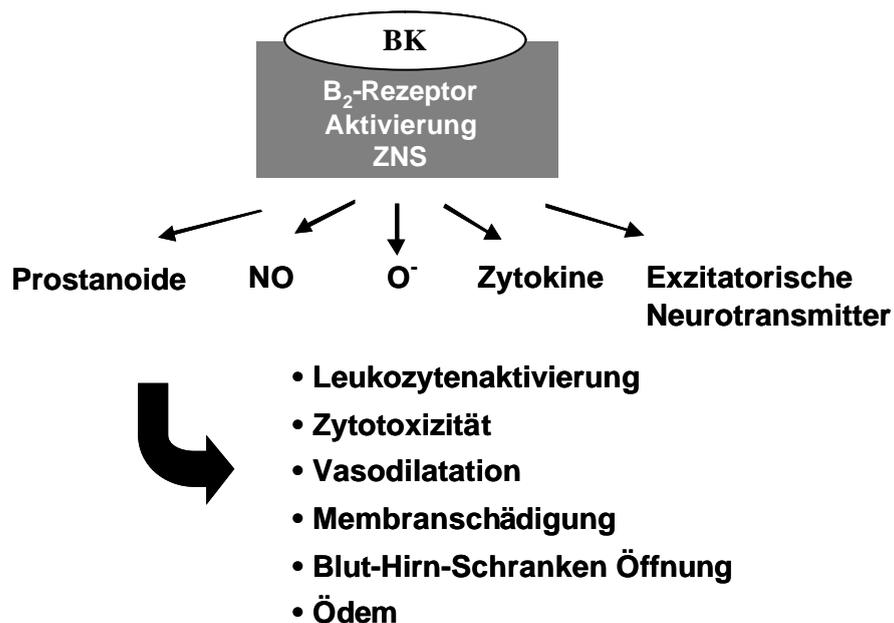


Abbildung 12: B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung im ZNS [243]

In den letzten Jahren hat sich die Forschung bei der Erprobung neuroprotektiver Substanzen hauptsächlich auf die Hemmung des zellulären Schadens und Reduktion des zytotoxischen Hirnödems konzentriert. Nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich mit der Eindämmung des Blut-Hirn-Schranken-Schadens und vasogenen Hirnödems.

Bradykinin ist ein hochpotenter Mediator des vasogenen Hirnödems [12, 135, 230, 231, 239, 248]. Eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung im ZNS führt über spezies- und lokalisationsabhängige, verschiedene Mechanismen [240] zu Vasodilatation [55, 101, 232, 241] und erhöhter Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität [166, 189, 222]. Diese Veränderungen nach B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung werden unter anderem durch Freisetzung von

- Prostaglandinen und Leukotrienen bei Hasen [101], Katzen [112] und Ratten [51]
- NO bei Ratten [77], bei Mensch und Hase [82], bei Hunden [184]
- reaktiven Sauerstoffmolekülen bei Ratten [218] und Mäusen [194]

verursacht.

Bradykinin bewirkt in vitro in neokortikalen Astrozyten eine intrazelluläre Kalziumerhöhung in Neuronen durch Glutamatfreisetzung [161]. Glutamat ist ein exzitatorischer Neurotransmitter, der bei zerebraler Ischämie extrazellulär toxisch akkumuliert und nach Rezeptorbindung (NMDA, AMPA- und Kainat-Rezeptoren) die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht [27, 46, 195, 214].

Als Antwort auf einen Zellschaden werden vermehrt chemotaktische Mediatoren gebildet, die Leukozyten anlocken. In der Umgebung entzündlicher Gewebe wurde bereits in der Vergangenheit eine erhöhte Kininogenaktivität festgestellt [19, 60, 61]. Nach zerebraler Ischämie erhöht Bradykinin die Leukozyten-Endothel-Interaktion und reduziert die zerebrale Mikrozirkulation. Eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade vermindert signifikant die Leukozyten-Aktivierung und postischämische Vasokonstriktion nach globaler zerebraler Ischämie in Wüstenmäusen [118].

Ein Teil der inflammatorischen Reaktion von Bradykinin im ZNS wird durch die Expression von Interleukin-6 (IL-6) verursacht [212]. IL-6 fördert das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen sowie die Regeneration von Neuronen im ZNS [139].

Man geht davon aus, dass die von Bradykinin vermittelten Mechanismen, die zu einer Blut-Hirn-Schranken-Schädigung führen, durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung eingeschränkt werden. Die Hemmung von konstitutiven B<sub>2</sub>-Rezeptoren wirkt daher neuroprotektiv [64].

### 1.3.7.4 Schädel-Hirn-Trauma (SHT)

Die experimentellen Studien in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten erstmals die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems bei Schädel-Hirn-Trauma (SHT) auf [54, 135, 230, 231]. Erst mit der Entwicklung von selektiven Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden Untersuchungsansätze ermöglicht, welche sich mit den nach Rezeptor-Aktivierung ausgelösten Mechanismen befassen.

Die subkutane Bolusgabe von dem B<sub>2</sub>-Rezeptor Peptid-Antagonist HOE-140 vor fokaler Kälteläsion gefolgt von einer kontinuierlichen subkutanen Applikation über 24 h mittels osmotischer Minipumpen führte zu signifikant geringerem Läsionsvolumen und verminderter Hirnschwellung bei Ratte und Maus. Die mit dem gleichen Versuchsaufbau durchgeführte alleinige Applikation von B 9858, einem B<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten, hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zielparameter Ödemausmaß und Hirnwassergehalt im Vergleich zu der Kontrollgruppe [76].

Die Ergebnisse von experimentellen Studien in verschiedenen Versuchsmodellen, die mit LF 16-0687 Ms, einem Nicht-Peptid B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, durchgeführt worden sind, sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Modell	Applikation	Ergebnis
Cortical Impact (geschlossenes SHT, Ratte)[170]	i.v. über 23 h, Infusionsstart 1 h nach Trauma	Hemmung der Ödembildung, verbessertes neurologisches Outcome
Cortical Impact (geschlossenes SHT, Ratte)[175]	i.v. über 2 h und 24 h, Infusionsstart 15 min vor Trauma	Hemmung der Ödembildung, verbessertes neurologisches Outcome
Cortical Impact (offenes SHT, Ratte)[222]	subkutan, einfache Gabe 5 min nach Trauma	Hemmung der Ödembildung
Cortical Impact (geschlossenes SHT, Maus) [233]	subkutan, einfache Gabe 30 min nach Trauma	Hemmung der Ödembildung
Fokale Kälteläsion (Ratte) [166]	i.v. über 24 h, Infusionsstart 15 min vor Trauma und Infusionsstart 30 min und 60 min nach Trauma	Hemmung der Ödembildung bei Vorbehandlung, kein Effekt bei Nachbehandlung

Tabelle 7: LF 16-0687 Ms in der experimentellen Forschung bei Schädel-Hirn-Trauma

Übereinstimmend konnte herausgefunden werden, dass bei Gabe vor Trauma-induktion von LF 16-0687 Ms die Ausbildung des Ödems im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen signifikant verringert werden konnte. Eine Applikation nach Induktion des Traumas hatte keinen signifikanten protektiven Effekt [166].

In den Jahren 1998 und 1999 wurden erstmals klinische Studien bei SHT durchgeführt, bei denen die neuroprotektive Wirksamkeit einer B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung untersucht wurden.

Narotam et al. konnte bei einem Kollektiv von 20 Patienten folgenden positiven Trend von CP-0127 (Bradycor), einem Peptid-B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, herausarbeiten: mit dem Antagonisten behandelte SHT-Patienten hatten einen geringeren Bedarf an neurochirurgischen Interventionen [151].

Die Studie von Marmarou et al., an der 31 nordamerikanische Neurotraumazentren beteiligt waren, untersuchte die Wirkung von CP-0127 bei 129 Patienten nach SHT mit einem Glasgow-Coma-Score (GCS) zwischen drei und acht Punkten. Die intravenöse Applikation von CP-0127 wurde innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Trauma eingeleitet und kontinuierlich über fünf Tage fortgesetzt. Mit CP-0127 behandelte Patienten hatten prozentual weniger Phasen mit intrakraniellen Druckverläufen über 15 mmHg (signifikant am vierten und fünften Tag der Behandlung), eine geringere Mortalität nach 28 Tagen und ein verbessertes neurologisches Outcome, ermittelt durch den Glasgow-Outcome-Scale nach drei und sechs Monaten [138].

### **1.3.7.5 Schlaganfall**

Kamiya et al. untersuchten 1993 erstmals die Hemmung des Kallikrein-Kinin-Systems in einem Tiermodell bei globaler zerebraler Ischämie. Dafür applizierten sie SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor) und Aprotinin intravenös vor Beginn einer dreistündigen bilateralen Ligatur der Arteria Carotis Communis bei spontan hypertensiven Ratten (SHR). SBTI ist ein Inhibitor von Plasma Kallikrein, Aprotinin hemmt sowohl Plasma Kallikrein als auch Tissue Kallikrein. Bei beiden therapierten Gruppen konnte eine signifikante Hemmung der Ödembildung beobachtet werden. Ein hoher Kinin-Spiegel korrelierte dabei deutlich mit einer ausgeprägten Ödembildung [102].

Die bisher einzige Arbeit zur Wirkung der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade bei fokaler zerebraler Ischämie wurde 1997 von Relton et al. publiziert. Sie verwendeten den peptidischen B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0597. Mittels eines Fadenmodells wurde bei Sprague-Dawley Ratten eine einstündige Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert.

Kurz nach Ischämiebeginn wurden osmotische Minipumpen implantiert, die das Medikament über die nächsten 24 h kontinuierlich subkutan abgaben. Nach 24 h konnte eine signifikante Hemmung der Ödembildung und eine verbesserte funktionelle neurologische Erholung nachgewiesen werden [189]. Die im Anschluss durchgeführten Versuchsreihen untersuchten die Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten HOE-140 und NPC 17731. Die Ergebnisse waren mit denen von CP-0597 aus der Vorstudie vergleichbar. Bei allen Stoffen handelt es sich um Peptid-Antagonisten, es konnte kein Einfluss auf physiologische Kontrollparameter festgestellt werden [187].

Lehmberg et al. untersuchten die Rolle der Leukozyteninteraktionen nach globaler zerebraler Ischämie von 15 min Dauer bei Wüstenrennmäusen und konnten bei Tieren, die mit einem B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>- oder mit einem B<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden, eine signifikant höhere Mortalität als bei Tieren nachweisen, die den B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten CP-0597 erhielten [118].

In klinischen Forschungsarbeiten konnte ein erhöhter Kininogen-Verbrauch im Gefäßbett nach temporärer zerebraler Ischämie im Rahmen neurochirurgischer Operationen [136] nachgewiesen werden. Die Kallidin-Konzentration im peripheren Blut von Schlaganfallpatienten ist im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht [236].

## 1.4 Ziel dieser Untersuchung

Der ischämische Schlaganfall ist eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Behinderungen in der westlichen Welt – entsprechend nimmt die gesundheitliche und volkswirtschaftliche Bedeutung dieser Erkrankung einen hohen Stellenwert ein.

Eine große Anzahl experimenteller und klinischer Studien befasste sich in den letzten Jahren mit verschiedenen Mechanismen zur Neuroprotektion, konnte aber die in der experimentellen Forschung erbrachten Ergebnisse in der Klinik nicht bestätigen.

Für die mögliche spätere Anwendbarkeit in der Klinik müssen an neuroprotektive Medikamente folgende Anforderungen gestellt werden:

- Therapeutische Wirksamkeit
- Geringe Neben- und Wechselwirkungen
- Ergänzung des derzeitigen oder Etablierung eines neuen Therapiestandards.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die therapeutische Wirkung der Blockade des Kallikrein-Kinin-Systems mittels Antagonisierung des Bradykinin  $B_2$ -Rezeptors mit einem Nicht-Peptid Antagonisten in einem Tiermodell der temporären fokalen zerebralen Ischämie zu untersuchen und dabei seine prä- und postischämischen Effekte und möglichen Wirkmechanismen zu erforschen.

Um die Auswirkungen einer Bradykinin  $B_2$ -Rezeptorblockade quantitativ zu erfassen, wurde ein chronisches Tierversuchsmodell der fokalen zerebralen Ischämie gewählt, welches in den letzten Jahren von unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde und die Erfassung folgender Parameter ermöglicht:

1. Quantifizierung der funktionellen Entwicklung der Versuchstiere durch regelmäßige Untersuchung
  - der neurologischen Erholung mittels eines standardisierten Neuroscores,
  - der Gewichtsentwicklung,
  - der Beobachtung von Verhaltensauffälligkeiten.
2. Quantifizierung der Hirnschwellung und des Wassergehaltes des Gehirns durch gravimetrische Bestimmung des Feucht-Trocken-Gewichtes

3. Quantifizierung des Gewebeschadens der betroffenen Hirnareale durch histologische Aufbereitung und mikroskopische Auszählung der Nervenzellen.

## 1.5 Fragestellung

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand die Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors mittels eines neuen Nicht-Peptid-Antagonisten und dessen Wirkung bei der zerebralen Ischämie.

Es galt somit folgende Fragen zu beantworten, die thematisch aufeinander aufbauten:

1. Ist der Nicht-Peptid Antagonist LF 16-0687 Ms in einem Tiermodell der temporären fokalen zerebralen Ischämie neuroprotektiv wirksam?
2. Kommt es zu einer Hemmung der ischämischen Hirnödembildung?
3. Gibt es einen optimalen Dosisbereich, in dem der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist wirkt, und ist dieser auch nach Ischämie wirksam?

## **2 Material und Methoden**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern im Zeitraum von 1999 bis 2002 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians Universität München.

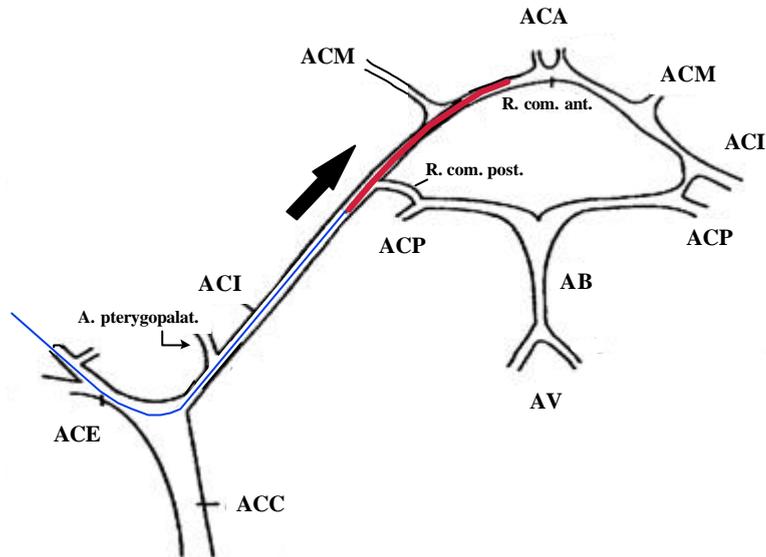
### **2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 240 und 300 g verwendet. Die Tiere stammten aus etablierten Züchtungen (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland). Nach Anlieferung wurde an den Tieren innerhalb von zehn Tagen der mikrochirurgische Eingriff durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen bei 22°C Raumtemperatur und 60 % Luftfeuchtigkeit mit zwölf Stunden Hell-/Dunkelrhythmus. Trockenfutter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Das Futter wurde zwölf Stunden vor Versuchsbeginn entzogen, die Tiere hatten nach wie vor freien Zugang zum Wasser. Nach Ende der Operation wurde den Tieren in Einzelhaltung erneut freier Zugang zu Futter und Wasser gewährt.

### **2.2 Intraluminales Fadenmodell**

Das intraluminale Fadenmodell zur Induktion einer fokalen Ischämie wurde erstmals im Jahre 1986 von Koizumi et al. [109] publiziert. Zwischenzeitlich wurden unter anderem von Zea Longa et al. [129] und unserer Arbeitsgruppe [209, 256] verschiedene Modifikationen vorgenommen. Das Fadenmodell hat sich zu einer anerkannten und weit verbreiteten Methode entwickelt, um pathophysiologische sowie therapeutische Fragestellungen bei permanenter oder transientser fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen.

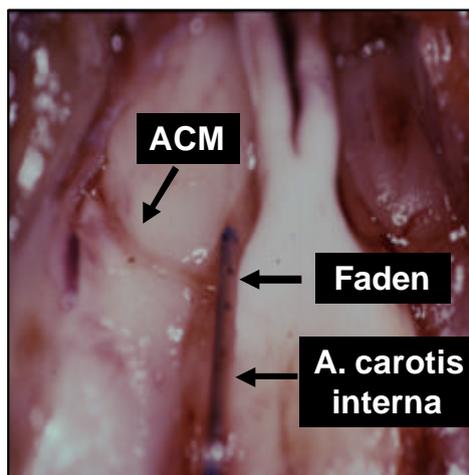
Das Prinzip dieser Technik beruht in der intraluminalen Blockade des Blutflusses in die A. cerebri media. Dies wird erreicht, indem ein in den distalen fünf Millimetern mit Silikon beschichteter Nylonfaden in die A. carotis interna mikrochirurgisch eingeführt wird und im Gefäßlumen nach intrakraniell vorgeschoben wird, bis er den Ursprung der A. cerebri media (MCA) verlegt. Die Blutzufuhr der MCA aus der A. carotis interna, A. cerebri anterior und A. cerebri posterior ist damit unterbrochen. Durch das Zurückziehen des Fadens wird die Reperfusion eingeleitet.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Circulus Willisii und Okklusion der A. cerebri media.

Ein 4-0 Prolene-Faden wird über die A. carotis externa in die A. carotis interna eingeführt und vorgeschoben bis sein distales, silikonbeschichtetes Ende den Abgang der A. cerebri media verschließt. Die Kollateralzirkulation über die A. communicans anterior und posterior ist ebenfalls ausgeschaltet.

A. pterygopalat. = Arteria pterygopalatina  
 AB = Arteria basilaris  
 ACA = Arteria cerebri anterior  
 ACC = Arteria carotis communis  
 ACE = Arteria carotis externa  
 ACI = Arteria carotis interna  
 ACM = Arteria cerebri media  
 ACP = Arteria cerebri posterior  
 AV = Arteria vertebralis  
 R. com. ant. = Ramus communicans anterior  
 R. com. post. = Ramus communicans posterior



**Abbildung 14:** Postmortale Aufnahme

Der Faden verlegt den Abgang der A. cerebri media (ACM) aus der A. carotis interna. Im Hintergrund kommt der Nervus opticus (I) zur Darstellung.

## **2.3 Narkose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 4 Vol. % Halothan in einem luftdicht geschlossenen Plexiglaskäfig. Die Tiere wurden anschließend bei ausreichender Narkosetiefe mit 0,5 mg/kg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg, Braun AG, Deutschland) subkutan prämediziert und unter mikroskopischer Sicht (OPMI 6-SH, Zeiss AG, Deutschland) orotracheal intubiert.

Als Tubus diente eine Venenverweilkanüle (Vasculon Plus, 16 G, BOC Ohmeda AB, Dänemark). Die Kanüle wurde in der Vorbereitungsphase des Versuchs in 2,5 cm Entfernung von der Spitze außen mit einem Silikonkonus (Durchmesser 5 mm) (Rhodorsil RTV 1556 A und B Pink, Rhône Poulenc, Frankreich) ummantelt. Dieser Silikonkonus gewährleistete einen suffizienten Verschluss der Glottis und verbesserte die Qualität der Beatmung.

Die Narkose wurde mit 0,8 % Halothan in 70 % Lachgas ( $N_2O$ ) und 30 % Sauerstoff ( $O_2$ ) unter kontrollierter Beatmung bei einer Frequenz von 100 - 110 Hüben pro Minute und einem maximalen inspiratorischen Druck von 10-13 cm  $H_2O$  aufrechterhalten (Pressure Controlled Respirator, RSP 1102, Kent Scientific Corporation, USA). Eine kontrollierte mechanische Ventilation ist der Spontanatmung in Tierexperimenten überlegen, da sie kontrollierte Versuchsbedingungen mit einer ausreichenden Analgesie schafft und damit vergleichbare Ergebnisse produziert [255].

## **2.4 Physiologische Kontrollparameter**

Zur Blutdruckkontrolle, Bestimmung der Blutgase sowie weiterer Laborwerte wurde ein Katheter in der Schwanzarterie implantiert.

### **2.4.1 Blutdruck**

Während der Versuchsphase am Operationstag wurde eine kontinuierliche Blutdruckaufzeichnung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,58 mm) (Portex Co, England) in die Schwanzarterie eingeführt und an einen Druckwandler angeschlossen. Mit dem Blutdruckmessgerät (Sirecust 304 D, Siemens, Deutschland), welches regelmäßig vor Versuchsbeginn einer Zweipunkt-Eichung unterzogen wurde, wurde der mittlere arterielle Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet. Der Katheter

wurde während des gesamten Versuchs mit physiologischer Kochsalzlösung (0,2 ml/h) gespült, um eine Verlegung des Lumens zu vermeiden.

#### **2.4.2 Arterielle Blutgasanalyse, Glukose und Laktat**

Die Regulation der Blutgasparameter wurde durch regelmäßige Kontrollen mit Hilfe eines Blutgas-Analysegerätes gewährleistet, das gleichzeitig mit derselben Probe die Messung von Glukose und Laktat erlaubte (Chiron Diagnostics, L-057390). Der Blutverlust konnte damit so gering wie möglich gehalten werden. Regelmäßige Blutgaskontrollen erlaubten eine Anpassung der kontrollierten mechanischen Beatmung.

Das arterielle Blut wurde über eine Kapillare an dem in der Schwanzarterie liegenden Polyethylenkatheter entnommen. Die Blutwerte wurden intraoperativ jeweils vor, während und nach Ischämie überprüft. Dadurch sollten auch eventuelle Beeinflussungen des Glukose und Laktatspiegels durch das Medikament erfasst werden.

Um einer Thrombosierung des durchspülten arteriellen Katheters und vor allem der A. cerebri media, die in der Literatur gelegentlich im Fadenmodell bei Ischämiedauer von über zwei Stunden andauernden fokalen zerebralen Ischämien beobachtet wird, vorzubeugen, verwendeten wir eine perioperative Thromboseprophylaxe mittels Heparin, die jeweils einmal zum Zeitpunkt der Okklusion und in der ischämischen Zwischenphase nach einer Okklusionsdauer von 60 min appliziert wird [142, 174].

#### **2.4.3 Hämoglobin und Hämatokrit**

Neben der Blutgasanalyse wurden vor und nach Ischämie Probenentnahmen zur Messung von Hämoglobin und Hämatokrit durchgeführt (Coulter L-055268). Diese Messung ist erforderlich, um Auswirkungen auf die Ergebnisse der Studie durch

- eine mögliche Hämodilution
- einen unter Umständen operativ bedingten verstärkten Blutverlust
- einen möglichen Effekt durch das Medikament

beurteilen zu können.

#### **2.4.4 Temporale und rektale Temperatur**

Da die intrakranielle mit der im M. temporalis gemessenen Temperatur korreliert [26], wurde ein in eine Kanüle eingelötetes Miniaturmantelthermoelement (AB Ac 025/TI/335/D 40/2 AB

K/2 m, THERMOCOAX, Philips Industrial Electronics GmbH, Deutschland) im M. temporalis platziert. Dieses Temperaturmesser steuerte über ein Regelkreis eine Heizlampe, die auf den Kopf der Versuchstiere gerichtet war. Dies ermöglichte, ohne Eröffnung der Kalotte oder Verletzung des Gehirns, die intrakranielle Temperatur zu kontrollieren.

Eine rektale Temperatursonde wurde mit einem Modul verbunden, welches die Temperatur der Wärmeplatte, auf der die Tiere während des Versuchs gelagert waren, entsprechend dem eingestellten Sollwert regelte. Über unabhängige Regelkreise (Industrial Controller Version 407, Philips Prozess- und Maschinen-Automation GmbH, Deutschland) wurden also die Körperkerntemperatur als auch die Hirntemperatur konstant bei 37,0°C gehalten.

#### **2.4.5 Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)**

Zur Messung des kortikalen Blutflusses (LCBF) wurde die Technik der Laser-Doppler Fluxmetrie verwendet.

Nach medialer Inzision der Kopfhaut wurden zwei Trepanationslöcher von ein bis zwei Millimeter Durchmesser, jeweils fünf Millimeter lateral und einem Millimeter dorsal des Bregmas, über dem somatosensorischen Kortex ohne Verletzung der Dura mater gebohrt. Dieses Areal repräsentiert das Versorgungsgebiet der A. cerebri media [47]. Die Versuchstiere wurden anschließend in ihrer endgültigen Position mittels stereotaktischer Halterung unter Schonung der Trommelfelle fixiert (Model 900, David Kopf Instruments, USA). Zwei abgewinkelte Sonden (Spezialanfertigung, Medizintechnik Lawrenz, Deutschland) für die Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) wurden in den Bohrlöchern so platziert, dass sie vorsichtig auf der Dura auflagen, ohne das umliegende Gewebe zu komprimieren (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 16).

Dieses Manöver wurde unter Sicht durchgeführt. Um artifizielle Lichtspiegelungen zu vermeiden, wurde der Kopfbereich der Ratten und die Sonden mit lichtundurchlässigem Stoff abgedeckt. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte eine kontinuierliche Messung (2 Hz) des LCBF in beiden Gehirnhemisphären (MBF3D, Moor Instruments Ltd., England) [206].

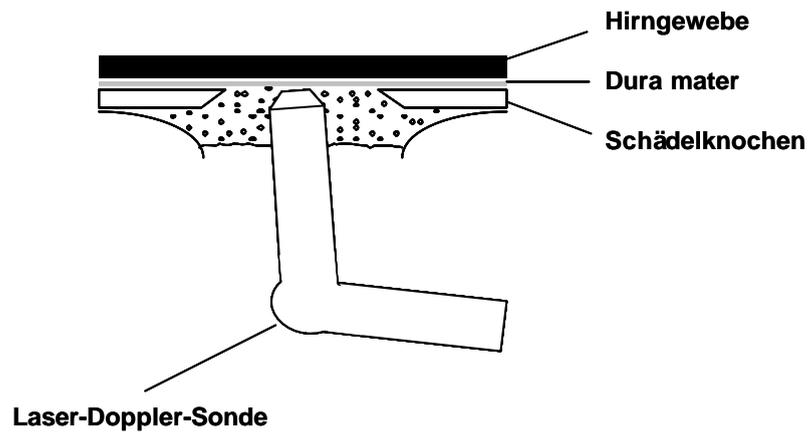


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer abgewinkelten LDF-Sonde, die vorsichtig der Dura aufliegt

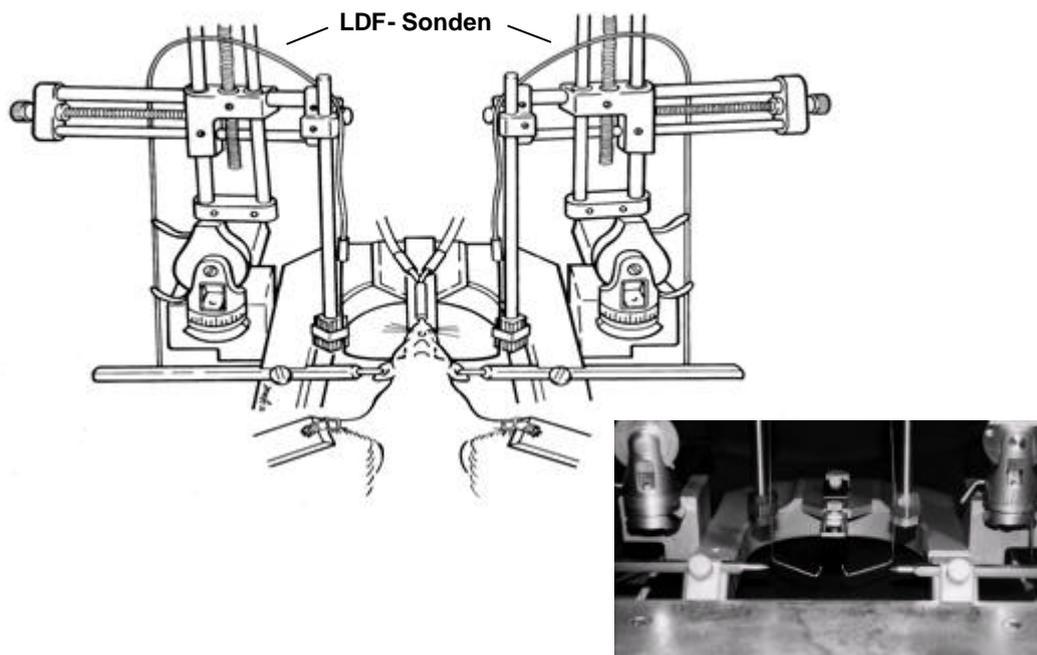
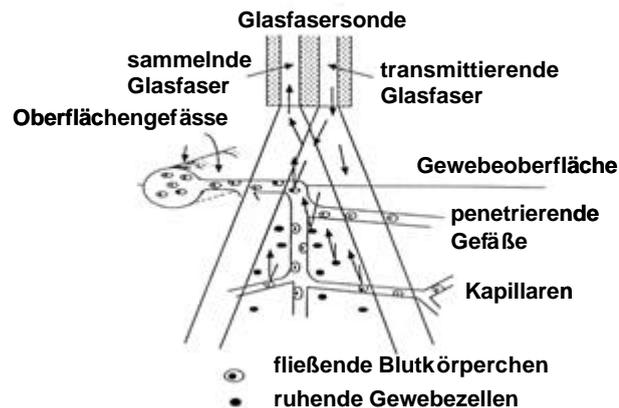


Abbildung 16: Versuchsaufbau

Die Versuchstiere werden in Rückenlage im stereotaktischen Rahmen fixiert. Zwei abgewinkelte Laser-Doppler-Fluxmetrie Sonden (LDF-Sonden) werden mit Hilfe von Mikromanipulatoren platziert. Unten rechts ist ein Foto des stereotaktischen Rahmens und den LDF-Sonden ohne Versuchstier abgebildet.

Bei der Laser-Doppler-Fluxmetrie macht man sich den Doppler-Effekt zunutze:

Das ausgesandte Laserlicht wird von sich bewegenden Objekten mit einer Änderung der Frequenz reflektiert, von sich nicht bewegenden Objekten ohne Änderung der Frequenz. Fließende Zellen, vor allem Erythrozyten reflektieren Licht mit einem Frequenzsprung, ruhende Gewebebestandteile ohne Frequenzsprung [65]. Die Größe des Frequenzsprungs ist abhängig von der relativen Geschwindigkeit des Objekts zur Strahlungsquelle.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Laser-Doppler-Sonde, des Strahlengangs, der Hirnoberfläche und der kortikalen Mikrozirkulation nach Borgos [24]**

Die Brechungswinkel des von den Gewebebestandteilen gestreuten Lichts und die Geschwindigkeiten der fließenden Zellen verteilen sich über ein Spektrum, dessen Bandbreite proportional zur mittleren Geschwindigkeit der Zellen ist. Die Amplitude des Spektrums gibt also Auskunft über den Volumenanteil der fließenden Zellen im Gewebe. Daraus lassen sich die Parameter Geschwindigkeit und Volumen der sich bewegenden Blutzellen definieren und willkürlich skalieren. Der Laser-Doppler-Flux wird aus dem Produkt dieser beiden Parameter errechnet:

$$\text{Flux} = \text{Volumen} \times \text{Geschwindigkeit}$$

Das elektrische Signal des Photodetektors wurde von einem Analog- und Digitalprozessor weiterverarbeitet. Mit der Systemsoftware (Moorsoft, MBF3D, Moor Instruments Ltd., England) war die Berechnung der drei Größen möglich, die Ausgabe erfolgte grafisch auf einem Bildschirm.

Durch den Abfall des Laser-Doppler-Flux (willkürliche Einheit) konnte die Induktion der Ischämie kontrolliert werden, relative Veränderungen der lokalen Durchblutung in der postischämischen Hyper- und Hypoperfusionsphase oder durch die Wirkung von Pharmaka wurden dadurch objektivierbar. Subarachnoidalblutungen (SAB), die durch intrakranielle Gefäßperforation zustande kamen, konnten sofort identifiziert werden. Diese Tiere wurden aus der Studie ausgeschlossen. Eine insuffiziente Gefäßokklusion, die häufigste methodische Komplikation in diesem Modell, konnte noch vor ihrer vollen Ausprägung innerhalb von Sekunden erfasst und korrigiert werden.

## **2.5 Präparation**

Der Zugang zum Karotisdreieck am Hals erfolgte über einen paramedianen Hautschnitt und die Durchtrennung des Platysmas. Die oberflächlich liegende Glandula submandibularis wurde zusammen mit dem M. sternocleidomastoideus nach lateral verlagert, die untere Zungenbeinmuskulatur mit einem Häkchen nach medial verschoben. Die A. carotis communis und die Karotisbifurkation wurden mikrochirurgisch vom umgebenden Bindegewebe unter Schonung des N. vagus freipräpariert. Anschließend wurde die A. carotis externa aufgesucht und circa fünf Millimeter distal der Karotisbifurkation ligiert. Daraufhin wurde die A. carotis communis circa sechs Millimeter proximal und die A. carotis interna circa vier Millimeter distal der Bifurkation mit zwei temporären Gefäßclips verschlossen. Die Blutversorgung des Gehirns über die A. carotis interna war somit kurzzeitig unterbrochen. Da bei der Ratte die Kollateralversorgung des Circulus Willisii für die Hirndurchblutung ausreichend ist, resultierte daraus keine Mangelversorgung. Durch diesen temporären Verschluss war die Eröffnung des ligierten A. carotis externa stumpfes möglich. Nun wurde ein 4/0 Prolene-Faden (Ethicon GmbH, Deutschland) über den proximalen Stumpf der A. carotis externa bis in das Lumen der A. carotis interna eingeführt. Die distalen fünf Millimeter des Fadens sind von einem Silikonzylinder (Durchmesser 0.28 mm) umgeben (Rhodorsil RTV 1556 A and B Pink, Rhône Poulenc, Frankreich). Eine Ligatur um die A. carotis externa inklusive des Fadens dichtete das Gefäßsystem wieder ab. Nach Entfernung der Gefäßclips von den Arterien wurde der Faden vorsichtig im Lumen der A. carotis interna nach intrakraniell, bis es zu einem in der Laser-Doppler-Fluxmetrie beobachtbaren Abfall des LCBF im ipsilateralen Mediaversorgungsgebiet auf 20-30 % des Ausgangswertes kam, vorgeschoben. Nach beschriebener Vorgehensweise lag der Zylinder dann im Circulus Willisii und verlegte den Abgang zur A. cerebri media [206].

Um einer unerwünschten Dislokation und der damit verbundenen frühzeitigen Reperfusion während Ischämiedauer von 90 min vorzubeugen, wurde der Faden mit einem Gefäßclip am Stumpf der A. carotis externa fixiert. Die Reperfusion im Mediaversorgungsgebiet wurde durch Zurückziehen des Fadens in den Stumpf der A. carotis externa erreicht. Die A. carotis externa wurde schließlich proximal ligiert und der Faden entfernt.

Alle Tiere wurden postischämisch über einen Zeitraum von einer Stunde in Narkose unter Kontrolle der erwähnten Blutparameter weiter beobachtet. Am Ende der Operation wurden alle Katheter und Sonden entfernt und die Wunden nach sorgfältiger Blutstillung mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Beatmung wurde stufenweise auf Raumluft umgestellt, um die Tiere aus der Narkose erwachen zu lassen. Sobald die Spontanatmung ausreichend war, wurden die Ratten extubiert. Während der nächsten Stunden waren die Tiere unter ständiger Beobachtung, bis sie sich in wachem und stabilem Zustand befanden. Dann wurden sie zurück in den Tierstall gebracht, wo in Einzelhaltung freier Zugang zu Wasser und Trockenfutter wieder gewährt wurde.

## **2.6 Auswertung**

### **2.6.1 Gewichtsentwicklung**

Die Gewichtsentwicklung gilt als Hinweis auf den Allgemeinzustand der Tiere in den Tagen nach der Operation. Aus diesem Grunde wurde täglich das Körpergewicht der Ratten mittels einer elektronischen Waage (Ohaus LS 2000; Ohaus, USA) ermittelt. Da die Tiere einen ausgeprägten Tag-/Nachtrhythmus besitzen, dem auch die Nahrungsaufnahme unterliegt, kann das Körpergewicht über den Tag unterschiedlich schwanken. Das Gewicht wurde deshalb stets zur gleichen Tageszeit bestimmt.

### **2.6.2 Funktionelle neurologische Erholung**

Zur Quantifizierung funktioneller Defizite wurde täglich ein nach Bederson et al. modifizierter Neuroscore verwendet [17, 256]. Die neurologische Untersuchung erfolgte täglich zwischen 17:00 und 20:00 Uhr von Untersuchern, die keine Kenntnis der Therapie hatten. Die Tiere wurden nach folgenden Kriterien beurteilt:

Punkte	Kriterium
0	Keine Spontanbewegung
1	Spontanes Circling in Richtung der hemiparetischen Körperseite
2	Circling nur bei erhöhtem Kraftaufwand (Zug am Schwanz)
3	Kein Circling nachweisbar, verminderte Standstabilität bei lateralem Druck
4	Kein Circling, keine verminderte Standstabilität Bei Hochheben am Schwanz und Annäherung an den Boden: Unfähigkeit, die zum Infarkt kontralaterale Vorderpfote zu strecken (eingeschränkter Stellreflex)
5	neurologisch unauffällige Versuchstiere mit normalem Stellreflex

Tabelle 8: Neuroscore, modifiziert nach Bederson et al. [17, 256]

Abbildung 18 zeigt eine grafische Darstellung zur Evaluation des Neuroscore:

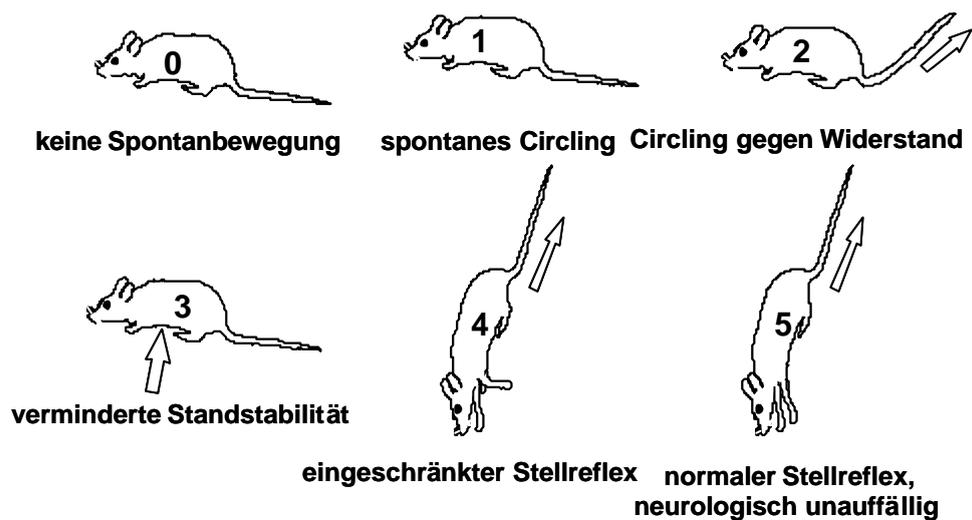


Abbildung 18: Evaluation der funktionellen neurologischen Erholung (genaue Beschreibung, siehe oben, Tabelle 8)

Durch diese tägliche Nachbeobachtung der Versuchstiere konnten ebenfalls weitere eventuell vorhandene Verhaltensauffälligkeiten protokolliert werden.

### 2.6.3 Infarkt volumen

Zur quantitativen Erfassung des morphologischen Schadens wurden die Gehirne der Versuchstiere am siebten postoperativen Tag perfusionsfixiert, entnommen und für die morphometrische Auswertung histologisch aufbereitet.

Dazu wurden die Tiere in tiefer Chloralhydratnarkose thorakotomiert, die linke Herzkammer punktiert und das rechte Herzohr eröffnet. Über die Punktionsnadel im linken Ventrikel erfolgte bei einem hydrostatischen Druck von circa 150 cm H<sub>2</sub>O zunächst eine Spülung des gesamten Gefäßsystems mit physiologischer Kochsalzlösung, anschließend wurde die Spülung mit 150 ml einer Phosphat-gepufferten (pH=7,4) Paraformaldehydlösung (2%, Merck, Darmstadt) fortgeführt. Die Schädelkalotte wurde eröffnet, die Dura mater entfernt und schließlich das Gehirn vorsichtig entnommen. Nachdem die Gehirne mindestens 24 h in Paraformaldehydlösung aufbewahrt waren worden, wurden sie mit Alkohol in steigender Konzentration entwässert. Anschließend wurden durch Methylsalicylat (Merck, Darmstadt) die Alkoholreste entfernt und die Gehirne in Rotihistol (Roth, Karlsruhe) als Zwischenmedium aufbereitet. Abschließend wurde die Einbettung in Paraffin vorgenommen. Mit einem Rotationsmikrotom (Reichert-Jung 2030, Deutschland) wurden 24 koronare 4 µm dicke Hirnschnitte im Abstand von 400 µm angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Merck, Darmstadt).

Die quantitative Auswertung wurde mittels digitaler Planimetrie von Untersuchern durchgeführt, die keine Kenntnis der Therapie hatten. Jeder Gehirnschnitt wurde sowohl mit einer Digitalkamera (Sony, Japan) und entsprechender Software (OPTIMAS 5.1, BioScan Incorporated, Edmonds, USA) digitalisiert, als auch mikroskopisch (Zeiss, Deutschland) untersucht und nach histopathologischen Kriterien beurteilt. Dadurch konnte an der digitalen Aufzeichnung das Infarktareal markiert und vermessen werden. In den Infarkt eingeschlossen wurden per definitionem nekrotische Areale, die sich wie in Tabelle 9 aufgelistet unterscheiden [52, 70], :

---

Scharf begrenzter, runder oder ellipsoider Zellkern

---

Ein oder mehrere, deutlich erkennbare Nucleolus/Nucleoli innerhalb des Zellkerns

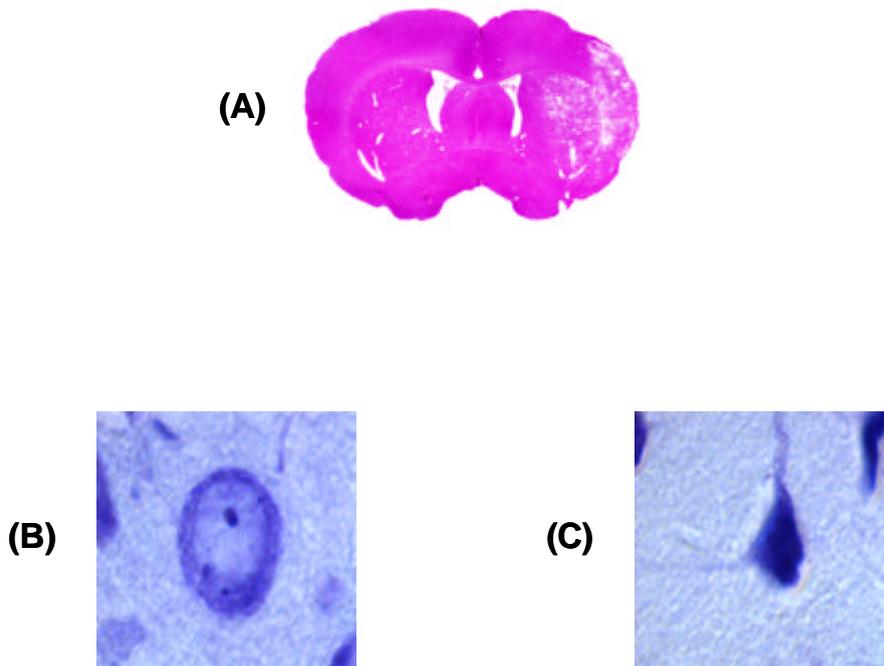
Nur geringgradige Helligkeitsunterschiede zwischen Zellkern und Neuropil

Abgrenzbarkeit des Zytoplasmas vom umliegenden Neuropil

Weniger als ein Drittel des Neurons von konfluierenden Vakuolen umgeben

---

**Tabelle 9: Morphologische Kriterien zur Klassifizierung der Neurone in vital (oben) und nekrotisch (unten) [52, 70]**



**Abbildung 19: Histologische Aufbereitung**

Im oberen Teil der Abbildung ist eine histologische Schnitt nach Vorbereitung und Färbung durch ein Rattengehirn dargestellt, wie sie auf dem Objektträger erscheinen (A). In der rechten Hemisphäre kann man den weißlich demarkierten Untergang von Hirnnervengewebe gut erkennen. Auf der linken Seite ist die kontralaterale linke Hemisphäre abgebildet, die nicht von der Ischämie betroffen ist.

Im unteren Teil der Abbildung sind zwei Nervenzellen dargestellt. (B) zeigt einen scharf begrenzten, runden und ellipsoiden Zellkern eines gesunden Neurons. Unten rechts (C) ist eine Nervenzelle abgebildet, welche die Kriterien aus Tabelle 9 für die Bewertung als nekrotisches Neuron erfüllt.

Das Gesamtinfarctvolumen ( $I_{\text{ges}}$ ) wurde berechnet, indem die nekrotische Fläche aller Schnitte summiert ( $I_1+I_2+I_3+\dots+I_{24}$ ) und anschließend mit dem Abstand ( $400 \mu\text{m}$ ) zwischen den Schnitten multipliziert wurde:

$$I_{\text{ges}} = (I_1+I_2+I_3+\dots+I_{24}) \times 0,4 \text{ mm}^3$$

Zusätzlich wurden die Teilvolumina der Infarkte im Kortex sowie in den Stammganglien berechnet. Dabei wurde die Fläche der Teilinfarkte in fünf definierten Schnitten im Abstand von 2,0 / 3,6 / 5,2 / 6,8 und 8,4 mm vom Frontalpol des Gehirns bestimmt. Die Lokalisation

der Stammganglien und des Kortex wurde einem stereotaktischen Atlas des Rattenhirns entnommen [162].

Die Berechnung der Teilvolumina ( $V_{\text{teil}}$ ) erfolgte nach demselben Prinzip wie oben beschrieben. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug bei dieser Bestimmung 1,6 mm:

$$V_{\text{teil}} = (l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5) \times 1,6 \text{ mm}^3$$

#### **2.6.4 Hirnschwellung und Wassergehalt einer Hemisphäre**

Zur quantitativen Erfassung der Hirnschwellung und des Wassergehalts einer Hemisphäre wurden die Versuchstiere 48 h nach Ischämie in eine tiefe Chloralhydratnarkose versetzt und transdiaphragmal durch kardiale Punktion entblutet. Unmittelbar nach Entbluten wurden die Tiere dekapitiert. Der M. temporalis wurde nach lateral-kaudal verdrängt, um einen besseren Zugang zur Entfernung der Schädelkalotte zu gewährleisten. Das Schädeldach wurde in vorsichtigen Schritten zunächst mit einer Knochenzange und anschließend mit einer Klemme ohne Verletzung der Dura mater entfernt. Nachdem ein ausreichend großer Zugang geschaffen wurde, wurde das Gehirn von der Dura mater vollständig befreit.

Das Gehirn wurde daraufhin entnommen. Hierfür wurde ein erster Schnitt mit einem Skalpell in der Frontalebene kaudal der Bulbi olfactorii unmittelbar vor den Polen des Frontalhirns durch das Rhinencephalon durchgeführt. Danach wurde die Epiphyse entfernt und das Cerebellum vorsichtig nach kaudal gedrängt, bis die Rautengrube am Boden des vierten Ventrikels dargestellt werden konnte. Das Großhirn wurde unmittelbar kaudal vom Colliculus inferior durch einen zur Achse des Hirnstamms senkrechten Schnitt oberhalb des Pons abgesetzt. Die einzige noch bleibende Verbindungsstelle des Gehirns zum Schädel waren die beiden Nervi optici, welche circa 1,5 mm distal des Chiasma opticum abgesetzt wurden. Nun wurde das Gehirn in toto entnommen. Unter makroskopischer und mikroskopischer Sichtkontrolle wurde die Intaktheit des Gehirns überprüft. Anschließend wurden unter mikroskopischer Kontrolle durch einen exakten Schnitt, in einer speziell angefertigten Form, die beiden Hemisphären in der Medianebene voneinander getrennt. Die Form bestand aus flüssigkeitsneutralem Kunststoff und ist auf der Basis eines formalinfixierten Gehirns einer Ratte der gleichen Gewichtsklasse erstellt worden. In ihrer Medianlinie gab es einen interhemisphäriellen Schlitz zur Führung des Skalpells. Diese Methode trug weitestgehend zu einer standardisierten Trennung der beiden Hemisphären bei. Die symmetrische Trennung ist eine essentielle Voraussetzung für die korrekte gravimetrische Bestimmung der Hirnschwellung.

Unmittelbar nach Entnahme und Trennung wurden die beiden Hemisphären in verschließbare Wiegegläschen gelegt. Diese waren vor Entnahme mindestens zwölf Stunden bei 110°C (Trockenschrank, Memmert G-201363/-201927, Schweiz) getrocknet worden und mindestens eine Stunde vor Hemisphärentrennung zur Abkühlung auf Raumtemperatur in einem Exsiccator aufbewahrt worden. Kurz vor der Hirnentnahme wurden die leeren, verschlossenen Gläschen auf einer elektronischen Waage (Typ Toledo, L-062488, Mettler, Schweiz) gewogen. Die mit den Gewebeproben gefüllten Wiegegläschen wurden schließlich erneut gewogen. Das Feuchtgewicht (FG) der Hirnhemisphären ergab sich aus der Differenz des Gewichts der gefüllten von den leeren Gefäßen. Zur Bestimmung des Trockengewichts (TG) wurden die Hemisphären anschließend für 24 h bei 110°C getrocknet und nach diesem Zeitraum erneut gewogen.

Aus diesen gravimetrisch ermittelten Werten, lässt sich aus der Differenz von Feuchtgewicht und Trockengewicht die Hirnschwellung und der Wassergehalt einer Hemisphäre bestimmen [7, 78]:

$$\text{Hirnschwellung (\%)} = \frac{FG_{isch} - FG_{non-isch}}{FG_{non-isch}} \times 100$$

$$\text{Wassergehalt einer Hirnhälfte (\%)} = \frac{FG - TG}{FG} \times 100$$

Die Feuchtgewichtsdifferenz ergibt sich aus der Subtraktion des Feuchtgewichtes der ischämischen ( $FG_{isch}$ ) von der kontralateralen Hemisphäre ( $FG_{non-isch}$ ). Die Hirnschwellung wird aus dem Anteil der Feuchtgewichtsdifferenz am Feuchtgewicht der kontralateralen (nicht-ischämischen) Hemisphäre berechnet.

Die Wasseraufnahme einer Hemisphäre wird aus der Differenz ihres Feucht- und Trockengewichts kalkuliert. Der Wassergehalt einer Hemisphäre ist daher der Anteil der Wasseraufnahme am Feuchtgewicht.

### 2.6.5 Statistische Analyse

Die physiologischen Parameter wurden für jeden Zeitpunkt mit der Varianzanalyse (One Way ANOVA), die Laser-Doppler Daten mit der Two-Way ANOVA für wiederholte Messungen auf Signifikanz geprüft. Infarkt volumina und der Neuroscore für jeden der sieben postoperativen

Tage wurden mittels Kruskal-Wallis ANOVA on ranks analysiert. Falls nachgeordnete Vergleiche der verschiedenen Gruppen nötig waren, wurde der Dunnet Test oder Dunn Test verwendet. Hirnschwellung und Wassergehalt einer Hemisphäre wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test untersucht. Die Auswertung erfolgte mit SigmaStat 2.0 Statistical Software (SPSS Science Inc., Chicago, IL, USA).

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur besseren Übersicht sind in einigen Diagrammen die Werte als Mittelwert  $\pm$  absoluter Fehler des Mittelwertes (SEM) aufgetragen und entsprechend markiert. Das geforderte Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgesetzt.

## 2.7 Versuchsgruppen

Der von uns verwendete Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist LF 16-0687 Ms wurde in Pulverform bei 4°C gelagert und für die Versuche täglich frisch in 0,9% NaCl-Lösung aufgelöst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt drei Einzelstudien durchgeführt, die aufeinander aufbauten:

### 2.7.2 Studie I: Neuroprotektive Wirksamkeit von LF 16-0687 Ms

Ziel der ersten Studie war es die neuroprotektive Wirksamkeit einer Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mit LF 16-0687 Ms zu überprüfen.

Hierfür wurden 38 männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Fünf Versuchstiere erlitten eine SAB und wurden daher ausgeschlossen. Die verbliebenen 33 Tiere wurden randomisiert und einer von drei Gruppen (n = 11) zugeteilt:

Name	Therapie	Applikationsart	n
Vehikel	0,9% NaCl	s.c.	11
Low Dose	12 mg/kg/d LF 16-0787 Ms	s.c.	11
High Dose	36 mg/kg/d LF 16-0787 Ms	s.c.	11

Wir verwendeten für die Kontrollgruppe (Vehikel) 0,9 % physiologische Kochsalzlösung (NaCl), die im folgenden als Low Dose bezeichnete Therapiegruppe erhielt 12 mg/kg/d, die im folgenden als High Dose bezeichnete 36 mg/kg/d des B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten LF 16-0687 Ms. Die Applikationen wurden subkutan durchgeführt.

Eine Hälfte der Gesamttagesdosis wurde 30 min vor Ischämie, ein weiteres Viertel zum Zeitpunkt der Reperfusion (90 min) und das letzte Viertel sechs Stunden nach Ischämie gegeben. Der Zeitpunkt des Ischämiebeginns war am Operationstag etwa gegen 10:00 Uhr. Die zweite Dosis wurde also gegen 11:30 Uhr gegeben und die letzte dritte Dosis um 17:30 Uhr.

Über die folgenden zwei Tage (postoperative Tage 1 und 2) wurde jeweils eine Hälfte der Gesamttagesdosis um 09:00 Uhr gegeben, die zweite um 17:00 Uhr. Die Tiere wurden täglich gewogen und neurologisch bewertet. Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere getötet und die Gehirne histologisch aufbereitet.



### 2.7.3 Studie II: Einfluss auf die postischämische Hirnschwellung

Ziel der darauffolgenden Studie war es, den Einfluss der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade auf die Ausbildung eines Hirnödems nach fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen.

Hierfür wurden 17 männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Ein Versuchstier erlitt eine SAB und wurde daher ausgeschlossen. Die verbliebenen 16 Tiere wurden randomisiert und einer von zwei Gruppen (n = 8) zugeordnet.

Name	Therapie	Applikationsart	n
Vehikel	0,9% NaCl	s.c.	8
Low Dose	12 mg/kg/d LF 16-0787 Ms	s.c.	8

Die Kontrolltiere erhielten 0,9% NaCl subkutan. Als Therapie wurde die aus der ersten Studie wirksame Dosis von 12 mg/kg/d (Low Dose) gewählt.

Das Versuchprotokoll der akuten Phase war mit dem von Studie I identisch (vgl. Abbildung 20). Die chronische Versuchsphase dauerte zwei Tage. In diesem Zeitraum wurde analog zur Studie I die funktionelle neurologische Erholung und Gewichtsentwicklung protokolliert. Die Applikationen der Therapie wurde über die zwei postoperativen Tage wie in Studie I beibehalten. Die Gehirne der Versuchstiere wurden schließlich nach 48 h, am zweiten postoperativen Tag, zur Bestimmung von Hirnschwellung und Wassergehalt der Hemisphären entnommen.

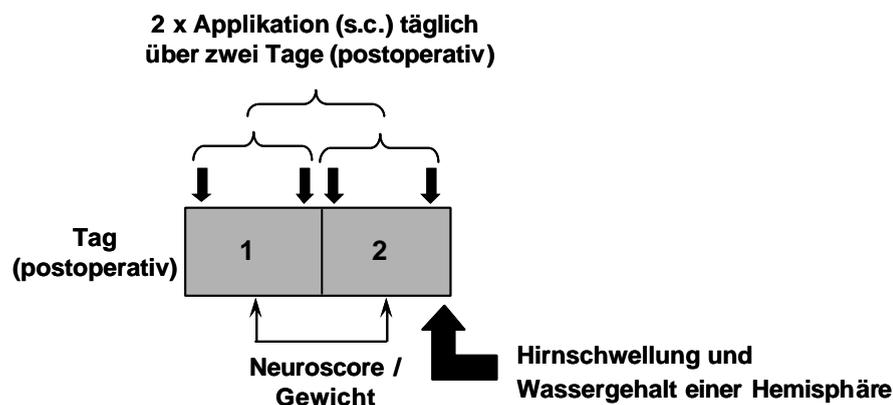


Abbildung 22: Versuchsprotokoll der chronischen Versuchsphase (Studie II)

Analog zu Studie I wurden Neuroscore und Gewichtsentwicklung protokolliert; die Behandlung wurde über die folgenden zwei postoperativen Tage fortgesetzt. Am zweiten postoperativen Tag wurden die Gehirne zur Bestimmung der Hirnschwellung und des Wassergehaltes jeder Hemisphäre entnommen.

## 2.7.4 Studie III: Dosisbereich und postischämische Wirksamkeit

Ziel der dritten Studie war es, die neuroprotektive Wirksamkeit des B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei Therapiebeginn nach Ischämie zum Zeitpunkt der Reperfusion insbesondere im Niedrigdosisbereich (<12 mg/kg/d) zu überprüfen.

Hierfür wurden 30 männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Zwei Versuchstiere erlitten eine SAB und wurden daher ausgeschlossen. Die verbliebenen 28 Tiere wurden randomisiert und einer von vier Gruppen (n = 7) zugeordnet.

Name	Therapie	Applikationsart	n
Vehikel	0,9% NaCl	s.c.	7
LF 16-0687 Ms	1 mg/kg/d	s.c.	7
LF 16-0687 Ms	3 mg/kg/d	s.c.	7
LF 16-0687 Ms	10 mg/kg/d	s.c.	7

Die Tagesdosis wurde auf insgesamt zwei Einzeldosierungen am Operationstag aufgeteilt: Die eine Hälfte der Gesamttagesdosis wurde zum Zeitpunkt der Reperfusion (90 min) und die andere Hälfte sechs Stunden nach Reperfusion gegeben.

Der Zeitpunkt des Ischämiebeginns war am Operationstag etwa gegen 10:00 Uhr. Die erste Dosis wurde also gegen 11:30 Uhr bei Reperfusion gegeben und die zweite Dosis um 17:30 Uhr (vgl. Abbildung 23).

Über die folgenden zwei Tage wurde wie in den Vorversuchen die Therapie fortgesetzt: es wurde jeweils eine Hälfte der Gesamttagesdosis um 09:00 Uhr gegeben, die andere um 17:00 Uhr. Die Tiere wurden täglich gewogen und neurologisch bewertet. Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere getötet und die Gehirne histologisch aufbereitet.



### **3 Ergebnisse**

Aus Darstellungsgründen wurde die postoperative funktionelle neurologische Erholung und Gewichtsentwicklung auf Line & Scatter Plots aufgetragen.

### 3.1 Studie I

#### 3.1.1 Physiologische Kontrollparameter

	Vor Ischämie (n=11)		
	Vehikel	Low Dose (12 mg/kg/d)	High Dose (36 mg/kg/d)
pH	7,42± 0,04	7,42± 0,03	7,41± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,0± 6,1	39,0± 6,0	40,3± 5,8
pO <sub>2</sub> (mmHg)	108,1± 21,1	116,6± 17,6	103,1± 21,5
Glukose (mg/dl)	120,9± 13,2	124,6± 21,7	122,8± 14,8
Laktat (mmol/l)	1,02± 0,31	0,83± 0,25	0,92± 0,39
Hämoglobin (g/dl)	15,7± 1,0	15,4± 0,8	15,7± 0,6
Hämatokrit (%)	44,9± 2,8	44,6± 2,7	45,7± 1,4
MAP (mmHg)	81,8± 13,8	78,6± 11,8	83,9± 12,8
Temp rekt. (°C)	37,0± 0,20	36,9± 0,24	37,1± 0,16
Temp temp. (°C)	36,9± 0,12	37,0± 0,12	37,0± 0,02

	Während Ischämie (n=11)		
	Vehikel	Low Dose (12 m g/kg/d)	High Dose (36 mg/kg/d)
pH	7,37± 0,03	7,37± 0,03	7,37± 0,04
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,4± 2,9	40,4± 4,8	41,3± 3,1
pO <sub>2</sub> (mmHg)	114,9± 13,4	119,6± 17,6	112,9± 12,9
Glukose (mg/dl)	114,7± 24,7	119,6± 22,8	115,4± 14,8
Laktat (mmol/l)	0,84± 0,13	0,68± 0,24	0,75± 0,38
Hämoglobin (g/dl)	15,7± 1,0	15,6± 1,1	15,8± 0,5
Hämatokrit (%)	45,8± 2,9	46,4± 3,7	46,8± 1,7
MAP (mmHg)	77,8± 12,5	74,9± 15,7	71,3± 14,4
Temp rekt. (°C)	37,0± 0,18	37,0± 0,27	37,1± 0,16
Temp temp. (°C)	37,0± 0,07	37,0± 0,11	37,0± 0,05

	Nach Ischämie (n=11)		
	Vehikel	Low Dose (12 mg/kg/d)	High Dose (36 mg/kg/d)
pH	7,38± 0,03	7,37± 0,02	7,38± 0,04
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	39,3± 4,1	38,9± 3,9	39,4± 2,8
pO <sub>2</sub> (mmHg)	114,0± 18,5	117,4± 17,7	112,4± 14,9
Glukose (m g/dl)	123,0± 31,7	128,6± 25,7	123,4± 12,4
Laktat (mmol/l)	0,85± 0,21	0,79± 0,29	0,77± 0,28
Hämoglobin (g/dl)	15,7± 1,0	15,8± 1,4	15,5± 0,8
Hämatokrit (%)	46,6± 2,8	45,3± 4,2	46,1± 2,7
MAP (mmHg)	83,3± 16,3	81,8± 19,1	82,8± 13,5
Temp rekt. (°C)	37,0± 0,08	36,9± 0,23	37,0± 0,07
Temp temp. (°C)	37,0± 0,05	36,9± 0,21	36,9± 0,21

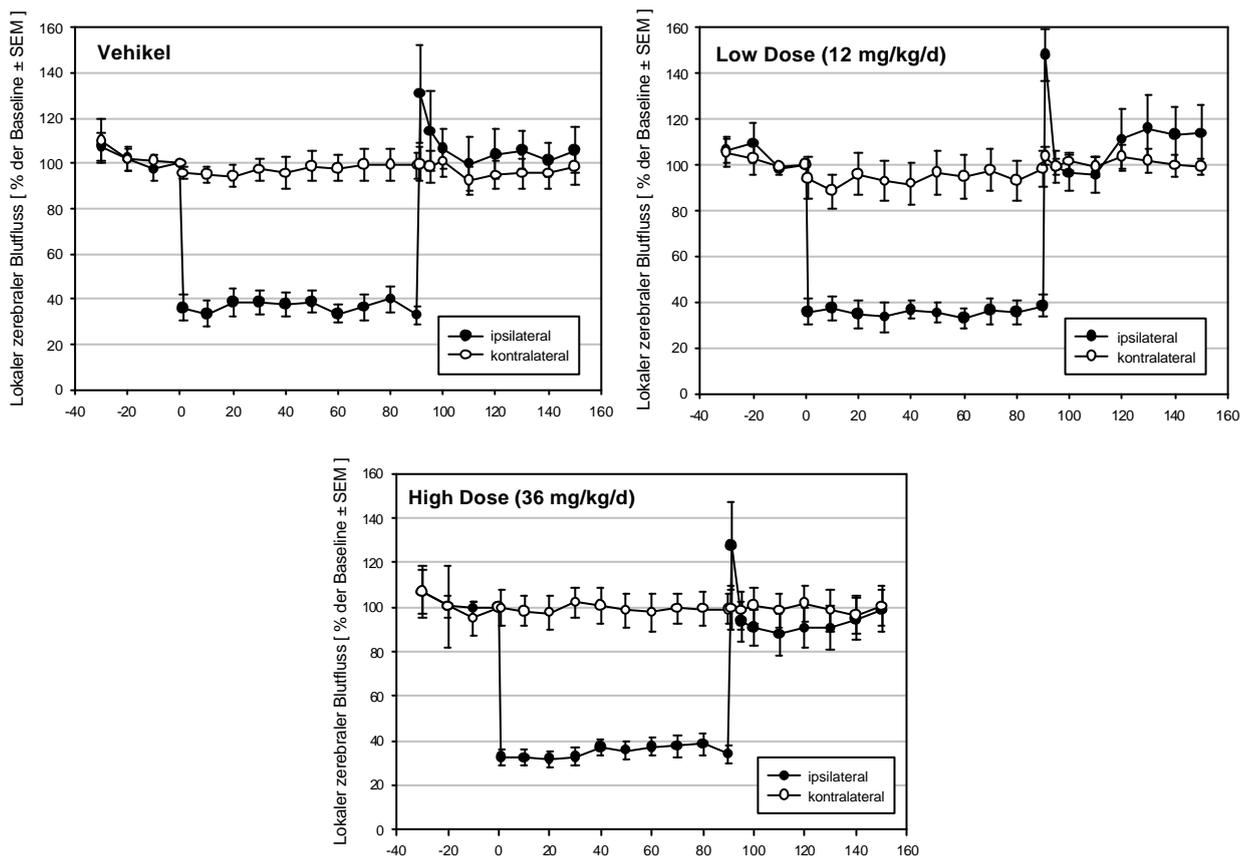
**Tabelle 10: Physiologische Kontrollparameter (Studie I: n=11, MW ± SD)**

**MAP = Mittlerer Arterieller Blutdruck, Temp = Temperatur, rekt = rektal, temp. = temporal**

Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied der physiologischen Parameter in der prä-, intra- und postischämischen Phase (vgl. Tabelle 10).

### 3.1.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)

Die Okklusion der A. cerebri media bewirkte in allen Gruppen einen Abfall des ipsilateralen LCBF auf circa 20-30 % des Ausgangswertes, während der kontralaterale LCBF unverändert blieb. In allen Gruppen war die Reperfusion von einer kurzen Hyperämie begleitet, anschließend stellten sie sich wieder auf die Ausgangswerte ein. Zwischen der Kontrollgruppe und den therapierten Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den LCBF. Die Tiere, die LF 16-0687 Ms als Low Dose (12 mg/kg/d) erhielten, zeigten zum Ende des einstündigen postischämischen Beobachtungszeitraumes eine Tendenz zu höheren, die mit High Dose behandelten Tiere zu niedrigeren LCBF Werten. Diese Beobachtung war statistisch nicht signifikant (vgl. Abbildung 25).



**Abbildung 25: Laser-Doppler-Fluxmetrie (Studie I: n=11)**  
 ipsilateral - rechte Hemisphäre, Ort der Ischämieinduktion, kontralateral - linke Hemisphäre, Kontrollseite

### 3.1.3 Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit

In allen Gruppen reduzierte sich das Körpergewicht am ersten Tag im Vergleich zum präoperativen Ausgangsgewicht auf circa 92 %, erreichte sein Minimum am fünften postoperativen Tag (87 % des Ausgangsgewichtes) und stieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes am siebten Tag wieder auf 92 % an. Die Gruppen wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gewichtverlustes auf (vgl. Abbildung 26).

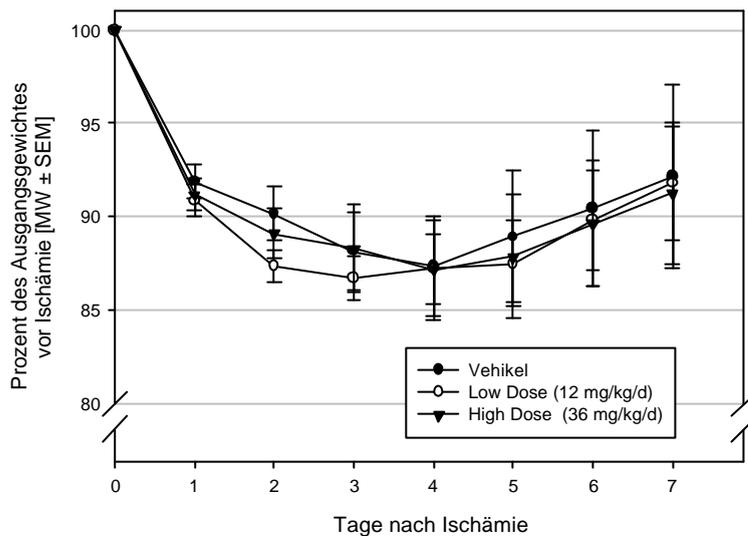


Abbildung 26: Gewichtsentwicklung (Studie I: n=11)

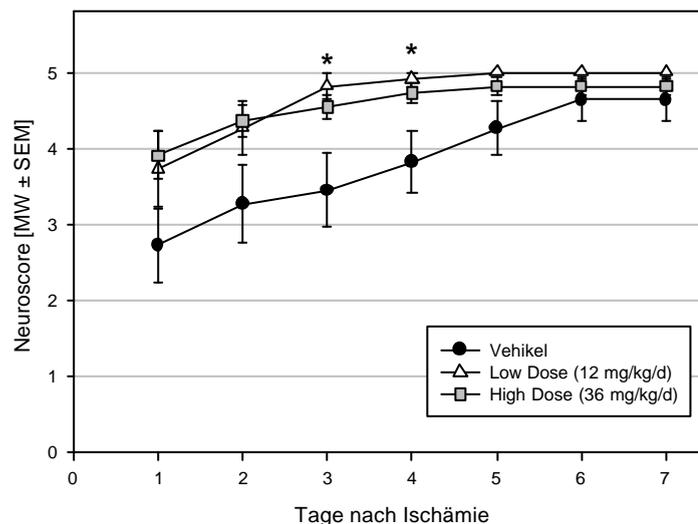


Abbildung 27: Funktionelles neurologisches Defizit (Studie I: n=11)

\*  $p < 0,05$  vs. Vehikel

Alle therapierten Tiere zeigten die Tendenz, sich innerhalb des siebentägigen Beobachtungszeitraumes funktionell neurologisch besser zu erholen als die Kontrolltiere, wobei das nur für die Low Dose Gruppe (12 mg/kg/d) an dem dritten und vierten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) war. Bei dieser Gruppe konnten für den Rest des Beobachtungszeitraums von sieben Tagen keine neurologischen Defizite festgestellt werden (vgl. Abbildung 27).

### 3.1.4 Infarktvolumen

Das Gesamtfarktvolumen betrug  $49,9 \pm 27,1 \text{ mm}^3$  (MW  $\pm$  SD) in der Kontrollgruppe,  $25,0 \pm 18,1 \text{ mm}^3$  (-50%) in der mit Low Dose behandelten Gruppe und  $36,4 \pm 21,1 \text{ mm}^3$  (-27%) bei den mit High Dose (36 mg/kg/d LF 16-0687 Ms) behandelten Tieren.

Die Gehirne der mit der Low Dose (12 mg/kg/d LF 16-0687 Ms) behandelten Versuchsgruppe zeigten ein signifikant reduziertes Gesamtfarktvolumen (-50% im Vergleich zur Kontrollgruppe,  $p < 0,05$ ). Für die mit High Dose behandelten Tiere konnte zwar ein positiver Trend hinsichtlich eines geringer ausgeprägten Gesamtfarktvolumens ausgemacht werden. Dies war statistisch jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 28).

Unterteilt man die Gesamtvolumina in kortikale und subkortikale Infarktvolumina, so erhält man folgende Resultate: die Durchschnitte der kortikalen Infarktvolumina betragen  $18,8 \pm 18,9 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe,  $3,6 \pm 8,7 \text{ mm}^3$  (-80%) in der mit Low Dose behandelten Gruppe und  $8,7 \pm 11,6 \text{ mm}^3$  (-54%) bei den mit High Dose therapierten Tieren.

Das subkortikale bzw. basalganglionäre Infarktvolumen betrug  $30,7 \pm 10,0 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe,  $23,1 \pm 13,5 \text{ mm}^3$  (-25%) in der mit Low Dose behandelten Gruppe und  $26,6 \pm 11,1 \text{ mm}^3$  (-13%) bei den mit High Dose therapierten Tieren.

Das vermindert ausgeprägte Gesamtfarktvolumen in der mit Low Dose (12 mg/kg/d LF 16-0687 Ms) behandelten Gruppe ist durch ein signifikant reduziertes kortikales Infarktvolumen (-80% im Vergleich zur Kontrollgruppe,  $p < 0,05$ ) bedingt. Die Tendenz eines geringeren subkortikalen Infarktvolumens konnte statistisch nicht bestätigt werden.

Zwar zeigten alle mit High-Dose LF 16-0687 Ms behandelten Tiere einen Trend zu verringerten Infarktvolumina, ohne jedoch ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen (vgl. Abbildung 29).

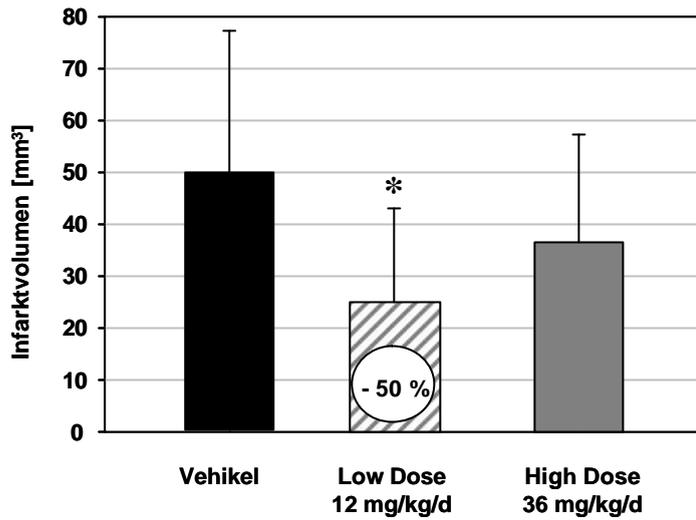


Abbildung 28: Gesamtingfarkt volumen (Studie I: n=11, MW ± SD)  
 Hemmung der Infarktausprägung am siebten postoperativen Tag  
 \* p < 0,05 vs. Vehikel

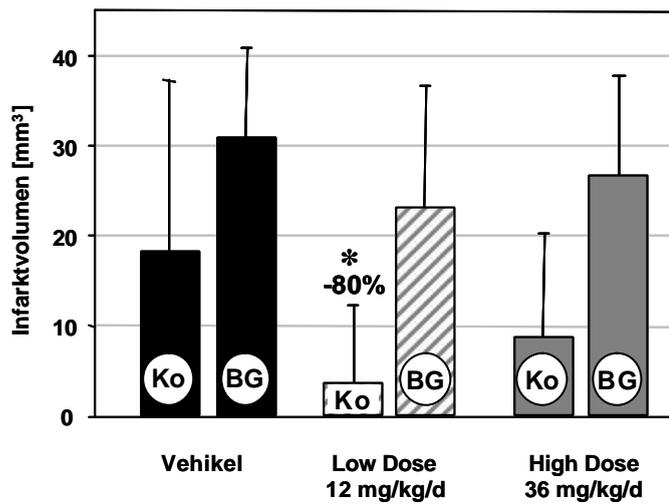


Abbildung 29: Kortikales und subkortikales Infarkt volumen (Studie I: n=11, MW ± SD)  
 Hemmung der Infarktausprägung in Kortex (Ko) und Subkortex (Basalganglien, BG) am  
 siebten postoperativen Tag  
 \* p < 0,05 vs. Vehikel

## 3.2 Studie II

### 3.2.1 Physiologische Kontrollparameter

Vor Ischämie (n=8)		
	Vehikel	Low Dose (12 mg/kg/d)
pH	7,40± 0,02	7,44± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	39,7± 1,5	38,0± 3,1
pO <sub>2</sub> (mmHg)	115,3± 21,8	102,2± 15,2
Glukose (mg/dl)	124,3± 12,6	123,7± 22,1
Laktat (mmol/l)	0,96± 0,16	1,10± 0,26
Hämoglobin (g/dl)	15,2± 1,0	15,7± 0,8
Hämatokrit (%)	43,2± 2,0	44,6± 1,6
MAP (mmHg)	79,8± 15,8	76,3± 14,3
Temp rekt. (°C)	36,6± 0,24	36,4± 0,50
Temp temp. (°C)	36,7± 0,22	36,3± 0,51

Während Ischämie (n=8)		
	Vehikel	Low Dose (12 mg/kg/d)
pH	7,35± 0,02	7,38± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	42,0± 4,1	40,9± 3,3
pO <sub>2</sub> (mmHg)	100,9± 10,5	104,4± 6,2
Glukose (mg/dl)	106,7± 17,1	104,6± 18,3
Laktat (mmol/l)	0,68± 0,20	0,69± 0,14
MAP (mmHg)	86,3± 19,7	80,6± 16,9
Temp rekt. (°C)	36,7± 0,20	36,5± 0,27
Temp temp. (°C)	36,8± 0,20	36,7± 0,29

Nach Ischämie (n=8)		
	Vehikel	Low Dose (12 mg/kg/d)
pH	7,37± 0,04	7,38± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,5± 4,7	41,5± 2,9
pO <sub>2</sub> (mmHg)	106,5± 15,7	103,4± 3,3
Glukose (mg/dl)	118,7± 15,5	109,7± 20,4
Laktat (mmol/l)	0,60± 0,09	0,59± 0,10
Hämoglobin (g/dl)	14,7± 1,0	15,4± 0,9
Hämatokrit (%)	43,2± 3,0	44,0± 1,8
MAP (mmHg)	78,7± 19,1	69,4± 14,0
Temp rekt. (°C)	36,7± 0,22	36,5± 0,18
Temp temp. (°C)	36,9± 0,18	36,9± 0,19

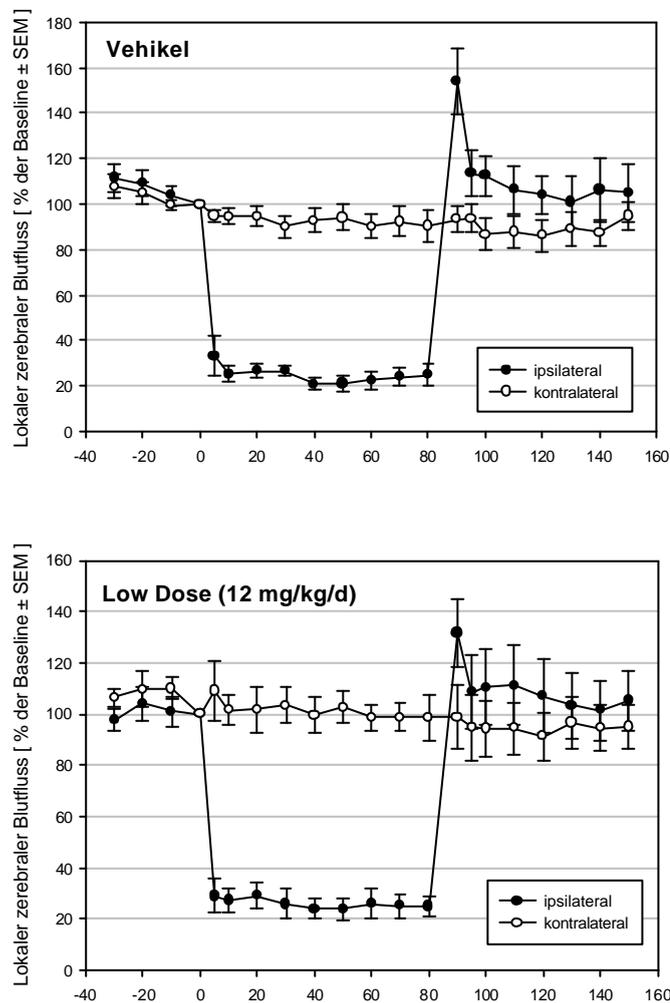
Tabelle 11: Physiologische Kontrollparameter (Studie II: n=8, MW ± SD)

MAP = Mittlerer Arterieller Blutdruck, Temp = Temperatur, rekt = rektal, temp. = temporal

Die Werte befanden sich wie in der Vorstudie im physiologischen Normbereich. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied der physiologischen Parameter in der prä-, intra- und postischämischen Phase (vgl. Tabelle 11).

### 3.2.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)

Die Okklusion der A. cerebri media bewirkte in beiden Gruppen einen Abfall des ipsilateralen LCBF auf circa 20-30 % des Ausgangswertes, während der kontralaterale LCBF unverändert blieb. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.



**Abbildung 30: Laser-Doppler-Fluxmetrie (Studie II: n=8)**  
**ipsilateral - rechte Hemisphäre, Ort der Ischämieinduktion, kontralateral - linke Hemisphäre, Kontrollseite**

### 3.2.3 Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit

Innerhalb des methodisch bedingt verkürzten Nachbeobachtungszeitraumes von zwei Tagen, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der Gewichtsentwicklung und des funktionellen neurologischen Defizits festgestellt.

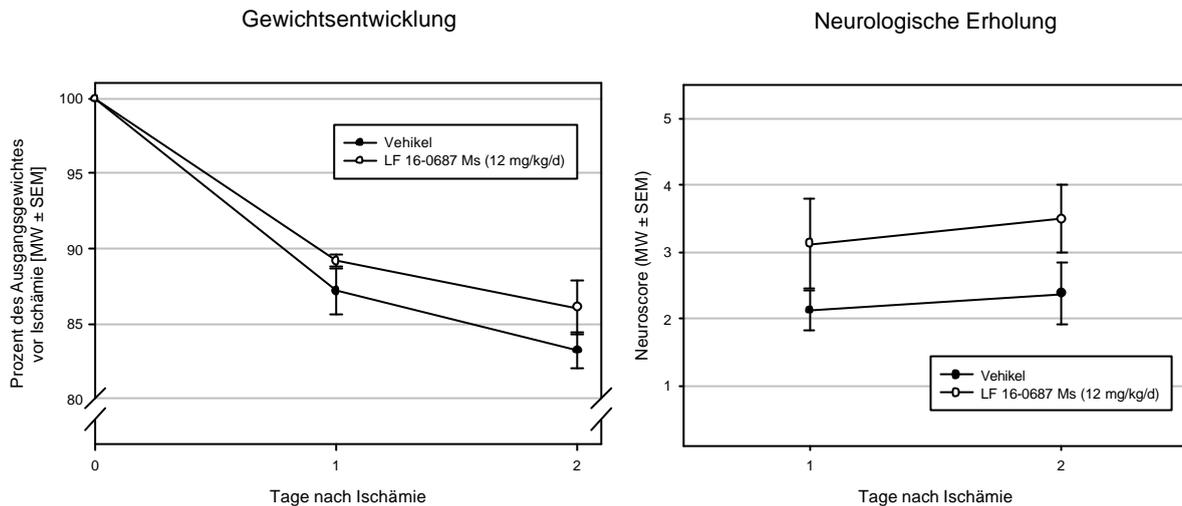


Abbildung 31: Gewichtsentwicklung und Neurologische Erholung (Studie II: n=8)

### 3.2.4 Hirnschwellung und Wassergehalt

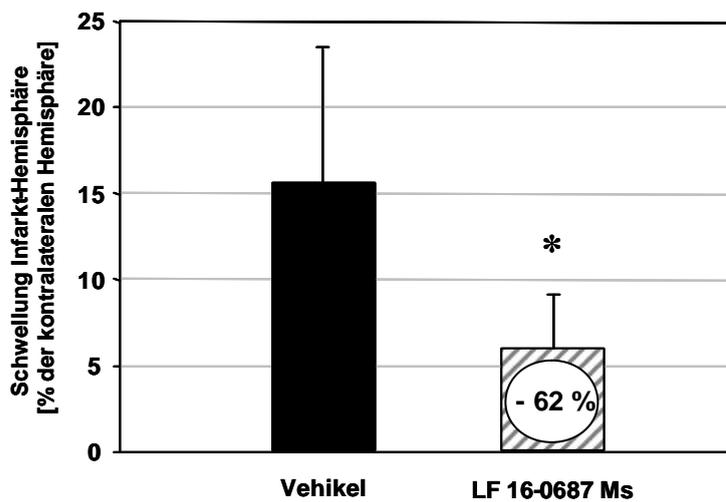


Abbildung 32: Hirnschwellung (Studie II: n=8, MW ± SD)

Schwellung der Infarkt-Hemisphäre in Bezug zur kontralateralen Hemisphäre

\* p < 0,05 vs. Vehikel

Die gravimetrische Bestimmung nach 48 h ergab eine Hirnschwellung, also eine prozentuale Zunahme des Hirnwassergehaltes der ischämischen im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre, von  $5,9 \pm 3,2$  % in der mit LF-16-0687 Ms behandelten Versuchgruppe und eine Zunahme von  $15,5 \pm 7,9$  % in der Kontrollgruppe. Die Schwellung der ischämischen Hemisphäre war damit nach 48 h bei den mit LF 16-0687 Ms behandelten Tieren um 62 % signifikant geringer ausgeprägt (vgl. Abbildung 32).

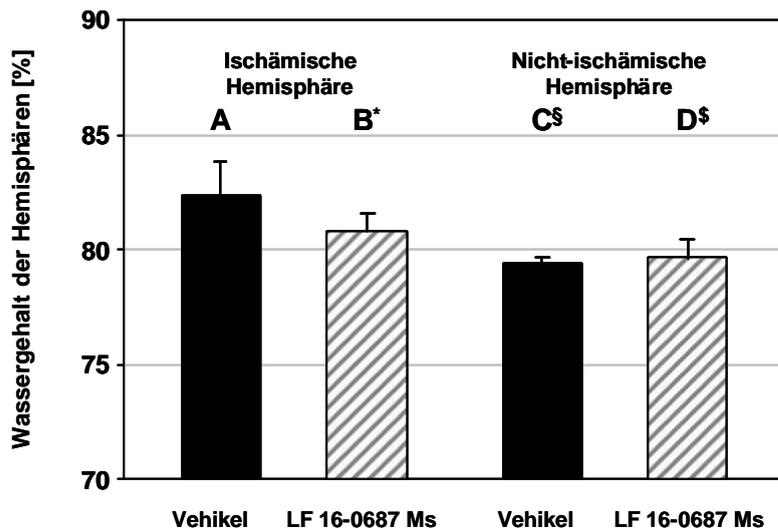


Abbildung 33: Wassergehalt der Hemisphären (Studie II: n=8, MW  $\pm$  SD)

\*  $p < 0,05$ : B vs. A

§  $p < 0,05$ : C vs. A, \$  $p < 0,05$ : D vs. B

Der Wassergehalt der ischämischen Hemisphäre war mit  $82,3 \pm 1,4$  % signifikant höher als jener der kontralateralen (nicht-ischämischen) Hemisphäre  $79,3 \pm 0,3$  % in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Ebenso war der Wassergehalt in der therapierten Gruppe mit  $80,8 \pm 0,8$  % in der ischämischen gegenüber  $79,6 \pm 0,8$  % in der nicht-ischämischen Hemisphäre nach 48 h signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Vergleicht man den Wassergehalt der nicht-ischämischen Hemisphären der Low Dose LF 16-0687 Ms Gruppe mit der Kontrollgruppe, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Der Wassergehalt der ischämischen Hemisphäre in der mit LF 16-0687 Ms therapierten Versuchsgruppe war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (vgl. Abbildung 33).

### 3.3 Studie III

#### 3.3.1 Physiologische Kontrollparameter

<b>Vor Ischämie (n=7)</b>				
	Vehikel	1 mg/kg/d	3 mg/kg/d	10 mg/kg/d
pH	7,45± 0,04	7,45± 0,07	7,42± 0,07	7,45± 0,06
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	35,5± 3,6	35,6± 7,1	41,5± 9,4	38,3± 8,1
pO <sub>2</sub> (mmHg)	107,2± 14,9	110,3± 11,3	107,4± 28,3	105,4± 7,7
Glukose (mg/dl)	128,9± 9,4	121,1± 22,4	117,4± 13,0	139,4± 28,4
Laktat (mmd/l)	1,43± 0,29	1,35± 0,60	1,11± 0,35	1,59± 0,77
Hämoglobin (g/dl)	16,4± 0,8	16,5± 0,9	16,7± 0,5	16,8± 0,7
Hämatokrit (%)	46,4± 2,2	46,1± 3,1	48,1± 2,8	47,2± 2,6
MAP (mmHg)	85,2± 19,0	85,3± 21,1	78,7± 13,0	87,5± 18,4
Temp rekt. (°C)	36,7± 0,27	36,6± 0,34	36,5± 0,31	36,6± 0,30
Temp temp. (°C)	36,6± 0,30	36,7± 0,30	36,7± 0,22	36,6± 0,26

<b>Während Ischämie (n=7)</b>				
	Vehikel	1 mg/kg/d	3 mg/kg/d	10 mg/kg/d
pH	7,42± 0,02	7,39± 0,04	7,39± 0,03	7,42± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	37,2± 3,4	38,8± 3,5	41,7± 6,9	39,5± 3,5
pO <sub>2</sub> (mmHg)	99,7± 9,0	103,5± 18,0	105,0± 20,4	98,3± 11,2
Glukose (mg/dl)	109,1± 13,6	107,0± 17,7	98,4± 50,4	128,6± 32,5
Laktat (mmol/l)	0,93± 0,29	0,90± 0,33	0,87± 0,28	1,04± 0,22
MAP (mmHg)	76,8± 18,6	75,1± 21,5	74,7± 12,7	75,3± 17,2
Temp rekt. (°C)	36,6± 0,24	36,6± 0,31	36,4± 0,22	36,7± 0,35
Temp temp. (°C)	36,8± 0,18	36,9± 0,03	36,8± 0,05	36,8± 0,08

<b>Nach Ischämie (n=7)</b>				
	Vehikel	1 mg/kg/d	3 mg/kg/d	10 mg/kg/d
pH	7,41± 0,03	7,40± 0,04	7,38± 0,03	7,43± 0,03
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	38,0± 4,8	35,9± 3,8	41,9± 3,8	36,9± 1,8
pO <sub>2</sub> (mmHg)	106,8± 12,4	115,8± 9,5	107,3± 19,9	105,1± 13,3
Glukose (mg/dl)	110,6± 9,7	109,1± 20,3	114,4± 23,2	127,9± 32,9
Laktat (mmol/l)	0,94± 0,27	0,90± 0,33	0,92± 0,34	0,95± 0,19
Hämoglobin (g/dl)	15,3± 1,0	16,4± 1,4	16,1± 0,7	15,8± 0,7
Hämatokrit (%)	45,0± 1,84	46,8± 3,12	46,7± 2,78	45,7± 2,78
MAP (mmHg)	73,1± 12,3	77,3± 21,3	72,9± 9,4	73,1± 17,1
Temp rekt. (°C)	36,6± 0,25	36,4± 0,16	36,3± 0,15	36,4± 0,17
Temp temp. (°C)	36,7± 0,24	36,7± 0,35	36,8± 0,07	36,9± 0,05

**Tabelle 12: Physiologische Kontrollparameter (Studie III: n=7, MW ± SD)**

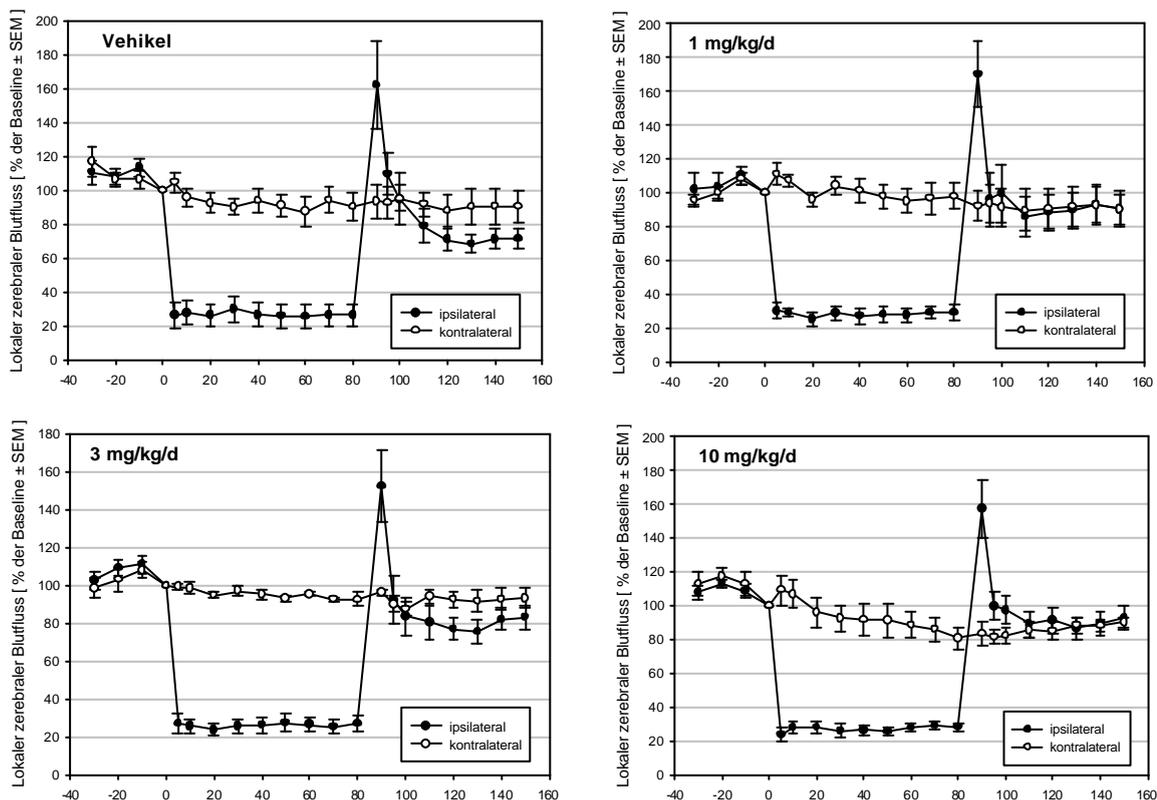
**MAP = Mittlerer Arterieller Blutdruck, Temp = Temperatur, rekt = rektal, temp. = temporal**

Es konnte statistisch keine Beeinflussung durch die Therapie mit LF 16-0687 Ms festgestellt werden. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied der physiologischen Kontrollparameter in der prä-, intra- und postischämischen Phase (vgl. Tabelle 12).

### 3.3.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)

Die Okklusion der Arteria cerebri media führte in allen Gruppen zu einem Abfall des ipsilateralen Laser-Doppler-Signals auf circa 30 % des Ausgangswertes. Bei allen Gruppen trat bei Reperfusion initial eine Hyperämie auf. Die mit LF 16-0687 Ms therapierten Tiere zeigten eine Tendenz zu einer besseren Erholung in der postischämischen Hypoperfusionsphase, was aber kein Signifikanzniveau erreichte.

Die Perfusion der kontralateralen Hemisphäre war während der Operation in allen Versuchsgruppen unbeeinflusst. Auch hier ergab der statistische Vergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



**Abbildung 34: Laser-Doppler-Fluxmetrie (Studie III, n=7)**  
**ipsilateral - rechte Hemisphäre, Ort der Ischämieinduktion, kontralateral - linke Hemisphäre, Kontrollseite**

### 3.3.3 Gewichtsentwicklung und funktionelles neurologisches Defizit

Am ersten postoperativen Tag fiel das Gewicht der Tiere in allen Gruppen auf etwa 90 % des Ausgangswertes ab, erreichte seinen Tiefpunkt am dritten bzw. vierten Tag und stieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes am siebten Tag wieder auf 90-95 % an. Der Trend der mit 1 und 3 mg/kg/d LF 16-0687 Ms therapierten Tiere zu einer schnelleren postoperativen Gewichtsentwicklung war statistisch nicht signifikant.

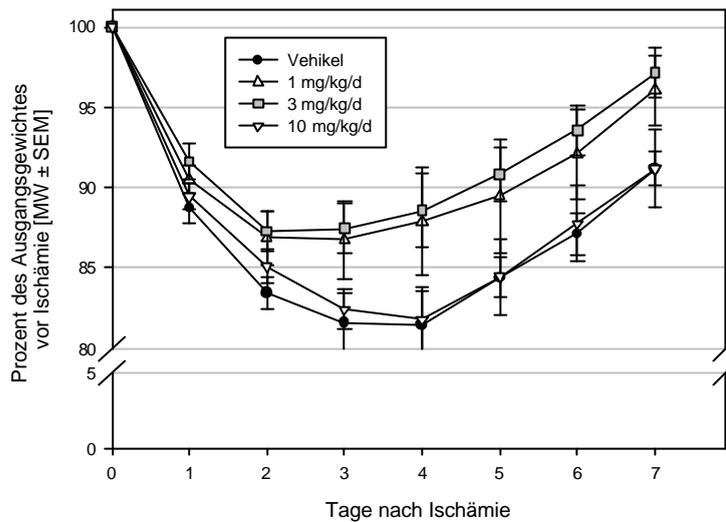


Abbildung 35: Gewichtsentwicklung (Studie III: n=7)

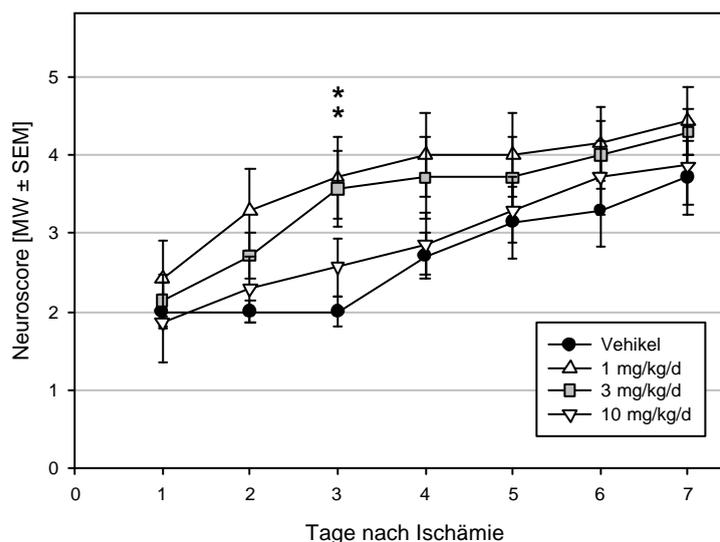


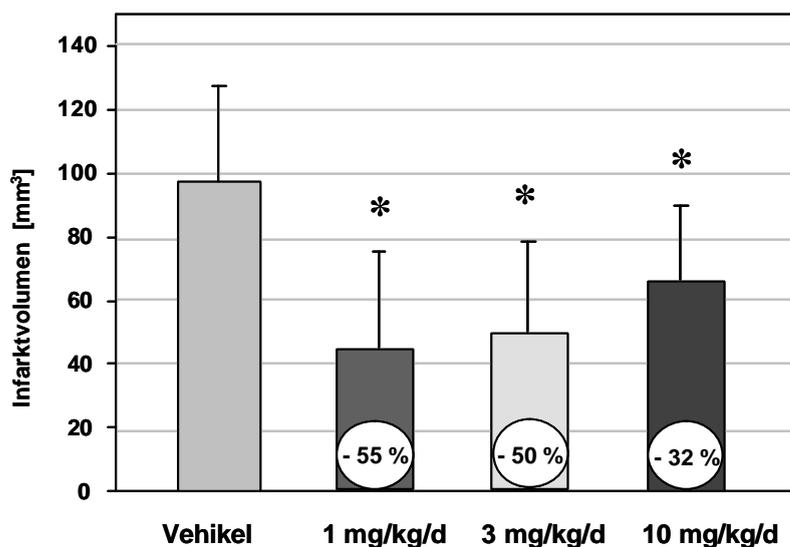
Abbildung 36: Funktionelles neurologisches Defizit (Studie III: n=7)

\*  $p < 0,05$  vs. Vehikel

Bei allen mit LF 16-0687 Ms behandelten Tieren konnte eine Tendenz zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe besseren funktionellen neurologischen Erholung beobachtet werden, was allerdings nur für die mit 1 und 3 mg/kg/d behandelten Tiere am dritten postoperativen Tag statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.4 Infarktvolumen

Die Therapie mit LF 16-0687 Ms konnte in allen Behandlungsgruppen die Ausbildung des Infarktvolumens signifikant reduzieren ( $p < 0,05$ ). Das Infarktvolumen lag in der Kontrollgruppe bei  $97,4 \pm 30,0 \text{ mm}^3$  (MW  $\pm$  SD). In den behandelten Gruppen betragen die Gesamtingfarktvolumina  $43,5 \pm 30,6 \text{ mm}^3$  (-55%) bei 1 mg/kg/d,  $48,6 \pm 28,6 \text{ mm}^3$  (-50%) bei 3 mg/kg/d und  $65,9 \pm 23,2 \text{ mm}^3$  (-32%) bei den mit 10 mg/kg/d LF 16-0687 Ms behandelten Tieren (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37: Gesamtingfarktvolumen (Studie III:  $n=7$ , MW  $\pm$  SD)  
Hemmung der Infarktausprägung am siebten postoperativen Tag  
\*  $p < 0,05$  vs. Vehikel**

Die separate Bestimmung der Infarktvolumina ergab, dass dabei vor allem die Reduktion des kortikalen Infarktvolumens einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anteil hatte. Das kortikale Infarktvolumen betrug bei der Kontrollgruppe  $57,0 \pm 22,6 \text{ mm}^3$ . Bei den mit LF 16-0687 Ms behandelten Tieren war das kortikale Infarktvolumen  $11,6 \pm 19,8 \text{ mm}^3$  in 1 mg/kg/d,  $20,6 \pm 23,2 \text{ mm}^3$  in 3 mg/kg/d und  $24,3 \pm 17,6 \text{ mm}^3$  in mit 10 mg/kg/d LF 16-0687 Ms therapierten

Tieren, das entspricht, in der Reihenfolge, einer Reduktion des kortikalen Infarktvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe von 80 %, 64 % und 57 % ( $p < 0,05$ ).

Die mit 1 und 3 mg/kg/d behandelten Tiere schienen relativ zum subkortikalen Infarktvolumen der Kontrollgruppe, eine geringer ausgeprägte Läsion der Basalganglien zu haben. Ein statistisch signifikanter Effekt der Behandlung mit LF 16-0687 Ms konnte bei Vergleich der Infarktvolumina der Basalganglien (subkortikal) in keiner Behandlungsgruppe nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 38).

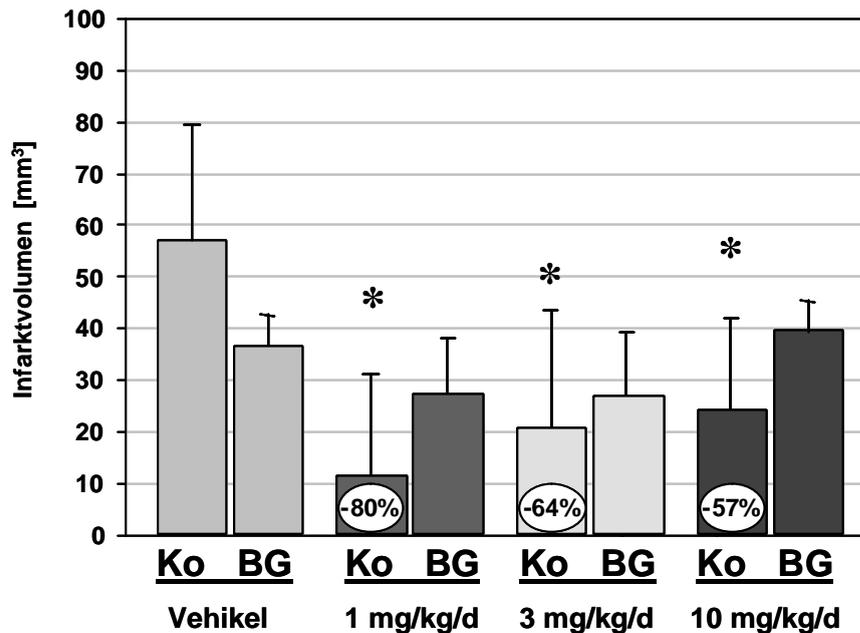


Abbildung 38: Kortikales und subkortikales Infarktvolumen (Studie III:  $n=7$ ,  $MW \pm SD$ )  
Hemmung der Infarktausprägung in Kortex (Ko) und Subkortex (Basalganglien, BG) am  
siebten postoperativen Tag  
\*  $p < 0,05$  vs. Vehikel

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methodik**

#### **4.1.1 Intraluminales Fadenmodell**

Das intraluminale Fadenmodell [109] hat sich als eines der am häufigsten verwendeten experimentellen Modelle zur Untersuchung der Pathophysiologie und Erprobung von Behandlungsstrategien nach fokaler zerebraler Ischämie etabliert. In unserer Arbeitsgruppe existieren bereits langjährige Erfahrungen mit diesem Modell [201, 206, 255-257]:

Die Vorteile zeichnen sich durch eine minimale Invasivität, geringe peri- und postoperative Mortalität und die zeitsparende Operationstechnik aus. Das Modell eignet sich für Fragestellungen nach fokaler temporärer und permanenter Okklusion, als auch in modifizierter Form für Untersuchungen einer experimentell induzierten Subarachnoidalblutung [16].

Vorteile gegenüber anderen Modellen der fokalen zerebralen Ischämie wie beispielsweise dem invasiven Kraniotomiemodel nach Tamura et al. [224] bestehen vor allem darin, dass keine Kraniotomie, Duraverletzung oder Subarachnoidalraumeröffnung erforderlich sind. Der Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranken Permeabilität, den intrakraniellen Druck (ICP) und eine modellbedingte neuroprotektive Hypothermie wird dadurch gering gehalten.

Ein häufig kritisierte Punkt des intraluminalen Fadenmodells ist, dass es nicht die Pathophysiologie eines Schlaganfalls widerspiegelt. Die Versuchstiere weisen nicht wie der Schlaganfallpatient diverse Vorerkrankungen und pathologische Dispositionen wie beispielsweise arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen auf. Die Ergebnisse von im Tierversuch erfolgreich erprobten Therapiestrategien sind daher nur bedingt auf das klinische Patientengut zu übertragen. Allerdings können die pathobiologischen Prädispositionen im kontrollierten experimentellen Rahmen nur schwer geschaffen werden. Hauptziel experimenteller Tierversuche ist, zunächst überhaupt einen therapeutischen Effekt nachweisen zu können. Dazu ist eine optimale Kontrolle der Versuchsbedingungen, wie es das Fadenmodell erlaubt, absolut notwendig. Verweist man auf „vorhersehbare“ fokale zerebrale Ischämien, wie sie bei temporären Clippings in der Neurochirurgie häufig

erforderlich sind, wird auch ein direkter Zusammenhang zu klinischen Anwendungen deutlich.

Andere experimentelle Ansätze, die sich näher an der klinischen Situation orientieren, sind zum Beispiel die fokal embolischen Modelle: ein aus endogenem gewonnenem, fibrinogenem Material hergestellter Embolus induziert die Ischämie. Die Perfusion wird durch die systemische Gabe von rt-PA wiederhergestellt. Häufige Probleme bei diesem Modell sind der hohe technische Aufwand, eine verlängerte Operationsdauer, die schwierige Einstellung der Gerinnungsparameter und die Variabilität der Infarktausmaße. Die Variabilität des Infarktausmaßes ist zum einen bedingt durch eine disseminierte Thrombinverteilung mit Beeinflussung der Durchblutung der kontralateralen Hemisphäre, zum anderen durch den fehlenden manipulativen Einfluss auf den Ort der Okklusion, der nicht absolut kontrolliert werden kann [144, 157, 244, 259, 260].

Das intraluminale Fadenmodell ermöglicht zwar eine exakte Platzierung des Fadens zur Okklusion, hat aber auch Nachteile wie

1. die iatrogen verursachte Induktion einer Subarachnoidalblutung bei Perforation der Gefäßwand,
2. eine ungenügende Reduktion des Blutflusses der A. cerebri media,
3. spontane Reperfusionseignisse,
4. die Thrombosierung des okkludierten Gefäßes infolge einer Umkehrung des Blutstromes,
5. das gelegentliche Vorkommen einer postischämischen Hyperthermie.

Vielen dieser Probleme, die für die in der Literatur diskutierte Variabilität der Infarktausmaße verantwortlich sind [150], kann schon im Vorfeld durch einen entsprechenden Versuchsaufbau vorgebeugt werden.

Um die Faktoren 1,2 und 3 weitgehend auszuschließen, verwendeten wir einen mit silikonbeschichteten Faden, der ein atraumatisches Vorgehen sowie einen sicheren Verschluss gewährleistete.

Die Kontrolle des LCBF mit Laser-Doppler Fluxmetrie ist ein essentieller Bestandteil des Versuchsaufbaus. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es eine gute Korrelation mit dem LCBF hat, was in der Literatur in Vergleichen mit der Autoradiografie [47], mit radioaktiven

Mikrosphären [57] und Wasserstoffclearancemethoden [83] bestätigt wurde. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ebenso gezeigt, dass das Monitoring mit Laser-Doppler-Fluxmetrie die höchste Sensitivität und Spezifität (jeweils 100%) bei der Erkennung einer ungenügenden Okklusion der A. cerebri media hat [206]. Mit dieser Methode kann auf etwaige Reperfusionen unmittelbar durch Reposition des Fadens und auf eine iatrogen induzierte SAB mit dem Abbruch des Versuchs reagiert werden.

Nachteil der Laser-Doppler-Fluxmetrie ist, dass nicht das gesamte Medialstromgebiet mit absoluten Werten erfasst wird, sondern nur relative Veränderungen der Mikrozirkulation in einem kleinen Gewebavolumen von einem Kubikmillimeter (1 mm<sup>3</sup>) gemessen werden können [67]. Eine Neupositionierung der Sonden während des Experiments würde die Messergebnisse verfälschen [47]. Als Ort der Blutflusskontrolle wurde daher ein repräsentativer Abschnitt des Medialstromgebiets erfasst. Die Lokalisation der Sonde wurde so gewählt, dass ein relativer Blutfluss von 400 bis 800 Fluxeinheiten gemessen wurde, was der zerebralen Mikrozirkulation entspricht. Werteverfälschungen durch externes Licht, beispielsweise der Wärmelampe, wurden durch Abdeckung der Sonden mit speziell zurechtgeschnittenen Abschirmtüchern verhindert. Das Versuchsprotokoll wurde erst mit Applikation der Therapie gestartet als stabile Basiswerte des LCBF erreicht wurden. Im Verlauf der Experimente war eine Neupositionierung der Sonden nicht nötig, da die häufigsten externen Störungsquellen weitestgehend ausgeschlossen wurden.

Die in der Literatur berichteten Thrombosierungen der Gefäße im Stromgebiet der A. cerebri media infolge einer Strömungsverlangsamung nach Fadenokklusion [142, 174] konnte in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe bei einer Ischämiedauer von bis zu 90 min nicht nachgewiesen werden [206]. Um jedoch eine Thrombosierung weitgehend auszuschließen, verwendeten wir perioperativ Heparin zur Thromboseprophylaxe.

Eine weitere Komplikation ist das Auftreten einer spontanen Hyperthermie [143, 261]. Intraoperativ wurde die Temperatur exakt geregelt, um dem Auftreten von Temperaturschwankungen mit Einfluss auf das Versuchsergebnis vorzubeugen. Bereits geringe Temperaturschwankungen könnten das Versuchsergebnis beeinträchtigen [30]. In eingehenden Vorversuchsreihen unserer Arbeitsgruppe wurde das Auftreten von postischämischen Hyperthermien nicht beobachtet, wenn die Ischämiezeit nicht länger als 90 Min betrug. Dieser Befund wird auch von Li et al. bestätigt, die das Auftreten einer spontanen postoperativen Hyperthermie erst ab einer Ischämiedauer von mehr als zwei Stunden beobachten konnten [121].

Nach Informationen der Herstellerfirma gibt es keinen Anhaltspunkt für die Beeinflussung der endogenen Temperaturregulation durch die Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors mit LF 16-0687 Ms.

Die Kontrolle der physiologischen Parameter arterieller Blutdruck und Blutlaborwerte sowie die Steuerung der Narkose und Beatmung sind ein weiteres wichtiges Standbein standardisierter Versuchsbedingungen.

Die Beeinflussung des mittleren arteriellen Drucks, z.B. durch den operativen Eingriff oder die applizierte Medikation, hat einen wesentlichen Einfluss auf das Versuchsergebnis. Blutdruckschwankungen haben auf die zerebrale Autoregulation im physiologischen Rahmenbereich keinen Einfluss.

Wir führten unsere Versuche unter Halothan- und Lachgas-Narkose durch. Lachgas (N<sub>2</sub>O) wirkt vasodilatatorisch. Halothan erhöht den LCBF und kann in hohen Konzentrationen die zerebrale Autoregulation außer Kraft setzen [98]. Eine längerdauernde Halothannarkose mit Konzentrationen ab 2 % verringert den Blutdruck und kann einen reduzierenden Effekt auf das Hirnödem durch Verminderung der postischämischen Hyperämie haben [31].

Wir haben daher während der Versuche den arteriellen Blutdruck über einen Katheter aufgezeichnet und die Narkose mit einer Halothankonzentration von 0,8 % gefahren [255].

Weitere Einflüsse auf das Infarktvolumen und das Ödemausmaß wie

- veränderte Blutgaszusammensetzungen oder Blutglukosewerte
- umgekehrte Konzentrationsverhältnisse von festen zu flüssigen Blutbestandteilen durch Überwässerung oder Flüssigkeitsdeprivation [158]
- zirkadiane Rhythmik [235]

konnten durch die Verwendung eines einheitlichen Versuchsprotokolls eliminiert werden.

Die Aufzeichnung dieser Parameter ermöglichte es außerdem, Einflüsse der Therapie auf diese Parameter zu untersuchen.

#### **4.1.2 Funktionelle Erholung**

In der Klinik sind das neurologische Gesamtbild und das funktionelle Therapieergebnis entscheidende Parameter zur klinischen Beurteilung eines Schlaganfallpatienten. Auch in der experimentellen Forschung ist daher neben den quantitativen Zielparametern

Infarktvolumen und Hirnschwellung, eine neurologische Stuserhebung der Tiere unerlässlich. Es konnte bei Ratten gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der funktionellen Erholung eine gute Korrelation mit dem Ausmaß des Infarktvolumens im postoperativen Zeitraum von sieben Tagen hat [256]. Wir verwendeten den nach Bederson et al. [17] modifizierten Neuroscore, der die motorischen Defizite der Tiere erhebt. Der Neuroscore ist gut reproduzierbar und wurde stets zur gleichen Zeit zwischen 17:00 und 20:00 Uhr erhoben, um der zirkadianen Rhythmik der Tiere Rechnung zu tragen: Ratten sind nachtaktiv, ein tagsüber reproduzierter Score würde eine verlangsamte motorische Erholung suggerieren [235].

Die Gewichtsentwicklung, die als Indikator für den Allgemeinzustand der Tiere nach der Operation dient, wurde analog zur gleichen Zeit protokolliert.

### **4.1.3 Gravimetrie**

Die Messung des Hirnödems erfolgte 48 h nach Ischämie, da das Maximum der Ödemausbreitung nach fokaler zerebraler Ischämie von 90 min Dauer innerhalb der ersten 48 h erreicht wird [78, 85, 130, 146, 153].

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden die Hemisphären für 24 h bei 110°C getrocknet und nach diesem Zeitraum erneut gewogen. Zu diesem Zeitpunkt ist Gewichtskonstanz erreicht [220]. In einigen Literaturstellen wird auch ein Zeitraum von 48 h und länger empfohlen [78, 85, 86]. In Vorversuchen konnte für das hier verwendete Modelle kein Unterschied zwischen den nach 24 h und 48 h gewogenen Gehirnhemisphären festgestellt werden, ein Trockenzeitraum von 24 h wurde daher für diese Studie festgelegt.

Die Gravimetrie hat sich als eine effiziente, schnelle und kostengünstige Methode zur Quantifizierung des Hirnödems nach experimenteller zerebraler Ischämie und Schädel-Hirn-Trauma etabliert.

Die Gravimetrie hat im Vergleich zur Mikrogravimetrie folgenden Vorteil: Bei der Mikrogravimetrie werden geringere Gewebemengen untersucht, das restliche Gewebe steht damit für andere Untersuchungen zur Verfügung. Da mit dieser Methode nur ein bestimmter Hirngewebsbereich untersucht wird, kann das Gesamtausmaß der Schädigung nicht ermittelt werden. Der pathologisch veränderte LCBF in der untersuchten Läsionsregion würde außerdem die Ergebnisse empfindlich verfälschen [213]. Die Gravimetrie hingegen berücksichtigt das Gesamtausmaß der Hirnschwellung jeder Hemisphäre.

Bei der Berechnung der Hirnschwellung wurde in unserem Modell keine Eliminierung des Trennfehlers, wie sie in der traumatischen Hirnforschung verwendet wird [7, 166, 220], vorgenommen. Die mathematische Eliminierung des Trennfehlers beruht auf der Annahme, dass der wesentliche Anteil des traumatischen Hirnödems vasogen ist und damit ein Ultrafiltrat des Blutplasmas darstellt. Bei paralleler Bestimmung des Feucht- und Trockengewichtes einer definierten Menge von Blutplasma, kann durch mathematische Berechnung der Trennfehler eliminiert werden. Diese Annahmen treffen allerdings bei der fokalen zerebralen Ischämie nicht zu. Das Ödem nach fokaler zerebraler Ischämie ist ein zytotoxisches und vasogenes Mischödem, diese beiden Formen können zeitlich und räumlich mit den derzeitigen technischen Hilfsmitteln nicht exakt voneinander getrennt werden. Das zytotoxische Ödem ist kein Ultrafiltrat des Plasmas, sein zeitlicher Beginn und sein Anteil am ischämischen Hirnödem kann mit entsprechenden technischen Voraussetzungen mittels hochauflösender MRT dargestellt werden [130, 153]. Eine exakte mathematische Eliminierung eines Trennfehlers ist ex vivo in unserem Modell nicht möglich.

Daher rührt auch ein entscheidender Nachteil der Methode. Zur Beherrschung der Technik ist eingangs eine hohe Anzahl an Übungsversuchen erforderlich, um den Trennfehler unter 1,5 % zu halten. Nur Tiere, die dieses Kriterium erfüllten, wurden in die Studie eingeschlossen. Der Trennfehler wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Trennfehler (\%)} = \left[1 - \left(\frac{DW_{\text{non-isch}}}{DW_{\text{isch}}}\right)\right] \times 100$$

Daraus abgeleitet würde sich bei gleichem Trockengewicht der ischämischen ( $DW_{\text{isch}}$ ) und der nicht-ischämischen Hemisphäre ( $DW_{\text{non-isch}}$ ), also bei exakter Trennung in der Mitte ein Trennfehler von 0 % ergeben. Der Quotient würde bei Abweichung zur nicht-ischämischen Hemisphäre größer ( $>1$ ), bei Abweichung zur ischämischen Hemisphäre kleiner eins ( $<1$ ) sein und entsprechend würde der Trennfehler negativ bzw. positiv werden. Da die Kontrolle dieser Werte nach 24 h (Trockenzeit bei 110°C) direkt erfolgen kann, ist eine Einarbeitung und Anpassung der Technik durch diesen Lerneffekt unmittelbar möglich.

Die in Vorstudien bestimmte physiologische Gewichtsabweichung der linken Hemisphäre, die zu etwa  $0,78\% \pm 0,66\%$  schwerer ist als die rechte Hemisphäre wurde analog zu anderen Autoren von uns nicht berücksichtigt [7, 166].

Ein weiterer methodischer Nachteil der Gravimetrie besteht in der naturgemäßen Unmöglichkeit, die Ödementwicklung innerhalb eines Individuums zu verfolgen, wie es die

MRT erlaubt. Diese moderne Technik erfordert allerdings entsprechende institutionelle, finanzielle und logistische Voraussetzungen. Früher waren modifizierte Verlaufsbeobachtungen dementsprechend nur mit einer hohen Tierzahl zu bewältigen [85]. Um Effekte einer neuroprotektiven Therapie mittels MRT zu evaluieren, sind entsprechende logistische Voraussetzungen erforderlich, die im Rahmen dieser Studie nicht gegeben waren. Ein MRT zu Forschungszwecken stand nicht zur Verfügung und hätte bei entsprechender Nutzung von klinischen Einrichtungen, den klinischen Erfordernissen untergeordnet werden müssen, so dass eine zeitlich exakte Bestimmung der Ödementwicklung nicht möglich gewesen wäre.

Auf der anderen Seite ist die Gravimetrie bei Beherrschung der Technik eine mit relativ geringem technischen Aufwand zu bewältigende, effiziente und schnelle Methode, um die Effekte einer neuroprotektiven Therapie innerhalb des Akutzeitraumes der Hirnschwellung von 48 h zu evaluieren. Dies war genau das Ziel der Studie II, und wir entschieden uns daher für diese Methode.

#### **4.1.4 Infarktvolumen**

Um die Wirkung der neuroprotektiven Therapie optimal beurteilen zu können, ist neben der funktionellen klinischen Erholung die Evaluierung des Infarktvolumens notwendig [206]. Die alleinige Auswertung von Infarktvolumina erlaubt keine Rückschlüsse auf physiologische Funktion oder inter- / intraneuronale Vernetzungen, und reicht als alleiniger Parameter zur Bewertung der Therapie nicht aus.

Bei der Bestimmung des Infarktvolumens ist die Wahl des richtigen Zeitpunktes entscheidend: bei zu früher Evaluierung innerhalb der ersten drei Tage würde das Infarktvolumen fälschlicherweise als zu klein bewertet werden, da das Gesamtausmaß noch nicht erreicht ist [40]. Nach Garcia et al. kann am siebten postoperativen Tag von einem abgeschlossenen Infarktwachstum ausgegangen werden [68].

Um der zirkadianen Rhythmik der Tiere Rechnung zu tragen [235], wurden die Tiere stets zur gleichen Tageszeit operiert und die Gehirne zu einem einheitlichen Zeitpunkt am siebten postoperativen Tag entnommen.

Ein Nachteil ist, wie bei der Gravimetrie, die fehlende Möglichkeit einer Verlaufskontrolle innerhalb eines Versuchstieres. Ziel der Studien I und III war es, eine exakte Statuserhebung des Infarktvolumens am siebten postoperativen Tag anzufertigen. Zur Verlaufsbeobachtung diente uns die auch in der Klinik relevantere funktionelle neurologische Erholung.

Für die genaue Bestimmung des Infarktvolumens wird ein Minimum von acht repräsentativen Schnitten gefordert [156]. Wir verwendeten 24 mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte, die das gesamte Infarktareal enthielten. Es konnten keine Unterschiede bei den untersuchten Gehirnen zwischen den Volumina der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären festgestellt werden. Eine Korrektur des Hirnvolumens oder Ödems mittels indirekter Berechnung war daher nicht erforderlich [8, 123].

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Studie I

In der ersten Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade des B<sub>2</sub>-Rezeptors mit LF 16-0687 Ms in der Dosierung von 12 mg/kg/d (Low Dose) die funktionelle neurologische Erholung an dem dritten und vierten postoperativen Tag verbesserte und die Infarktbildung nach temporärer fokaler zerebraler Ischämie signifikant verringerte. Physiologische Kontrollparameter wie der mittlere arterielle Blutdruck, Blutgase oder der lokale zerebrale Blutfluss wurden durch die Therapie nicht beeinflusst. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bei der postoperativen Gewichtsentwicklung festgestellt werden.

#### 4.2.1.1 Dosierung und Applikationsintervall

Neben dem pharmakologischen Profil von Laboratoires Fournier lagen uns zum Zeitpunkt der Planung der ersten Studie Daten einer Arbeitsgruppe im gleichen Haus vor, welche die B<sub>2</sub>-Rezeptorblockade mit LF 16-0687 Ms bei fokaler Kälteläsion bei Ratten untersuchte [210]. Sie verwendeten eine Dosis von 10 µg/kg/min und 100 µg/kg/min als intravenöse kontinuierliche Applikation über 24 h. Das entspricht einer Tagesdosis von 14,4 mg/kg/d bzw. 144,4 mg/kg/d. Die niedrigere Dosierung (14,4 mg/kg/d) war bei Hemmung der Ödembildung signifikant wirksam.

Wir entschlossen uns dazu, unter Berücksichtigung des pharmakologischen Profils und der unterschiedlichen Pathophysiologie, empirisch den Dosisbereich unserer Studie einzugrenzen und verwendeten für unsere Versuche 12 mg/kg/d als Low Dose und 36 mg/kg/d als High Dose Therapie, die wir subkutan applizierten. Mit dieser Dosierung und Darreichungsform konnten wirksame Plasmakonzentrationen erreicht werden (vgl. Material und Methoden).

Es ist nur wenig über die B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung bei fokaler zerebraler Ischämie bekannt. Relton et al. berichteten über eine signifikante Hemmung der Ödementwicklung in der ischämischen Hemisphäre bei kontinuierlicher subkutaner Applikation von CP-0597, einem peptidischen B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten, nach fokaler zerebraler Ischämie [189]. Um die Wirksamkeit des bisher nur in der SHT-Forschung verwendeten Antagonisten LF 16-0687 Ms bei zerebraler Ischämie zu überprüfen, entschieden wir uns dazu, die Therapie vor

Induktion der Ischämie zu beginnen. Dadurch konnte bereits ein Anfluten und ausreichender Wirkspiegel zum Zeitpunkt der Ischämie gewährleistet werden. Ein klinisches Korrelat dieser Applikationsform wäre beispielsweise die medikamentöse Neuroprotektion vor intraoperativem Clipping in der Neurochirurgie.

Die nach einer fokalen zerebralen Ischämie entstehende Hirnschwellung ist für Schlaganfallpatienten innerhalb der ersten zwei Tage die häufigste Komplikation, die mit einer hohen Mortalität einhergeht [27, 62, 113, 211]. Im Tierversuch bei der Ratte wird das Maximum der Ödementwicklung nach temporärer fokaler zerebraler Ischämie innerhalb von 48 h erreicht. Folgende Untersuchungen stützen diese Aussage:

Ein signifikanter Anstieg des zerebralen Wassergehaltes wird ab drei Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte gemessen, der sein Maximum am dritten Tag nach Insult erreicht hat und danach kontinuierlich abfällt [78]. Menzies et al. beobachteten nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte ein Maximum des Hirnödems nach 24 h, das für etwa drei Tage konstant blieb und schließlich über die folgenden drei Wochen zurückging [146]. Dies wird von Hatshita et al. bestätigt, der bei einer großen Versuchsreihe, den zerebralen Wassergehalt nach fokaler zerebraler Ischämie untersuchte. Das Maximum wurde am dritten Tag nach Ischämie erreicht und gradueller Rückgang konnte über die folgenden sieben Tage festgestellt werden [85]. Experimentelle Untersuchungen nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte konnten das Infarktareal mittels ADC- (Apparent Diffusion Coefficient) und T2-gewichteter Sequenzen im MRT nach sieben Stunden eingrenzen. Eine weitere Ausdehnung des Infarktareals wird danach von dem Ausmaß des resultierenden Hirnödems bestimmt [130]. Wie Neumann-Haefelin et al. in ihren Versuchsreihen ermittelten, kommt es erst bei einer fokalen zerebralen Ischämie von mehr als 60 min Dauer zu einer signifikanten Blut-Hirn-Schranken Schädigung, dessen Ausbreitung in T2-gewichteten Sequenzen innerhalb der ersten zwei Tage nach Insult bei der Ratte dargestellt werden konnte [153].

Wir entschlossen uns daher dazu, den Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten über einen Zeitraum von zwei Tagen nach Ischämie fortzusetzen, um den Zeitraum der Infarkt- und Ödementwicklung nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte therapeutisch optimal abzudecken. Die subkutane Medikamentengabe erlaubte es, entsprechend der gewählten Dosierungszeitpunkte, eine wirksame Plasmakonzentration konstant aufrechtzuerhalten, ohne die Tiere dabei erneut in Narkose versetzen zu müssen.

#### 4.2.1.2 Low Dose versus High Dose

Die Ergebnisse der ersten Studie warfen die Frage auf, warum ein kompetitiver Antagonist des Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors mit einer Dosis von 12 mg/kg/d neuroprotektiv wirksamer ist als bei etwa dreifach höherer Dosisierung von 30 mg/kg/d.

Die Arbeitsgruppe von Relton et al., welche mit dem Peptid B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0597 neuroprotektive Effekte nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten nachweisen konnte [189], machte vergleichbare Beobachtungen: Eine Dosis von 100 und 300 ng/kg/min (miniosmotischen Pumpen im Subkutangewebe über 24 h) sind nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte neuroprotektiv wirksam. Dosierungen von 1000 ng/kg/min zeigten hingegen keine signifikante Beeinflussung des Infarktvolumens oder der funktionellen neurologischen Erholung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

LF 16-0687 Ms zeigte in unseren Versuchen weder eine signifikante Beeinflussung physiologischer Kontrollparameter (wie unter anderem mittlerer arterieller Blutdruck, Blutgase, Hämatokrit, Hämoglobin, LCBF), noch wiesen die mit der höheren Dosis (30 mg/kg/d, High Dose) behandelten Tiere eine erhöhte Mortalität auf. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die verminderte Wirksamkeit der Therapie mit High Dose LF 16-0687 Ms durch Nebenwirkungen auf die Blutzusammensetzung oder das Herzkreislaufsystem hervorgerufen worden ist.

Da LF 16-0687 Ms hochspezifisch an den Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor bindet und keine Interaktionen mit dem B<sub>1</sub>-Rezeptor hat [172] ist es unwahrscheinlich, dass eine zusätzliche Blockade von B<sub>1</sub>-Rezeptoren mit hohen Dosen von LF 16-0687 Ms zustande kam, die das Infarktvolumen beeinflussen kann. Relton et al. untersuchten die Wirkung von einem B<sub>1</sub>- und einem B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten: eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mit CP-0597 reduziert das Ausmaß des Infarktvolumens, die alleinige B<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade mit B9858 zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Infarktvolumen der Kontrollgruppe und die kombinierte Therapie der beiden B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten beeinflusste sich gegenseitig anscheinend so, dass ein durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Block neuroprotektiver Effekt im Prinzip durch die gleichzeitige Applikation eines B<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben wurde [188].

Nach fokaler Kälteläsion bei Ratten und Mäusen kommt es bei kombinierter Blockade von B<sub>1</sub>- (B 9858) und B<sub>2</sub>-Rezeptoren (HOE-140) zu keiner additiven neuroprotektiven

Wirksamkeit im Vergleich zu einer alleinigen Administration des B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten, die signifikant das Hirnschwellungsausmaß eindämmte [76].

Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch eine länger anhaltende Wirkung bei Therapie mit High Dose LF 16-0687 Ms am Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor, beispielsweise durch Akkumulation vermehrt freies Bradykinin zur Verfügung steht, um an den B<sub>1</sub>-Rezeptor zu binden. Der B<sub>2</sub>-Rezeptor ist konstitutiv vorhanden, der B<sub>1</sub>-Rezeptor wird unter normalen physiologischen Bedingungen nicht exprimiert. Erst chemische, mechanische oder inflammatorische Stimuli verursachen eine Hochregulierung der B<sub>1</sub>-Rezeptoren [84, 168, 252]. Inflammatorische Zytokine und Entzündungszellen, die bei zerebraler Ischämie [43, 69] freigesetzt werden, sind potente Stimulatoren einer B<sub>1</sub>-Rezeptor-Induktion [141, 197]. Eine B<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung führt zu einer Ödembildung und Leukozytenaktivierung [41, 137]. Eine gesteigerte Induktion und Aktivierung von B<sub>1</sub>-Rezeptoren im Zuge der fortgesetzten Therapie mit LF 16-0687 Ms während der zwei postischämischen Tage kann bei unseren Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung von B<sub>2</sub>-Rezeptoren bewirkt eine Vasodilatation (vgl. 1.3 Kallikrein-Kinin-System). Eine vollständige Blockade der B<sub>2</sub>-Rezeptoren durch LF 16-0687 Ms in hoher Dosierung könnte die gefäßerweiternden Eigenschaften von Bradykinin unterbunden und damit die Substratversorgung des Gehirns zusätzlich eingeschränkt haben. In unseren Untersuchungen zeigte die Low Dose Gruppe einen nicht-signifikanten Trend zu einer postischämischen Hyperperfusion. Allerdings muss diese Beobachtung im Vergleich zur High Dose, bei der diese Effekte nicht auftraten, relativiert werden. Wir beobachteten den LCBF nur während der akuten Versuchsphase. Eine Kontrolle des LCBF war damit auf den Zeitraum von Ischämiebeginn (einschließlich vorangehender Beobachtungsphase) bis eine Stunde nach Reperfusion beschränkt. Spätere Schwankungen des LCBF außerhalb unseres Beobachtungsfensters, wo eine veränderte Ansprechbarkeit auf Bradykinin möglich ist, können daher nicht ausgeschlossen werden. Das in unseren Versuchen durch LDF beobachtete Areal liegt in einem von der A. cerebri media versorgten Bereich, für andere Hirnregionen können daher keine Aussagen gemacht werden.

Gorlach et al. konnten zeigen, dass in 24 h nach fokaler Kälteläsion entnommenen zerebralen Gefäßen die vasodilatatorische Reaktion auf Bradykinin um 43 % vermindert, in nach 48 h fokaler Kälteläsion entnommen zerebralen Gefäßen die Reaktion unverändert gegenüber der nicht operierten Kontrollgruppe war [75].

Lehberg et al. fanden nach globaler zerebraler Ischämie bei Wüstenmäusen heraus, dass eine B<sub>2</sub>-, aber nicht eine B<sub>1</sub>- oder kombinierte B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade in der Frühphase der Reperfusion signifikant zu einer Verminderung des arteriölen Gefäßdurchmessers im ischämischen Areal führte, ohne dabei die Mortalität der B<sub>2</sub>-behandelten Tiere zu beeinflussen. Die Mortalität war hingegen bei den B<sub>1</sub>- bzw. kombiniert B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>-Blocktherapierten Tieren signifikant erhöht. Ob eine durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung verursachte Verminderung des arteriölen Gefäßdurchmessers in unserem Modell zu einer veränderten neurologischen Erholung und Infarktausbildung geführt hat, können wir anhand unseres Versuchsaufbaus nicht beurteilen.

Weiterhin ist zu diskutieren, ob eine postischämische Hypoperfusion in unserem Versuchsmodell überhaupt eine Outcome-beeinflussende Rolle spielte. Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Dextromethorphan, ein NMDA-Rezeptor-Antagonist und Kalziumkanal-Blocker, in dem gleichen Versuchsmodell eine postischämische Hypoperfusion verhinderte ohne dabei einen Einfluss auf die neurologische Erholung oder das Infarktvolumen zu haben [207]. Antioxidanzien wie Tirilazad oder U-101033E hingegen hatten signifikante neuroprotektive Eigenschaften, ohne einen Einfluss auf den LCBF auszuüben [208, 209].

LF 16-0687 Ms bindet hochspezifisch an den Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor, hat aber auch eine Selektivität für muskarinische M<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptoren ab IC<sub>50</sub>-Werten von jeweils 0,30 µM und 0,46 µM. Eine Blockade muskarinischer Rezeptoren bei Applikationen von LF 16-0687 Ms mit 30 mg/kg/d, bei der Plasmakonzentrationen von bis zu 1,2 µM erreicht werden können, ist daher nicht auszuschließen [172].

Der Verlust cholinergischer Neurone verursacht eine Verminderung der kognitiven Fähigkeiten, insbesondere des Kurzzeitgedächtnisses, und wird bei Demenzen des Alzheimer-Typs und vaskulären Ursprungs beobachtet [114]. Nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einem Untergang cholinergischer Neurone und einem damit verbundenen kognitiven Defizit der räumlichen Orientierung von Ratten. Eine medikamentöse Erhöhung der Acetylcholinausschüttung nach Trauma verbesserte die neurologische Erholung [48, 165].

Nach transients globaler zerebraler Ischämie ist die Genexpression und Bindungsfähigkeit an M<sub>1</sub>-Rezeptoren verringert. Die postischämische Gabe eines M<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten verhinderte den Untergang cholinergischer Neurone [97, 155].

Die Blockade von muskarinischen Rezeptoren bei Gabe von LF 16-0687 Ms mit einer Dosierung von mehr als 30 mg/kg/d kann also theoretisch negative Auswirkungen auf das kognitive Verhalten haben, und somit die schlechtere neurologische Erholung und das

größere Infarkt volumen der mit 36 mg/kg/d LF 16-0687 Ms (High Dose) behandelten Tiere erklären.

## 4.2.2 Studie II

In der zweiten Studie konnten wir durch direkte Messung des Wassergehaltes der Hemisphären zeigen, dass die Blockade von B<sub>2</sub>-Rezeptoren mit LF 16-0687 Ms die Entwicklung einer postischämischen Hirnschwellung in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie nach 48 h signifikant hemmt. Ein Einfluss der Therapie auf die physiologischen Parameter mittlerer arterieller Blutdruck, lokaler zerebraler Blutfluss und Blutgase konnte auch in dieser Versuchsreihe nicht beobachtet werden.

### 4.2.2.1 B<sub>2</sub>-Rezeptorblockade und Ödembildung

Das von einer Arterie versorgte Kerngebiet wird unmittelbar und irreversibel nach fokaler zerebraler Ischämie geschädigt. Die Penumbra um den ischämischen Kern herum wird durch akut innerhalb weniger Stunden einsetzende und über Tage bis Wochen andauernde inflammatorische Prozesse in Mitleidenschaft gezogen (=sekundärer Hirnschaden) [14, 27, 214, 215]. Nach fokaler zerebraler Ischämie werden inflammatorische Mediatoren, wie unter anderem Aktivatoren des Kallikrein-Kinin-Systems [102, 236], exprimiert.

Bradykinin ist ein Mediator, der die Entstehung eines vasogenen Hirnödems durch Vasodilatation und Erhöhung der vaskulären Permeabilität fördert [237]. Die neuroprotektive Wirksamkeit einer B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade wird durch folgende Feststellungen untermauert:

Eine Hemmung von Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptoren durch LF 16-0687 Ms verminderte signifikant das Hirnödemausmaß in experimentellen Studien bei Schädel-Hirn-Trauma [103, 104, 166, 170, 175, 210, 221, 222]. Eine B<sub>2</sub>-Rezeptor Blockade mit dem Peptid-Antagonisten CP-0597 verminderte bei kontinuierlicher intravenöser Applikation über 24 h die Infarktausbreitung nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten [189]. Nach globaler zerebraler Ischämie wurden erhöhte Bradykininwerte und erhöhte zerebrale Wassergehalte bei Ratten gemessen, die jeweils ihr Maximum nach einer halben Stunde erreichten und danach kontinuierlich abfielen [102].

Bradykinin hat in Blut und Gehirn eine Halbwertszeit von ungefähr 30 Sekunden [105, 243]. Wie weiter oben bereits diskutiert, wird das Maximum des Hirnödems nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte innerhalb der ersten drei Tage erreicht [78, 85, 130, 146, 153].

Es stellt sich nun die Frage, ob Bradykinin noch Stunden bis Tage nach fokaler zerebraler Ischämie an der Entwicklung eines Hirnödems beteiligt ist und unsere Dosierung über die folgenden zwei postischämischen Tage gerechtfertigt war. Ein Widerspruch scheint dabei zu

sein, dass Bradykinin auf der einen Seite ein potenter Mediator des sich über Stunden bis Tage ausbildenden Hirnödems ist, auf der anderen Seite aber nur eine kurze Halbwertszeit hat.

Ein Schlaganfall wird heutzutage als fortdauernder inflammatorischer Prozess verstanden [14, 63, 217]. Unmittelbar nach zerebraler Ischämie werden verschiedene Enzymsysteme aktiviert: bei Schlaganfallpatienten konnten im Blutplasma erhöhte Konzentrationen von Kallidin, dem Gewebskinin, gemessen werden [236]. Die Bildung von Kallidin wird von dem Enzym Tissue Kallikrein katalysiert [20]. Die Minderperfusion und Substratmangelversorgung nach fokaler zerebraler Ischämie schädigt die Gefäßwand von zerebralen Arterien [27, 215] und fördert die Kontaktaktivierung von Hagemann Faktor, der die Umwandlung von Prekallikrein zu Kallikrein katalysiert. Es erscheint daher plausibel, dass die Neubildung von Kininen durch Entzündungsreaktionen nach zerebraler Ischämie angeregt wird.

Das Kallikrein-Kinin-System besitzt zusätzlich einen eigenen Feedbackmechanismus, der die stete Bildung von Kininen fördert. Das Enzym Kallikrein katalysiert, neben der Umwandlung inaktiver Kinin-Vorstufen, gleichzeitig die Aktivierung von Hagemann Faktor (XII -> XII<sub>a</sub>, siehe weiter oben). Dadurch wird ein positiver Feedback-Mechanismus in Gang gesetzt, der eine kontinuierliche Aktivierung von Kallikrein und eine Bildung von Kininen gewährleistet [20].

Schließlich ist Bradykinin selbst ein potenter Mediator [1, 64, 84], der die Inflammation nach zerebraler Ischämie aufrechterhält und verstärkt. Die Aktivierung von B<sub>2</sub>-Rezeptoren führt wie weiter oben beschrieben zu einer Expression von Zytokinen, wie IL-6 [212], Freisetzung von Prostaglandinen [72], NO [77] und freien Radikalen [194, 218], allesamt bekannte Mediatoren eines Zellschadens bei zerebraler Ischämie [27].

Es gibt nur wenige Studien, die das zeitliche Profil der Kininbildung nach zerebraler Ischämie untersucht haben: Während dreistündiger bilateraler Karotisokklusion bei spontan hypertensiven Ratten konnte ein signifikanter Anstieg der Bradykininkonzentration im Gehirn und Blutplasma festgestellt werden. Das Maximum war 30 min nach Reperfusion erreicht und fiel daraufhin ab [102]. Dieser Abfall scheint aber an das verwendete Versuchsmodell nach globaler zerebraler Ischämie gebunden zu sein, die pathophysiologisch von der fokalen zerebralen Ischämie abweicht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zu späteren Zeitpunkten außerhalb des Beobachtungszeitraumes die Kininkonzentration wieder ansteigt, wie es beispielsweise bei einem Flüssigkeitsperkussionstrauma bei Ratten beobachtet werden konnte [54]. Bei Menschen entwickelt sich das Hirnödem nach globaler zerebraler Ischämie über einen längeren Zeitraum [15, 96]. Spätere Schwankungen von Kininkonzentrationen können bei Normalisierung der Durchblutung nach globaler zerebraler Ischämie mit einer verstärkten Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems auftreten. Bei

Patienten mit stenotisch verengten Karotiden beispielsweise konnte vor Operation ein erhöhter Verbrauch von Plasma Kininogen (HMWK) gemessen werden. Nach korrigierenden neurochirurgischen Eingriffen war dieser Kininogenverbrauch signifikant geringer. Eine Reduktion von Kininogenen in Gehirn-versorgenden Arterien ist ein indirektes Zeichen für die Bildung von Kininen. [136].

Den bisher aussagekräftigsten Hinweis für eine kontinuierliche Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems nach zerebraler Ischämie liefert eine klinische Studie: bei Patienten mit schwerem Schlaganfall (*National Institute of Health Stroke Scale*: NIHSS > 8) konnten erhöhte Kallidinkonzentrationen in peripheren Blutproben über acht Tage nach Insult gemessen werden [236].

Eine Blockade von B<sub>2</sub>-Rezeptoren durch LF 16-0687 Ms über 48 h erschien uns aufgrund dieser Befunde gerechtfertigt.

Das nach fokaler zerebraler Ischämie entstehende Ödem setzt sich aus einem zytotoxischen und vasogenen Hirnödemen zusammen. Die genaue zeitliche Abgrenzung dieser beiden Formen ist mit MRT-Untersuchungen (z.B. DWI, Diffusions-Perfusions-Wichtung) möglich [63, 130, 153]. Unsere Ergebnisse erlauben allerdings keinen Rückschluss auf den Gesamtbeitrag der jeweiligen Ödemart noch auf den Einfluss, den eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade genau auf ein zytotoxisches bzw. vasogenes Hirnödem ausübt.

Unbeantwortet bleibt auch die Frage, ob die neuroprotektiven Eigenschaften von LF 16-0687 Ms auf der Blockade von neuronalen, vaskulären B<sub>2</sub>-Rezeptoren oder beiden beruhen.

Konsequenter Weise muss im Anschluss diskutiert werden, ob Stunden oder Tage nach zerebraler Ischämie B<sub>1</sub>-Rezeptoren induziert werden und dadurch Mechanismen in Gang gesetzt werden, die eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade neuroprotektiv erstrebenswert oder eben unerwünscht machen. Es gibt derzeit keine Literaturstelle, die eine zeitliche Eingrenzung des Zeitpunktes einer B<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung im Zentralen Nervensystem untersucht hat. Lediglich Studien an peripheren Inflammodellen konnten zeigen, dass die Induktion durch Lipopolysaccharide beim Hasen fünf Stunden [186] und sogar 12-24 Stunden bei der Ratte [227] dauern können. Für die Blockade von B<sub>2</sub>-Rezeptoren als neuroprotektive Maßnahme sprechen unter anderem die Ergebnisse unserer Versuchsreihe bei der fokalen zerebralen Ischämie, sowie die Untersuchungen von Relton et al. [189]. Eine kombinierte Blockade von B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren nach permanenter zerebraler Ischämie bei Ratten scheint sogar einen gegensinnigen Einfluss auf das neurologische Outcome und das

Infarkt volumen zu haben: bei zusätzlicher Applikation eines B<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wird der bei alleiniger B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung beobachtete neuroprotektive Effekt nicht mehr beobachtet und weist keinen Unterschied zu den Kontrolltieren auf [188].

Nach fokaler Kälteläsion konnte gezeigt werden, dass durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade eine signifikante Reduktion des Läsionsausmaßes bei Ratten und der Hirnschwellung bei Mäusen erreicht werden kann. Die zusätzliche Administration eines B<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten konnte keine signifikant kleinere Schadensausprägung produzieren. Eine alleinige B<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade hatte keinen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe [76]. Nach fokaler Kälteläsion entsteht ein vasogenes Hirnödem [108, 166].

Lehmberg et al. untersuchten in einem Tiermodell der globalen zerebralen Ischämie bei Wüstenmäusen die Effekte einer B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>- und kombinierten B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade im ZNS. Sie fanden heraus, dass die Behandlung mit einem B<sub>1</sub>- oder B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten über einen Zeitraum von vier Tagen nach globaler zerebraler Ischämie die Mortalität der Tiere signifikant gegenüber den mit B<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten behandelten Tieren erhöhte. Jede Therapie konnte die Leukozytenaktivierung in der Frühphase der Reperfusion nach globaler zerebraler Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigen. Die Antagonisierung von B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>- oder kombinierte B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>-Rezeptoren hatte allerdings keinen Einfluss auf die neurologische Funktion und das Infarktausmaß [118]. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit der fokalen zerebralen Ischämie muss berücksichtigt werden, dass es nach globaler zerebraler Ischämie zunächst zum Untergang vulnerabler Neurone kommt. Zu diesen Nervenzellen zählen: CA1-Pyramidenzellen und CA4-Neurone des Hippokampus, Neurone der Schichten 3, 5 und 6 des Neokortex, Neurone im Striatum und Purkinjezellen des Kleinhirns. Bei fokaler zerebraler Ischämie sind alle Zellarten, einschließlich Neurone, Glia- und Endothelzellen von einer Nekrose betroffen [34, 173]. Interaktionen von Kinin-Antagonisten in diesen Arealen können daher in den beiden Ischämie modellen voneinander abweichen und modellbedingt unterschiedliche Auswirkungen auf die neurologische Erholung und das Infarktausmaß haben.

Die Interaktionen der beiden Kinin-Rezeptoren nach zerebraler Ischämie sind noch nicht ausreichend abgeklärt, um die neuroprotektiven oder -schädlichen Einflüsse des jeweiligen Rezeptors exakt zu definieren und zeitlich einzugrenzen. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

Inflammatorische Mechanismen, die nach Schlaganfall ausgelöst werden, können sowohl potentiell schützende, als auch zerstörende Kaskaden einleiten, da der Zeitraum des sekundären Hirnschadens von einigen Stunden bis zu Tagen bzw. Wochen nach Schlaganfall reicht. Die anfängliche Inflammation kann das Schadensausmaß nach Ischämie

vergrößern. Antiinflammatorische Therapien, die hier eingreifen, haben allerdings einen negativen Einfluss auf die neuronale Regeneration bei später einsetzenden Reparatursprozessen [14].

Im Kontext der bisherigen Untersuchungen hat die B<sub>2</sub>-Rezeptorblockade ihren neuroprotektiven Einfluss sowohl in Modellen des Schädel-Hirn-Traumas [76, 138, 151, 166, 170, 222, 233], der globalen [118] als auch fokalen zerebralen Ischämie [187-189] bewiesen. Bei unseren Untersuchungen konnten wir die postischämische Hirnödementwicklung durch zweitägige B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade vermindern und unterstützen damit die Hypothese ihrer neuroprotektiven Wirksamkeit.

Die komplexen Zusammenhänge der zerebralen Ischämie erfordern einen kombinierten Therapieansatz, der die unterschiedlichen Schadensmechanismen und ihr zeitliches Aktivierungsmuster berücksichtigt, um eine wirksame Neuroprotektion zu erreichen. Dazu zählt auch die Blockade des Kallikrein-Kinin-System mittels Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten [14, 64, 127, 217].

### 4.2.3 Studie III

In der letzten Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade des B<sub>2</sub>-Rezeptors mit LF 16-0687 Ms auch bei Therapiebeginn nach fokaler zerebraler Ischämie die Infarktbildung hemmen kann. Dies konnte für alle drei Therapiegruppen bestätigt werden. Die Dosierungen von 1 und 3 mg/kg/d wiesen im Unterschied zur Kontrollgruppe am postischämischen dritten Tag einen signifikant besseren Neuroscore auf. Wie auch in den Vorversuchen wurden die physiologischen Kontrollparameter wie mittlerer arterieller Blutdruck, Blutgase und LCBF durch die Therapie mit LF 16-0687 Ms nicht beeinflusst.

#### 4.2.3.1 Wahl der Dosierung

Modell	Applikation	Dosierung
Cortical Impact (geschl. SHT, Ratte) [170]	i.v. über 23 h, Infusionsstart 1 h nach Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14,4 mg/kg/d i.v. (10 µg/kg/min)</li> <li>• 43,2 mg/kg/d i.v. (30 µg/kg/min)</li> <li>• <b>144 mg/kg/d i.v.</b> (100 µg/kg/min)</li> </ul>
Cortical Impact (geschl. SHT, Ratte) [175]	i.v. über 2 h und 24 h, Infusionsstart 15 min vor Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14,4 mg/kg/d i.v. (10 µg/kg/min)</li> <li>• <b>144 mg/kg/d i.v.</b> (100 µg/kg/min)</li> </ul>
Cortical Impact (offenes SHT, Ratte) [222]	subkutan, einfache Gabe 5 min nach Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>3 mg/kg/d s.c.</b></li> <li>• <b>30 mg/kg/d s.c.</b></li> </ul>
Fokale Kälteläsion (offenes SHT, Ratte) [166]	i.v. über 24 h,  1.) <b>Infusionsstart 15 min vor Trauma</b>  2.) Infusionsstart 30 min und 60 min nach Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>14,4 mg/kg/d i.v.</b> (10 µg/kg/min)</li> <li>• 144 mg/kg/d i.v. (100 µg/kg/min)</li> </ul>
Cortical Impact (geschl. SHT, Maus) [233]	subkutan, einfache Gabe 30 min nach Trauma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>0.3 mg / kg / d s.c.</b></li> <li>• <b>1 mg / kg / d s.c.</b></li> <li>• <b>3 mg / kg / d s.c.</b></li> <li>• <b>10 mg / kg / d s.c.</b></li> <li>• 30 mg / kg / d s.c.</li> </ul>

**Tabelle 13: Überblick über die Forschungsarbeiten zu LF 16-0687 Ms bei der experimentellen Forschung des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) bei Ratte und Maus**

**Die Dosierungen oder Applikationsarten, die sich in den Arbeiten als wirksam herausgestellt haben sind fett gedruckt. geschl. = geschlossen**

Ziel der dritten Studie war es, die neuroprotektive Wirksamkeit bei Gabe des Antagonisten zum Zeitpunkt der Reperfusion – 90 min nach Beginn der Ischämie - zu überprüfen. Zum

Zeitpunkt der Aufstellung des Studienprotokolls standen uns experimentelle Daten zu LF 16-0687 Ms zur Verfügung, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

Die beiden oberen Studien aus Tabelle 13, durchgeführt von einer Arbeitsgruppe in Israel, ermittelten im Gegensatz zu den anderen Arbeiten eine wesentlich höhere, signifikant wirksame Dosis. Der Grund dafür scheint methodisch bedingt zu sein: das Trauma wird stereotaktisch gesteuert und mit einem von Silikon umgebenen Metallstumpf aus einer definierten Fallhöhe auf den Schädel des narkotisierten Tieres appliziert [171, 175]. Diese Methodik verursachte eine wesentlich höhere Mortalität im Vergleich zu anderen Modellen [166, 222]. Offensichtlich wird bei einem derart massiven Trauma das Kallikrein-Kinin-System vermehrt aktiviert, dass höhere Dosen notwendig werden, um eine effektive Blockade von B<sub>2</sub>-Rezeptoren zu bewirken.

Wir orientierten uns in der letzten Studie maßgeblich an unseren Vorversuchen, den bis dahin einzigen bekannten Studien zur zerebralen Ischämie, und den in Tabelle 13 aufgeführten Arbeiten bei experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Mit Ausnahme der beiden Arbeiten aus Israel scheinen sowohl bei Schädel-Hirn-Trauma als auch bei zerebraler Ischämie, niedrigere Dosierungen wirksamer zu sein.

Wir entschlossen uns dazu, in der letzten Studie den kombinierten Hypothesenansatz der postischämischen Wirksamkeit bei Dosierungen kleiner gleich 10 mg/kg/d zu überprüfen.

#### **4.2.3.2 Infarktvolumen**

Die Infarktvolumina der Studie III entsprachen etwa dem Doppelten der Studie I. Diese Beobachtung ist aber unabhängig von der durchgeführten Therapie, insbesondere kann dies bei Vergleich der beiden Kontrollgruppen verdeutlicht werden. Eine Durchsicht der bisher von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien [201-209, 258] ergab, dass die Läsionen der Studie I etwa 50 % unter den sonst in der Arbeitsgruppe beobachteten Infarktvolumina lag. Die Läsionsgröße der Studie III entsprach etwa dem Arbeitsgruppenschnitt.

Das Studienprotokoll war bis auf den unterschiedlichen Zeitpunkt der Therapieapplikation identisch. Die verwendete Narkoseart, -dauer, -dosierung und das verwendete Operationsmaterial wich innerhalb der von uns durchgeführten Studien nicht ab. Ein Bias,

der durch die zirkadiane Rhythmik der Tiere entstehen kann [235], konnte aufgrund des stets einheitlichen Versuchsprotokolls ausgeschlossen werden.

Sämtliche physiologische Kontrollparameter waren bei den Studien im physiologischen Normalbereich, insbesondere konnten keine Unterschiede zwischen mittlerem arteriellen Blutdruck (Perfusion), der temporalen Temperatur (Hypothermie), Hämatokrit/Hämoglobin (Hämodilution) und Glukose (Infarkt volumen) festgestellt werden. Der Abfall des LCBF und die Reperfusion wiesen zwischen den Studien keine signifikanten Unterschiede in der Laser-Doppler-Fluxmetrie auf. Intraoperative Kontrollmaßnahmen gewährleisteten ein möglichst standardisiertes und überprüfbares Vorgehen.

In der Nachbeobachtungszeit von sieben postoperativen Tagen verweilten die Tiere entsprechend den Tierschutzrichtlinien in Makrolonkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter im Tierstall. Die dort eingestellte Raumtemperatur war unabhängig von der Außentemperatur. Die Möglichkeit der Verwendung einer unterschiedlichen Rattenaufzucht - die Versuche der Studien lagen etwa ein dreiviertel Jahr auseinander - wurde bei Anfrage von der liefernden Firma Charles River verneint. Jahreszeitliche Schwankungen, die aufgrund der endogenen Rhythmik der Tiere entstehen können, konnten in diesem Ausmaß (etwa doppelt so große Infarktvolumina) von unserer Arbeitsgruppe nicht beobachtet werden. Eine Metaanalyse aller in der Arbeitsgruppe von jeweils einem Operateur durchgeführten Kontrollversuche ergab keine signifikanten Unterschiede (unveröffentlichte Daten).

Auf die Beurteilung der neuroprotektiven Wirksamkeit der Therapie mit LF 16-0687 Ms hat das allerdings keine Auswirkung: die Studien müssen isoliert betrachtet werden und dieser Befund war auf die Versuchstiere der jeweiligen Studie beschränkt. In beiden Studien (I und III) war das verminderte Gesamtinfraktvolumen der therapierten Tiere auf eine reduzierte Infarktbildung im Kortex zurückzuführen. Die Hemmung des kortikalen Läsionsausmaßes bei Therapie mit neuroprotektiven Substanzen ist eine in unserem Modell häufig gemachte Beobachtung [201-203, 205, 207]. Bei Diskussion und Übertragung der Ergebnisse der Studien aufeinander muss das unterschiedliche Ausmaß der Infarktvolumina entsprechend berücksichtigt werden.

#### 4.2.3.3 Neurologische Erholung

Der Neuroscore der mit LF 16-0687 Ms behandelten Tiere zeigte eine Tendenz zu einer besseren postoperativen Erholung, was nur für Therapiegruppen mit 1 und 3 mg/kg/d am dritten Tag signifikant war.

Das Infarktvolumen der Versuchstiere der Studie III war im Vergleich zur Studie I mehr als doppelt so groß. Die langsamere neurologische Erholung hat darauf bereits hingewiesen. Untersuchungen unseres Tiermodells haben gezeigt, dass die Entwicklung der neurologischen Scores mit der Größe der entstehenden Infarktvolumina korreliert [256]. Die schlechtere neurologische Erholung der therapierten Versuchstiere der Studie III kann daher nicht alleine auf den späteren Therapiebeginn (90 min später als bei Studie I) zurückgeführt werden.

Nach experimentellem SHT (*Cortical Impact*) konnte bei Administration von LF 16-0687 Ms 5 min s.c. [222], 30 min s.c. [233] und 60 min i.v. [170] nach Trauma ein signifikanter neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden. Nach fokaler Kälteläsion bei Ratten konnte eine Hirnödem-reduzierende Wirkung bei Applikation 30 und 60 min i.v. nach Trauma von LF 16-0687 Ms nicht bestätigt werden, die sich in Versuchen bei Therapiebeginn 15 min vor Trauma gezeigt hat [166].

Eine erst nach unserem Studienabschluss veröffentlichte Arbeit untersuchte die Wirkung von LF 16-0687 Ms bei postischämischer Therapie an Mäusen: die subkutane Applikation 15 min und 6,25 h nach temporärer fokaler zerebraler Ischämie (Dauer: 15 min) reduzierte signifikant die neurologische Erholung, das Infarktvolumen und die postischämische Hirnschwellung [45].

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die in Studie III nicht deutlich ausgeprägte verbesserte neurologische Erholung am ehesten auf ein größeres Infarktvolumen zurückzuführen ist. Hinweise für die neuroprotektive Wirksamkeit bei post-läsioneller Applikation von LF 16-0687 Ms gibt es sowohl nach Schädel-Hirn-Trauma als auch nach fokaler zerebraler Ischämie.

#### 4.2.3.4 Postischämische Wirksamkeit

Die Untersuchung einer neuroprotektiven Therapie, die nach fokaler zerebraler Ischämie begonnen werden kann, hat zum Ziel, den potentiellen Einsatz im klinischen Alltag zu überprüfen. LF 16-0687 Ms erscheint aufgrund seiner günstigen Eigenschaften als Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist und seiner fehlenden Beeinflussung von physiologischen Kontrollparametern dafür geeignet. In der letzten Studie wurde die Gabe von LF 16-0687 Ms zum Zeitpunkt der Reperfusion untersucht. Eine klinische Situation, die dieser experimentellen Konstellation entspricht, ist beispielsweise eine parallel zur Lyse mit rt-PA durchgeführte Neuroprotektion. Folgende theoretische Überlegungen müssen diskutiert werden, um die Übertragbarkeit auf die Klinik zu überprüfen:

Das Fadenmodell spiegelt nicht, wie bereits diskutiert (siehe 4.1.1), das klinische Setting wieder, sondern ist hauptsächlich eine Methode zur Erforschung neuroprotektiver Therapiestrategien. Eine Untersuchung in einem fokal embolischen Modell würde einer klinischen Situation näher kommen.

Im Blutkreislauf ist Bradykinin ein Mediator, der protektive Faktoren aus dem Endothel wie NO, Prostazyklin, PGE<sub>2</sub> und t-PA freisetzt [81]. Diese Faktoren schützen durch Stimulation der Thrombolyse, Vasodilatation und Hemmung thrombogener Umbauprozesse nach Ischämie das Endothel vor Angriffen von Blutplättchen und Leukozyten, die Thrombosen verursachen können [133]. Eine Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung stimuliert die t-PA Freisetzung aus dem Endothel durch Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung [56, 81].

Eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mit verminderter Freisetzung von t-PA aus dem Endothel kann daher theoretisch bei fokaler zerebraler Ischämie die Thrombogenese im bereits minderperfundierten Infarktgebiet erhöhen und das Infarktvolumen negativ beeinträchtigen. In unserem Modell beobachteten wir allerdings keine Thrombosierungen im Bereich der A. cerebri media. Die systematisch durchgeführte intravenöse Applikation von Heparin verminderte zusätzlich das Thromboserisiko des Fadenmodells bei Ratten [206].

Meng et al. konnten herausfinden, dass nach zwei Stunden Okklusion mittels Fadenmodell bei Ratten kein zusätzlicher protektiver Effekt auf das Infarktvolumen durch Gabe von t-PA nach Reperfusion erreicht werden [144]. In einem Embolusmodell bei Ratten, kann die Applikation von t-PA die vaskuläre Immunreaktivität von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche verändern, so dass bei gleichzeitiger Gabe von ICAM-1 Antikörpern vier

Stunden nach Reperfusion die Ausbildung des Infarktolumens reduziert werden kann [260]. Welchen Einfluss eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade bei exogener Zufuhr von rt-PA, beispielsweise im Rahmen einer Lysetherapie nach Schlaganfall, hat, kann vor Abschluss weiterer Untersuchungen nicht geklärt werden.

Es offenbart sich dabei die "Janusköpfigkeit des Kallikrein-Kinin-Systems" [88], das sowohl schädigende als auch schützende Mechanismen in Gang setzen kann. Diese Überlegungen müssen gerade deshalb in Betracht gezogen werden, da in der Vergangenheit viele neuroprotektive Strategien, die sich in der Forschung als effektiv erwiesen haben, bei klinischer Anwendung unwirksam waren. Die Gründe hierfür sind vielfältig: entweder waren die pathophysiologischen Mechanismen nicht von einer Spezies auf die andere übertragbar, der Zeitpunkt der Applikation nicht richtig gewählt, die Dosierung nicht adäquat, die Penetration zum Wirkort unzureichend, der Wirkmechanismus nicht der Art der Gehirnschädigung entsprechend oder die molekularen Interaktionen nicht vollständig berücksichtigt worden [27, 46, 115].

Unsere Untersuchungen bestätigen eine postischämische neuroprotektive Wirksamkeit der B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie, doch müssen die zellulären Mechanismen, ihre Interaktionen und das zeitliche Aktivierungsmuster weiter aufgeklärt werden, um eine erfolgreiche Therapiestrategie nach Schlaganfall entwickeln zu können [14, 127, 217].

### 4.3 Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie besteht aus komplexen Zusammenhängen, einem Netzwerk von Mechanismen. Parallel zu dem immer schneller voranschreitenden Wissen über diese Zusammenhänge werden neue Substanzen entwickelt, die in die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie eingreifen und potentiell neuroprotektive Effekte ausüben. LF 16-0687 Ms, ein Nicht-Peptid B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist ist eine davon.

Ziel dieser Arbeit war es eine alternative Strategie zur Neuroprotektion durch Kinin B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mit diesem bis dahin in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie nicht erprobten Antagonisten zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Unsere Ergebnisse bestätigen die durch B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung vermittelte Mediatorfunktion des Kallikrein-Kinin-Systems bei der fokalen zerebralen Ischämie.
- Wir konnten erstmals nachweisen, dass die Blockade des B<sub>2</sub>-Rezeptors mit dem neu entwickelten Nicht-Peptid Antagonisten LF 16-0687 MS die Infarktbildung hemmt und die funktionelle neurologische Erholung nach temporärer fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten verbessert, ohne Nebenwirkungen auf physiologische Kontrollparameter auszuüben.
- Die dosisabhängige Wirkung von LF 16-0687 Ms konnte in unserem Modell der temporären fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte bestätigt werden, wobei Dosierungen im Bereich kleiner gleich 12 mg/kg/d bei subkutaner Applikation am wirksamsten zu sein scheinen.
- Mit unseren Ergebnissen konnten wir quantitativ nachweisen, dass durch die B<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mit LF 16-0687 Ms die postischämische Hirnschwellung nach fokaler zerebraler Ischämie bei Ratten gehemmt wird.
- Die neuroprotektive Wirkung besteht auch bei Therapiebeginn nach Ischämie, was die weitere in vivo und in vitro Evaluierung des Antagonisten verdient.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen des Kallikrein-Kinin-Systems insbesondere der B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor-Interaktionen bei

fokaler und globaler zerebraler Ischämie, bei Schädel-Hirn-Trauma und bei in vitro Untersuchungen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Abbott, N.J., *Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability*. Cell Mol Neurobiol, 2000. 20(2): S. 131-47.
2. Abe, Y., et al., *A novel class of orally active non-peptide bradykinin B2 receptor antagonists. 1. Construction of the basic framework*. J Med Chem, 1998. 41(4): S. 564-78.
3. Abelous, J.E. und Bardier, E., *Les substances hypotensives de l'urine humaine normale*. C.R. Soc. Biol. (Paris), 1909. 66: S. 511-512.
4. (AHA), A.H.A., *Heart Disease and Stroke Statistics - 2004 Update*. 2003, American Heart Association (AHA). S. 52.
5. Akbary, A.M., Wirth, K.J. und Scholkens, B.A., *Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 238-42.
6. Allogho, S.N., et al., *Kinin B1 and B2 receptors in the mouse*. Can J Physiol Pharmacol, 1995. 73(12): S. 1759-64.
7. Andrian, U.V., *Das experimentelle vasogene Hirnödeme der Ratte: Behandlungseffekte von Dexamethason, Eglin C, Glutamat und Phosphoserin*, in *Medicine - Institute for Surgical Research (ICF)*. 1992, Ludwig-Maximilians-University: Munich, Germany.
8. Avendano, C., et al., *Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: A stereological evaluation*. Brain Res, 1995. 673: S. 83-92.
9. Back, T., *Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept*. Cell Mol Neurobiol, 1998. 18(6): S. 621-38.
10. Baethmann, A. und Kempfski, O., *Biochemical Factors and Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma*, in *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*, Bazan, N., Braquet, P. und Ginsberg, M.D., Editors. 1992, Plenum Press: New York. S. 295-320.
11. Baethmann, A. und Kempfski, O., *Pathophysiologie des Hirnödems*. Anästhesiologie & Intensivmedizin, 1997. 38(7/8): S. 347-356.
12. Baethmann, A., et al., *Mediators of brain edema and secondary brain damage*. Crit Care Med, 1988. 16(10): S. 972-8.
13. Barnes, P.J., *Bradykinin and asthma*. Thorax, 1992. 47(11): S. 979-83.
14. Barone, F.C. und Feuerstein, G.Z., *Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. 19(8): S. 819-34.
15. Bass, E., *Cardiopulmonary arrest. Pathophysiology and neurologic complications*. Ann Intern Med, 1985. 103(6 ( Pt 1)): S. 920-7.
16. Bederson, J.B., Germano, I.M. und Guarino, L., *Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat*. Stroke, 1995. 26(6): S. 1086-91; discussion 1091-2.
17. Bederson, J.B., et al., *Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination*. Stroke, 1986. 17(3): S. 472-6.
18. Belichard, P., et al., *Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists*. Immunopharmacology, 2000. 46(2): S. 139-47.
19. Bhoola, K.D., *Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 247-56.
20. Bhoola, K.D., Figueroa, C.D. und Worthy, K., *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. Pharmacol Rev, 1992. 44(1): S. 1-80.

21. Boels, K. und Schaller, H.C., *Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor*. Br J Pharmacol, 2003. 140(5): S. 932-8.
22. Boenninghaus, H.G. und Lenarz, T., *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Vol. 11. 2001: Springer Verlag GmbH & Co. KG.
23. Boissannas, R.A., et al., *Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin*. Experientia, 1960. 16: S. 326.
24. Borgos, J., *Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow*. Neurol Res, 1996. 18(3): S. 251-5.
25. Borlongan, C.V., et al., *Bradykinin receptor agonist facilitates low-dose cyclosporine-A protection against 6-hydroxydopamine neurotoxicity*. Brain Res., 2002. 956(2): S. 211-220.
26. Brambrink, A.M., et al., *Control of brain temperature during experimental global ischemia in rats*. J Neurosci Methods, 1999. 92(1-2): S. 111-22.
27. Brott, T. und Bogousslavsky, J., *Treatment of acute ischemic stroke*. N Engl J Med, 2000. 343(10): S. 710-22.
28. Burch, R.M. und Kyle, D.J., *Recent developments in the understanding of bradykinin receptors*. Life Sci, 1992. 50(12): S. 829-38.
29. Burgess, G.M., et al., *Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia*. Br J Pharmacol, 2000. 129(1): S. 77-86.
30. Busto, R., et al., *Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 1987. 7(6): S. 729-38.
31. Cahn, R., et al., *Effect of halothane on ischemic brain edema*. Adv Neurol, 1990. 52: S. 93-6.
32. Chen, E.Y., et al., *B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain*. J Comp Neurol, 2000. 427(1): S. 1-18.
33. Chidiac, P. und Ross, E.M., *Phospholipase C-beta 1 Directly Accelerates GTP Hydrolysis by Galpha q and Acceleration Is Inhibited by Gbeta gamma Subunits*. J. Biol. Chem., 1999. 274(28): S. 19639-19643.
34. Choi, D.W., *Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions*. J Neurosci, 1990. 10(8): S. 2493-501.
35. Cholewinski, A.J., et al., *Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes*. J Neurochem, 1991. 57(4): S. 1456-8.
36. Chuang, H.H., et al., *Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition*. Nature, 2001. 411(6840): S. 957-62.
37. Clapham, D.E. und Neer, E.J., *New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling*. Nature, 1993. 365(6445): S. 403-6.
38. Clements, J.A., *The human kallikrein gene family: a diversity of expression and function*. Mol Cell Endocrinol, 1994. 99(1): S. C1-6.
39. Cochrane, C.G., Revak, S.D. und Wuepper, K.D., *Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein*. J Exp Med, 1973. 138(6): S. 1564-83.
40. Corbett, D. und Nurse, S., *The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia*. Prog. Neurobiol., 1998. 54(5): S. 531-548.
41. Couture, R., et al., *Kinin receptors in pain and inflammation*. Eur.J.Pharmacol., 2001. 429(1-3): S. 161-176.
42. deBlois, D., Bouthillier, J. und Marceau, F., *Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg9-bradykinin in vivo and in vitro*. Immunopharmacology, 1989. 17(3): S. 187-98.

43. del Zoppo, G.J., von Kummer, R. und Hamann, G.F., *Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. 65(1): S. 1-9.
44. Dietze, G.J., et al., *Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans*. Diabetes, 1996. 45 Suppl 1: S. S110-4.
45. Ding-Zhou, L., et al., *LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia*. Br J Pharmacol, 2003. 139(8): S. 1539-47.
46. Dirnagl, U., Iadecola, C. und Moskowitz, M.A., *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. 22(9): S. 391-7.
47. Dirnagl, U., et al., *Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model*. J Cereb Blood Flow Metab, 1989. 9(5): S. 589-96.
48. Dixon, C.E., Ma, X. und Marion, D.W., *Effects of CDP-choline treatment on neurobehavioral deficits after TBI and on hippocampal and neocortical acetylcholine release*. J Neurotrauma, 1997. 14(3): S. 161-9.
49. Dlamini, Z., Raidoo, D. und Bhoola, K., *Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in oesophageal carcinoma*. Immunopharmacology, 1999. 43(2-3): S. 303-10.
50. Dray, A. und Perkins, M., *Bradykinin and inflammatory pain*. Trends Neurosci, 1993. 16(3): S. 99-104.
51. Easton, A.S. und Abbott, N.J., *Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier*. Brain Res, 2002. 953(1-2): S. 157-69.
52. Eke, A., et al., *Histologic assessment of neurons in rat models of cerebral ischemia*. Stroke, 1990. 21(2): S. 299-304.
53. Elliot, D.F., Lewis, G.P. und Horton, E.W., *The structure of bradykinin - a plasma kinin from ox. blood*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960. 3: S. 87-91.
54. Ellis, E.F., Chao, J. und Heizer, M.L., *Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event*. J Neurosurg, 1989. 71(3): S. 437-42.
55. Ellis, E.F., et al., *Inhibition of bradykinin- and kallikrein-induced cerebral arteriolar dilation by a specific bradykinin antagonist*. Stroke, 1987. 18(4): S. 792-5.
56. Emeis, J.J. und Tranquille, N., *On the role of bradykinin in secretion from vascular endothelial cells*. Agents Actions Suppl, 1992. 38 ( Pt 2): S. 285-91.
57. Eyre, J.A., et al., *A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres*. Clin.Phys.Physiol.Meas., 1988. 9(1): S. 65-74.
58. Fein, A.M., et al., *Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. Jama, 1997. 277(6): S. 482-7.
59. Feletou, M., Bonnardel, E. und Canet, E., *Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1996. 118(6): S. 1371-6.
60. Figueroa, C.D., et al., *Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils*. Blood, 1992. 79(3): S. 754-9.
61. Figueroa, C.D., MacIver, A.G. und Bhoola, K.D., *Identification of a tissue kallikrein in human polymorphonuclear leucocytes*. Br J Haematol, 1989. 72(3): S. 321-8.
62. Firlik, A.D., et al., *Relationship between cerebral blood flow and the development of swelling and life-threatening herniation in acute ischemic stroke*. J Neurosurg, 1998. 89(2): S. 243-9.
63. Fisher, M. und Brott, T.G., *Emerging therapies for acute ischemic stroke: new therapies on trial*. Stroke, 2003. 34(2): S. 359-61.

64. Francel, P.C., *Bradykinin and neuronal injury*. J Neurotrauma, 1992. 9 Suppl 1: S. S27-45.
65. Frerichs, K.U. und Feuerstein, G.Z., *Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow*. Mol Chem Neuropathol, 1990. 12(1): S. 55-70.
66. Frey, E.K. und Kraut, H., *Ein Kreislaufhormon und seine Wirkung*. Arch Exp Pathol Pharmacol, 1928. 133: S. 1-56.
67. Fukuda, O., et al., *The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow*. Neurosurgery, 1995. 36: S. 358-364.
68. Garcia, J.H., Liu, K.F. und Ho, K.L., *Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex*. Stroke, 1995. 26: S. 636-642.
69. Garcia, J.H., et al., *Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat)*. Am J Pathol, 1994. 144(1): S. 188-99.
70. Garcia, J.H., et al., *Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry*. Acta Neuropathol (Berl), 1978. 43(1-2): S. 85-95.
71. Gaudreau, P., et al., *Pharmacological studies of kinins in venous smooth muscles*. Can J Physiol Pharmacol, 1981. 59(4): S. 371-9.
72. Gecse, A., Mezei, Z. und Telegdy, G., *The effect of bradykinin and its fragments on the arachidonate cascade of brain microvessels*. Adv Exp Med Biol, 1989. 247A: S. 249-54.
73. Geppetti, P., *Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications*. Regul Pept, 1993. 47(1): S. 1-23.
74. Gimpl, G., et al., *Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses*. Neurosci Lett, 1992. 144(1-2): S. 139-42.
75. Gorlach, C., Benyo, Z. und Wahl, M., *Dilator effect of bradykinin and acetylcholine in cerebral vessels after brain lesion*. Kidney Int Suppl, 1998. 67: S. S226-7.
76. Gorlach, C., et al., *Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury*. J.Neurotrauma, 2001. 18(8): S. 833-838.
77. Gorlach, C. und Wahl, M., *Bradykinin dilates rat middle cerebral artery and its large branches via endothelial B2 receptors and release of nitric oxide*. Peptides, 1996. 17(8): S. 1373-8.
78. Gotoh, O., et al., *Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin*. Stroke, 1985. 16(1): S. 101-9.
79. Greenwood, J., *Mechanisms of blood-brain barrier breakdown*. Neuroradiology, 1991. 33(2): S. 95-100.
80. Groves, P., et al., *Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control*. Circulation, 1995. 92(12): S. 3424-30.
81. Gryglewski, R.J., et al., *Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function*. Pediatr Pathol Mol Med, 2002. 21(3): S. 279-90.
82. Gunnett, C.A., et al., *Gene transfer of inducible nitric oxide synthase impairs relaxation in human and rabbit cerebral arteries*. Stroke, 2002. 33(9): S. 2292-2296.
83. Haberl, R.L., et al., *Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations*. Am. J. Physiol., 1989. 256: S. H1255-1260.
84. Hall, J.M., *Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles*. Pharmacol Ther, 1992. 56(2): S. 131-90.
85. Hatashita, S. und Hoff, J.T., *Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1990. 21(4): S. 582-8.
86. Hatashita, S., Hoff, J.T. und Salamat, S.M., *Ischemic brain edema and the osmotic gradient between blood and brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 1988. 8(4): S. 552-9.

87. Heiss, W.D., *Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue*. Stroke, 1983. 14(3): S. 329-31.
88. Heitsch, H., *Non-peptide antagonists and agonists of the bradykinin B(2) receptor*. Curr Med Chem, 2002. 9(9): S. 913-28.
89. Hepler, J.R. und Gilman, A.G., *G proteins*. Trends Biochem Sci, 1992. 17(10): S. 383-7.
90. Hess, J.F., et al., *Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors*. Mol Pharmacol, 1994. 45(1): S. 1-8.
91. Hess, J.F., et al., *Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 184(1): S. 260-8.
92. Hoffmann, T.F., Waldner, H. und Messmer, K., *The bradykinin antagonist CP-0597 can limit the progression of postischemic pancreatitis*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 243-6.
93. Hornig, B. und Drexler, H., *Endothelial function and bradykinin in humans*. Drugs, 1997. 54 Suppl 5: S. 42-7.
94. Hornig, B., Kohler, C. und Drexler, H., *Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans*. Circulation, 1997. 95(5): S. 1115-8.
95. Hosli, E. und Hosli, L., *Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes*. Neuroreport, 1993. 4(2): S. 159-62.
96. Hossmann, K.A., *Ischemia-mediated neuronal injury*. Resuscitation, 1993. 26(3): S. 225-35.
97. Hsu, J.C., et al., *Cerebral ischemia alters the regional hippocampal expression of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor gene*. Neurosci Lett, 1996. 219(2): S. 87-90.
98. Hudetz, A.G., et al., *Effects of volatile anesthetics on cerebrocortical laser Doppler flow: hyperemia, autoregulation, carbon dioxide response, flow oscillations, and role of nitric oxide*. Adv Pharmacol, 1994. 31: S. 577-93.
99. Jones, T.H., et al., *Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys*. J Neurosurg, 1981. 54: S. 773-782.
100. Jong, Y.J., et al., *Bradykinin receptor modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease*. Int.Immunopharmacol., 2002. 2(13-14): S. 1833-1840.
101. Kamitani, T., Little, M.H. und Ellis, E.F., *Evidence for a possible role of the brain kallikrein-kinin system in the modulation of the cerebral circulation*. Circ Res, 1985. 57(4): S. 545-52.
102. Kamiya, T., et al., *The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats*. Stroke, 1993. 24(4): S. 571-5; discussion 575-6.
103. Kaplanski, J., et al., *LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B(2) receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats*. Resuscitation, 2003. 56(2): S. 207-13.
104. Kaplanski, J., et al., *LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats*. J.Neurotrauma, 2002. 19(8): S. 953-964.
105. Kariya, K., Yamauchi, A. und Chatani, Y., *Relationship between central actions of bradykinin and prostaglandins in the conscious rat*. Neuropharmacology, 1982. 21(3): S. 267-72.
106. Kariya, K., Yamauchi, A. und Sasaki, T., *Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat*. J Neurochem, 1985. 44(6): S. 1892-7.
107. Kizuki, K., et al., *Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain*. Brain Res, 1994. 634(2): S. 305-9.
108. Klatzo, I., *Evolution of brain edema concepts*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1994. 60: S. 3-6.

109. Koizumi, J., et al., *Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area*. Jpn J Stroke, 1986. 8: S. 1-8.
110. Kolominsky-Rabas, P.L. und Heuschmann, P.U., [*Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke*]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2002. 70(12): S. 657-62.
111. Kolominsky-Rabas, P.L., et al., *Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study*. Stroke, 2001. 32(12): S. 2735-40.
112. Kontos, H.A., et al., *Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats*. Circ Res, 1984. 55(3): S. 295-303.
113. Krieger, D.W., et al., *Early clinical and radiological predictors of fatal brain swelling in ischemic stroke*. Stroke, 1999. 30(2): S. 287-92.
114. Krnjevic, K., *Central cholinergic mechanisms and function*. Prog Brain Res, 1993. 98: S. 285-92.
115. Lee, J.M., Zipfel, G.J. und Choi, D.W., *The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms*. Nature, 1999. 399(6738 Suppl): S. A7-14.
116. Lee, P.Y. und Pearce, F.L., *Histamine secretion from mast cells stimulated with bradykinin*. Agents Actions, 1990. 30(1-2): S. 67-9.
117. Lee, Y.J., et al., *Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. 19(2): S. 186-200.
118. Lehmeberg, J., et al., *Bradykinin antagonists reduce leukocyte-endothelium interactions after global cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(4): S. 441-8.
119. Leis, H.J., et al., *Phenotypic heterogeneity of osteoblast-like MC3T3-E1 cells: changes of bradykinin-induced prostaglandin E2 production during osteoblast maturation*. J Bone Miner Res, 1997. 12(4): S. 541-51.
120. Levesque, L., et al., *Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins*. Immunopharmacology, 1995. 29(2): S. 141-7.
121. Li, F., Omae, T. und Fisher, M., *Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats*. Stroke, 1999. 30(11): S. 2464-70; discussion 2470-1.
122. Liebeskind, D.S., *Case fatality rates after hospital admission for stroke. Definition of stroke defines stroke mortality*. Bmj, 2003. 326(7398): S. 1085-6; author reply 1086.
123. Lin, T.N., et al., *Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats*. Stroke, 1993. 24(1): S. 117-21.
124. Linz, W., et al., *Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors*. Pharmacol Rev, 1995. 47(1): S. 25-49.
125. Litosch, I., *Regulation of phospholipase C-beta activity by phosphatidic acid: isoform dependence, role of protein kinase C, and G protein subunits*. Biochemistry, 2003. 42(6): S. 1618-23.
126. Liu, Y., et al., *Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors*. Neurol Res, 2001. 23(4): S. 379-87.
127. Lo, E.H., Dalkara, T. und Moskowitz, M.A., *Mechanisms, challenges and opportunities in stroke*. Nat Rev Neurosci, 2003. 4(5): S. 399-415.
128. Lohse, M.J., *Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization*. Biochim Biophys Acta, 1993. 1179(2): S. 171-88.
129. Longa, E.Z., et al., *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats*. Stroke, 1989. 20(1): S. 84-91.
130. Loubinoux, I., et al., *Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T2 magnetic resonance imaging*. Stroke, 1997. 28(2): S. 419-26; discussion 426-7.

131. MacLeod, M.J. und McLay, J., *Drug treatment of hypertension complicating diabetes mellitus*. *Drugs*, 1998. 56(2): S. 189-202.
132. Madeddu, P., *Receptor antagonists of bradykinin: a new tool to study the cardiovascular effects of endogenous kinins*. *Pharmacol Res*, 1993. 28(2): S. 107-28.
133. Maestri, R., et al., *Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice*. *Hypertension*, 2003. 41(5): S. 1151-5.
134. Mahabeer, R., Naidoo, S. und Raidoo, D.M., *Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR*. *Metab Brain Dis.*, 2000. 15(4): S. 325-335.
135. Maier-Hauff, K., et al., *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue*. *J Neurosurg*, 1984. 61(1): S. 97-106.
136. Makevnina, L.G., et al., *Kininogen consumption in cerebral circulation of humans during brain ischemia and postischemic reperfusion*. *Braz J Med Biol Res*, 1994. 27(8): S. 1955-63.
137. Marceau, F., Hess, J.F. und Bachvarov, D.R., *The B1 receptors for kinins*. *Pharmacol Rev*, 1998. 50(3): S. 357-86.
138. Marmarou, A., et al., *Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial*. *American Brain Injury Consortium Study Group*. *J Neurotrauma*, 1999. 16(6): S. 431-44.
139. Marz, P., et al., *Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression*. *Glia*, 1999. 26(3): S. 191-200.
140. Mathews, K.P., et al., *Familial carboxypeptidase N deficiency*. *Ann Intern Med*, 1980. 93(3): S. 443-5.
141. McLean, P.G., Ahluwalia, A. und Perretti, M., *Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules*. *J Exp Med*, 2000. 192(3): S. 367-80.
142. Memezawa, H., et al., *Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat*. *Exp Brain Res*, 1992. 89(1): S. 67-78.
143. Memezawa, H., et al., *Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (MK-801) in focal cerebral ischemia*. *Brain Res*, 1995. 670(1): S. 48-52.
144. Meng, W., et al., *Effects of tissue type plasminogen activator in embolic versus mechanical models of focal cerebral ischemia in rats*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999. 19(12): S. 1316-21.
145. Menke, J.G., et al., *Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor*. *J Biol Chem*, 1994. 269(34): S. 21583-6.
146. Menzies, S.A., Hoff, J.T. und Betz, A.L., *Extravasation of albumin in ischaemic brain oedema*. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 1990. 51: S. 220-2.
147. Mittal, C.K. und Mehta, C.S., *Regulation of nitric oxide synthase: role of oxygen radicals and cations in nitric oxide formation*. *Adv Pharmacol*, 1995. 34: S. 235-50.
148. Morris, A.J. und Scarlata, S., *Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes*. *Biochem Pharmacol*, 1997. 54(4): S. 429-35.
149. Motz, W. und Strauer, B.E., *Improvement of coronary flow reserve after long-term therapy with enalapril*. *Hypertension*, 1996. 27(5): S. 1031-8.
150. Nagasawa, H. und Kogure, K., *Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion*. *Stroke*, 1989. 20(8): S. 1037-43.
151. Narotam, P.K., et al., *Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP-0127*. *Acta Neurochir (Wien)*, 1998. 140(8): S. 793-802; discussion 802-3.

152. Nedergaard, M., *Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia*. Acta Neurol Scand, 1988. 77(2): S. 81-101.
153. Neumann-Haefelin, T., et al., *Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation*. Stroke, 2000. 31(8): S. 1965-72; discussion 1972-3.
154. Noda, M., et al., *Expression and function of bradykinin receptors in microglia*. Life Sci, 2003. 72(14): S. 1573-81.
155. Ogawa, N., et al., *Post-ischemic administration of bifemelane hydrochloride prohibits ischemia-induced depletion of the muscarinic M1-receptor and its mRNA in the gerbil hippocampus*. Brain Res, 1992. 591(1): S. 171-5.
156. Osborne, K.A., et al., *Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1987. 50: S. 402-410.
157. Overgaard, K., et al., *A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. 12(3): S. 484-90.
158. Paczynski, R.P., et al., *Effects of fluid management on edema volume and midline shift in a rat model of ischemic stroke*. Stroke, 2000. 31(7): S. 1702-8.
159. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. und Moncada, S., *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. 327(6122): S. 524-6.
160. Pan, W., et al., *Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice*. Neurosci.Lett., 2001. 307(1): S. 25-28.
161. Parpura, V., et al., *Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling*. Nature, 1994. 369(6483): S. 744-7.
162. Pellgrino, L.J., *A stereotaxic atlas of the rat brain*. 2 ed. 1979, New York: Plenum Press.
163. Perry, D.C. und Snyder, S.H., *Identification of bradykinin in mammalian brain*. J Neurochem, 1984. 43(4): S. 1072-80.
164. Pesquero, J.B., et al., *Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(14): S. 8140-5.
165. Pike, B.R. und Hamm, R.J., *Activating the posttraumatic cholinergic system for the treatment of cognitive impairment following traumatic brain injury*. Pharmacol Biochem Behav, 1997. 57(4): S. 785-91.
166. Plesnila, N., et al., *Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats*. J.Neurotrauma, 2001. 18(10): S. 1049-1058.
167. Polosa, R., *Role of the kinin-kallikrein pathway in allergic diseases*. Allergy, 1993. 48(4): S. 217-25.
168. Prat, A., et al., *Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. 59(10): S. 896-906.
169. Proud, D., et al., *Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells*. Am Rev Respir Dis, 1985. 132(2): S. 405-8.
170. Pruneau, D., et al., *Effect of LF 16-0687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma*. J Neurotrauma, 1999. 16(11): S. 1057-65.
171. Pruneau, D., et al., *LF 16.0335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B2 receptor*. Br J Pharmacol, 1998. 125(2): S. 365-72.
172. Pruneau, D., et al., *Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist*. Immunopharmacology, 1999. 43(2-3): S. 187-94.
173. Pulsinelli, W.A. und Buchan, A., *The NMDA receptor/ion channel: Its importance to in vivo ischemic injury to selectively vulnerable neurons*, in *Pharmacology of cerebral ischemia*, Kriegstein, J. und Oberpichler, H., Editors. 1990, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart. S. 169-175.
174. Rabb, C.H., *Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats*. Stroke, 1996. 27(1): S. 151.

175. Rachinsky, M., et al., *The importance of kinin antagonist treatment timing in closed head trauma*. J.Trauma, 2001. 51(5): S. 944-948.
176. Raidoo, D.M. und Bhoola, K.D., *Kinin receptors on human neurones*. J Neuroimmunol, 1997. 77(1): S. 39-44.
177. Raidoo, D.M., et al., *Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain*. Immunopharmacology, 1996. 32(1-3): S. 39-47.
178. Raidoo, D.M., et al., *Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease*. Immunopharmacology, 1997. 36(2-3): S. 153-60.
179. Raidoo, D.M., et al., *Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells*. Immunopharmacology, 1999. 43(2-3): S. 255-263.
180. Raymond, J.J., Robertson, D.M. und Dinsdale, H.B., *Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier*. Can J Neurol Sci, 1986. 13(3): S. 214-20.
181. Regoli, D. und Barabe, J., *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. Pharmacol Rev, 1980. 32(1): S. 1-46.
182. Regoli, D., Boudon, A. und Fauchere, J.L., *Receptors and antagonists for substance P and related peptides*. Pharmacol Rev, 1994. 46(4): S. 551-99.
183. Regoli, D., et al., *Bradykinin receptors and their antagonists*. Eur J Pharmacol, 1998. 348(1): S. 1-10.
184. Regoli, D., et al., *Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 116-22.
185. Regoli, D., et al., *B1 and B2 kinin receptors in various species*. Immunopharmacology, 1997. 36(2-3): S. 143-7.
186. Regoli, D.C., Marceau, F. und Lavigne, J., *Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide*. Eur J Pharmacol, 1981. 71(1): S. 105-15.
187. Relton, J., et al., *Bradykinin B2-receptor antagonist CP-0597 reduces infarct volume after cerebral ischaemia in the rat: comparison with HOE 140, NPC17731 and MK801*. Br J Pharmacol, 1997. 120: S. 75P.
188. Relton, J., Rothwell, N.J. und Whalley, E.T., *Blockade of the bradykinin B1-receptor reverses the neuroprotective effect of b2-receptor antagonism after focal cerebral ischemia in the rat*. Br J Pharmacol, 1997. 120: S. 76P.
189. Relton, J.K., et al., *CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion*. Stroke, 1997. 28(7): S. 1430-6.
190. Rett, K., et al., *Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin*. Diabetes, 1996. 45 Suppl 1: S. S66-9.
191. Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. und Rosenfeld, G., *Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin*. Am. J. Physiol., 1949. 156: S. 261-273.
192. Rodell, T.C., *The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 279-83.
193. Rosamond, W.D., et al., *Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort*. Stroke, 1999. 30(4): S. 736-43.
194. Rosenblum, W.I., *Hydroxyl radical mediates the endothelium-dependent relaxation produced by bradykinin in mouse cerebral arterioles*. Circ Res, 1987. 61(4): S. 601-3.
195. Rothman, S.M. und Olney, J.W., *Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage*. Ann Neurol, 1986. 19(2): S. 105-11.
196. Sacco, R.L., et al., *American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors*. Stroke, 1997. 28(7): S. 1507-17.

197. Schanstra, J.P., et al., *The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts*. J Clin Invest, 1998. 101(10): S. 2080-91.
198. Schill, W.B. und Miska, W., *Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions*. Andrologia, 1992. 24(2): S. 69-75.
199. Schini, V.B., et al., *Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 252(2): S. 581-5.
200. Schmaier, A.H., *Gene expression, regulation and cell surface presentation of the kininogens*, in *The Kinin System*, Farmer, S.G., Editor. 1997, Academic Press: San Diego. S. 57-70.
201. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Combination drug therapy and mild hypothermia: a promising treatment strategy for reversible, focal cerebral ischemia*. Stroke, 1999. 30(9): S. 1891-9.
202. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Neuroprotective effects of the novel brain-penetrating antioxidant U-101033E and the spin-trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN)*. Exp Brain Res, 2000. 130(1): S. 60-6.
203. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Neuroprotective efficacy of combination therapy with two different antioxidants in rats subjected to transient focal ischemia*. Brain Res, 1999. 816(2): S. 471-9.
204. Schmid-Elsaesser, R., et al., *EEG burst suppression is not necessary for maximum barbiturate protection in transient focal cerebral ischemia in the rat*. J Neurol Sci, 1999. 162(1): S. 14-9.
205. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Neuroprotective properties of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1997. 70: S. 176-8.
206. Schmid-Elsaesser, R., et al., *A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry*. Stroke, 1998. 29(10): S. 2162-70.
207. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Monotherapy with dextromethorphan or tirilazad--but not a combination of both--improves outcome after transient focal cerebral ischemia in rats*. Exp Brain Res, 1998. 122(1): S. 121-7.
208. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Neuroprotective effects of combination therapy with tirilazad and magnesium in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia*. Neurosurgery, 1999. 44(1): S. 163-71; discussion 171-2.
209. Schmid-Elsaesser, R., et al., *Superior neuroprotective efficacy of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia*. Stroke, 1997. 28(10): S. 2018-24.
210. Schulz, J., et al., *LF16-0687 a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist reduces vasogenic brain edema from a focal lesion in rats*. Acta Neurochir.Suppl, 2000. 76: S. 137-139.
211. Schwab, S., et al., *Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction*. Stroke, 1998. 29(9): S. 1888-93.
212. Schwaninger, M., et al., *Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB*. J Neurochem, 1999. 73(4): S. 1461-6.
213. Shigeno, T., et al., *The determination of brain water content: microgravimetry versus drying-weighing method*. J Neurosurg, 1982. 57(1): S. 99-107.
214. Siesjo, B.K., *Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment*. J Neurosurg, 1992. 77: S. 337-354.
215. Siesjo, B.K. und Siesjo, P., *Mechanisms of secondary brain injury*. Eur J Anaesthesiol, 1996. 13(3): S. 247-68.

216. Simon, M.I., Strathmann, M.P. und Gautam, N., *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. 252(5007): S. 802-8.
217. Sobey, C.G., *Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy?* Br J Pharmacol, 2003. 139(8): S. 1369-71.
218. Sobey, C.G., Heistad, D.D. und Faraci, F.M., *Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K<sup>+</sup> channels*. Stroke, 1997. 28(11): S. 2290-4; discussion 2295.
219. Steranka, L.R., et al., *Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(9): S. 3245-9.
220. Stoffel, M., et al., *The effect of dietary alpha-tocopherol on the experimental vasogenic brain edema*. J Neurotrauma, 1997. 14(5): S. 339-48.
221. Stover, J.F., Dohse, N.K. und Unterberg, A.W., *Bradykinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms reduces posttraumatic brain edema*. Acta Neurochir.Suppl, 2000. 76: S. 171-175.
222. Stover, J.F., Dohse, N.K. und Unterberg, A.W., *Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats*. J Neurosurg, 2000. 92(5): S. 853-9.
223. Takano, M., et al., *Expression of kininogen mRNAs and plasma kallikrein mRNA by cultured neurons, astrocytes and meningeal cells in the rat brain*. Immunopharmacology, 1999. 45(1-3): S. 121-6.
224. Tamura, A., et al., *Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 1981. 1(1): S. 53-60.
225. Taylor, T.N., et al., *Lifetime cost of stroke in the United States*. Stroke, 1996. 27(9): S. 1459-66.
226. Thorvaldsen, P., et al., *Stroke trends in the WHO MONICA project*. Stroke, 1997. 28(3): S. 500-6.
227. Tokumasu, T., Ueno, A. und Oh-ishi, S., *A hypotensive response induced by des-Arg9-bradykinin in young brown/Norway rats pretreated with endotoxin*. Eur J Pharmacol, 1995. 274(1-3): S. 225-8.
228. Trifilieff, A., Da Silva, A. und Gies, J.P., *Kinins and respiratory tract diseases*. Eur Respir J, 1993. 6(4): S. 576-87.
229. Uchida, M., et al., *Overexpression of bradykinin type 2 receptors on glioma cells enhances bradykinin-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase*. Neurol.Res., 2002. 24(8): S. 739-746.
230. Unterberg, A. und Baethmann, A.J., *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma*. J Neurosurg, 1984. 61(1): S. 87-96.
231. Unterberg, A., et al., *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling*. J Neurosurg, 1986. 64(2): S. 269-76.
232. Unterberg, A., Wahl, M. und Baethmann, A., *Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo*. J Cereb Blood Flow Metab, 1984. 4(4): S. 574-85.
233. Verrecchia, C., Mesenge, C. und Plotkine, M., *Neuroprotective effect of LF16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, on a model of traumatic brain injury in mice*. Restor.Neurol.Neurosci., 2000. 16(3,4): S. 177-178.
234. Verresen, L., et al., *Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes*. Kidney Int, 1994. 45(5): S. 1497-503.
235. Vinall, P.E., et al., *Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult*. J Neurosurg, 2000. 93(1): S. 82-9.
236. Wagner, S., et al., *Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke*. J.Neurol.Sci., 2002. 202(1-2): S. 75-76.

237. Wahl, M., et al., *Effects of bradykinin in the cerebral circulation*. Acta Physiol Hung, 1999. 86(2): S. 155-60.
238. Wahl, M., et al., *Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1993. 57: S. 64-72.
239. Wahl, M., et al., *Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema*. J Cereb Blood Flow Metab, 1988. 8(5): S. 621-34.
240. Wahl, M., et al., *Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation*. Immunopharmacology, 1996. 33(1-3): S. 257-63.
241. Wahl, M., et al., *Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in situ*. J Cereb Blood Flow Metab, 1983. 3(2): S. 231-7.
242. Wahl, M., et al., *Effects of kininase II inhibitors on the vasomotor response to bradykinin of feline intracranial and extracranial arteries in vitro and in situ*. J Cereb Blood Flow Metab, 1983. 3(3): S. 339-45.
243. Walker, K., Perkins, M. und Dray, A., *Kinins and kinin receptors in the nervous system*. Neurochem Int, 1995. 26(1): S. 1-16; discussion 17-26.
244. Wang, C.X., et al., *A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation*. Brain Res Brain Res Protoc, 2001. 7(2): S. 115-20.
245. Werle, E. und Berek, U., *Zur Kenntnis des Kallikreins*. Angew. Chem., 1948. 60A: S. 53.
246. Werle, E., Götze, W. und Keppler, A., *Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue Darmkontrahierende Substanz*. Biochem. J, 1937. 289: S. 217-233.
247. Whalley, E.T. und Wahl, M., *Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1983. 323(1): S. 66-71.
248. Whittle, I.R., Piper, I.R. und Miller, J.D., *The role of bradykinin in the etiology of vasogenic brain edema and perilesional brain dysfunction*. Acta Neurochir (Wien), 1992. 115(1-2): S. 53-9.
249. Windischhofer, W. und Leis, H.J., *[3H]bradykinin receptor-binding, receptor-recycling, and receptor-internalization of the B2 bradykinin receptor in the murine osteoblast-like cell line MC3T3-E1*. J Bone Miner Res, 1997. 12(10): S. 1615-25.
250. Woo, D., et al., *Incidence rates of first-ever ischemic stroke subtypes among blacks: a population-based study*. Stroke, 1999. 30(12): S. 2517-22.
251. Yamawaki, I., et al., *Levodropropizine reduces capsaicin- and substance P-induced plasma extravasation in the rat trachea*. Eur J Pharmacol, 1993. 243(1): S. 1-6.
252. Yang, C.M., et al., *Pharmacological and functional characterization of bradykinin receptors in rat cultured vascular smooth muscle cells*. Cell Signal, 1999. 11(12): S. 853-62.
253. Yang, X.P., et al., *Role of kinins in the cardioprotective effect of preconditioning: study of myocardial ischemia/reperfusion injury in B2 kinin receptor knockout mice and kininogen-deficient rats*. Hypertension, 1997. 30(3 Pt 2): S. 735-40.
254. Yusuf, S., et al., *Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions*. Lancet, 1992. 340(8829): S. 1173-8.
255. Zausinger, S., Baethmann, A. und Schmid-Elsaesser, R., *Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions*. Brain Res Protoc, 2002. 9(2): S. 112-21.
256. Zausinger, S., et al., *Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms*. Brain Res, 2000. 863(1-2): S. 94-105.
257. Zausinger, S., et al., *Neuroprotective treatment paradigms in neurovascular surgery--efficacy in a rat model of focal cerebral ischemia*. Acta Neurochir Suppl, 2001. 77: S. 259-65.

258. Zausinger, S., et al., *Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen*. *Stroke*, 2003. 34(6): S. 1526-32.
259. Zhang, R.L., et al., *A rat model of focal embolic cerebral ischemia*. *Brain Res*, 1997. 766(1-2): S. 83-92.
260. Zhang, R.L., et al., *Thrombolysis With Tissue Plasminogen Activator Alters Adhesion Molecule Expression in the Ischemic Rat Brain • Editorial Comment*. *Stroke*, 1999. 30(3): S. 624-629.
261. Zhao, Q., et al., *Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament*. *Brain Res*, 1994. 649(1-2): S. 253-9.

## 6 Anhang

### A Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	Arteria, Arteriae
ACE	Angiotensin-Converting Enzym, Kininase II
ACE-Inhibitor, ACE-I	Angiotensin-Converting Enzym Inhibitor
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Issooxazol-Propionsäure (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-issooxazol-propionic acid)
ARDS	Akutes Resipratorisches Atemnot Syndrom (acute respiratory distress syndrome)
ASS	Azetylsalizylsäure
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin <sub>1</sub> -Rezeptor
AT-II	Angiotensin II
BGA	Blutgasanalyse
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BK	Bradykinin
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosinmonophosphate)
DAG	Diacylglycerin
DBK	des-Arg <sup>9</sup> -Bradykinin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ECE	Endothelin konvertierendes Enzym (endothelin converting enzyme)
EDRF	(vom) Endothel abgeleiteter Relaxierungsfaktor (endothelial derived relaxing factor)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Endothelin
EZR	Extrazellulärraum
FG	Feuchtgewicht
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor)
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HMWK	Kallekreinase (high molecular weight kininogen)
i.v.	intravenös
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
ICB	Intrazerebralblutung (intracerebral bleeding)
ICP	Intrakranieller Druck (intracranial pressure)
IL	Interleukin, Interleukine
IP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IZR	Intrazellulärraum
LCBF	lokaler zerebraler Blutfluss (local cerebral blood flow)
LMWK	Kallekreinase (low molecular weight kininogen)

LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
M.	Musculus
MG	Molekulargewicht
MIP	Inflammatorisches Protein der Makrophagen (Macrophage Inflammatory Protein)
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MW	Mittelwert
NA	Noradrenalin
NKA	Neurokinin A
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase)
OH-	Hydroxylgruppe, negativ geladenes Hydroxyd-Ion
PAF	Plättchen aktivierender Faktor (platelet activating factor)
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
Pgl <sub>2</sub>	Prostazyklin
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositoldiphosphat
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
RBF	Renaler Blutfluss
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rt-PA	rekombinanter Gewebs-Plasminogen Aktivator (recombinant tissue plasminogen activator)
s.c.	subkutan (subcutaneous)
SAB	Subarachnoidalblutung (subarachnoidal bleeding, subarachnoidal hemorrhage)
SBTI	Sojabohnen Trypsin Inhibitor (soy bean trypsin inhibitor)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Absoluter Fehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SHR	Spontan Hypertensive Ratte(n)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	systemisches inflammatorisches Reaktionssyndrom (systemic inflammatory response syndrome)
SP	Substanz P
TG	Trockengewicht
TK	Tissue Kallikrein
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **B Begriffsdefinitionen**

Kallikreinasen	Aktivatoren der Konversion von Prekallikrein zu Kallikrein
Kininogene	Prekallikreine, Inaktive Vorstufen des Kallikrein: HMWK und LMWK
Kallikrein	Plasma und Tissue Kallikrein
Kinine	Bradykinin und Kallidin

## **C Danksagung**

Mein Dank gilt im folgenden vor allem den Personen, die das Gelingen dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann für die Überlassung der Doktorarbeit, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe "Experimentelle Neurochirurgie" und der damit verbundenen Integration in ein wissenschaftlich anregendes Umfeld mit wertvollen Diskussionen und vor allem für dessen Unterstützung, die auch über die wissenschaftliche Arbeit hinausreichte.

Bei Herrn PD Dr. Robert Schmid-Elsaesser möchte ich mich besonders für die Beratung und Betreuung im Rahmen der Abfassung der Doktorarbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Stefan Zausinger für die ausgezeichnete Betreuung während aller Phasen der Studie, der mir die Grundlagen der aufwendigen Versuchsdurchführung beibrachte und mir mit seiner kritischen und präzisen Arbeitsweise wertvolle Anregungen und konstruktives Feedback gab.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Konrad Messmer für die Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung.

Bei Dr. Jürgen Peters und Dr. Nik Plesnila sowie dem gesamten "Neuroteam" für die freundliche Integration, die kameradschaftliche Zusammenarbeit und die mannigfaltige Unterstützung.

Mein weiterer aufrichtiger Dank gilt Veronika Bischoff für die sorgfältige Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mir die Grundlagen für meine Ausbildung und diese Arbeit gegeben hat, und ohne deren Unterstützung die Vollendung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

## D Lebenslauf

David Benjamin Lumenta

Geburtsdatum 11. Juni 1976  
Geburtsort Bonn  
Eltern Prof. Dr. Ch. B. Lumenta, Neurochirurg  
Anna-Magdalene Lumenta, geb. Müller, Lehrerin

Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Schulbildung

1981 - 1986 Städtische Grundschule Düsseldorf  
1986 - 1992 Städtisches Schloss Gymnasium Düsseldorf  
1992 - 1995 Staatliches Wittelsbacher Gymnasium München

### Zivildienst

10/1995 - 10/1996 Malteser Hilfsdienst e.V. in München mit Qualifikation zum  
Rettungssanitäter

### Studium

10/1996 - 05/2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
05/2003 Abschluss des Medizinstudiums

### Ärztliche Tätigkeit

11/2003 – 05/2004 Assistenzarzt (FFI), Verbrennungsintensivstation, Plastische und  
Rekonstruktive Chirurgie, *Hôpital de la Conception*,  
Universitätsklinikum Marseille, Frankreich  
seit 05/2004 Assistenzarzt (FFI), Allgemeinchirurgie und Lebertransplantationen,  
*Hôpital de la Conception*, Universitätsklinikum Marseille, Frankreich

## **E Erklärung**

Ich versichere, meine Doktorarbeit selbständig angefertigt und keine Hilfsmittel oder Quellen benutzt zu haben, die nicht angegeben sind.