

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Rolle der Kinin Rezeptoren beim sekundären Hirnschaden nach  
transienter fokaler zerebraler Ischämie der Maus

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

vorgelegt von  
Moritz Friedrich Gröger  
aus  
München  
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Plesnila  
Priv. Doz. Dr. A. Faußner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B.F. Becker  
Prof. Dr. H. Schad

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2007

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Versuchstiere	12
2.2	Experimentelles Modell	13
2.2.1	Anästhesie	13
2.2.2	Aufrechterhaltung der Körpertemperatur	13
2.2.3	Messung der lokalen Hirndurchblutung mit Laser-Doppler Fluxmetrie	14
2.2.4	Transiente fokale zerebrale Ischämie durch temporäre Okklusion der A. cerebri media	15
2.2.5	Protokolle der unterschiedlichen Versuchsgruppen	17
2.3	Bestimmung der Bradykinin Konzentration in Blut und Gehirn	20
2.4	Quantifizierung der mRNA der Kinin Rezeptoren mit Real-Time PCR	21
2.5	Immunhistochemie der Kinin Rezeptoren	23
2.6	Western Blot Analyse der Kinin Rezeptoren	25
2.7	Charakterisierung der Gefäßanatomie von C57/Bl6 und B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup> Mäusen	26
2.8	Erhebung physiologischer Parameter	29
2.9	Gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehalts	30
2.10	Histomorphometrische Quantifizierung des Infarktolumens	31
2.11	Test der motorischen Funktion	32
2.12	Langzeitbeobachtung	33
2.13	Statistik	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Zeitlicher Verlauf der Bradykinin-Produktion und Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie	35
3.1.1	Bradykinin Konzentration im Gehirn nach Ischämie	35
3.1.2	Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie	36
3.1.2.1	mRNA der Kinin Rezeptoren	36
3.1.2.1.1	Kinin B <sub>1</sub> Rezeptor	36
3.1.2.1.2	Kinin B <sub>2</sub> Rezeptor	38
3.1.2.2	Immunhistochemie der Kinin Rezeptoren	40
3.1.2.2.1	Kinin B <sub>1</sub> Rezeptor	40
3.1.2.2.2	Kinin B <sub>2</sub> Rezeptor	44
3.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Bradykinin Produktion und Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie	48

<b>3. 2</b>	<b>Charakterisierung von B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen und ihren Kontrollen C57/Bl6 hinsichtlich versuchsrelevanter Parameter</b>	<b>49</b>
3. 2. 1	Bradykinin Konzentration in Blut und Gehirn	49
3. 2. 2	Expression des Kinin B <sub>1</sub> Rezeptors	50
3. 2. 3	Gefäßanatomie	50
3. 2. 3. 1	Größe des Versorgungsgebiets der Arteria cerebri media	51
3. 2. 3. 2	Ausbildung der Arteria communicans posterior	52
3. 2. 4	Lokale Hirndurchblutung	53
3. 2. 5	Physiologische Parameter	54
3. 2. 6	Körpertemperatur	56
3. 2. 7	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung von B <sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen und ihren Kontrollen C57/Bl6	58
<b>3. 3</b>	<b>Bedeutung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Pathologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie</b>	<b>59</b>
3. 3. 1	Hirnödem	59
3. 3. 1. 1	Hirnwassergehalt von ipsi- und kontralateraler Hemisphäre	60
3. 3. 1. 2	Schwellung der ischämischen Hemisphäre	62
3. 3. 1. 3	Räumliche Verteilung von Infarkt und Schwellung innerhalb der Hemisphäre	62
3. 3. 2	Infarktvolumen	65
3. 3. 3	Motorische Funktion	66
3. 3. 4	Langzeitüberleben	67
3. 3. 5	Körpergewicht	69
3. 3. 6	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bedeutung des Kinin B <sub>2</sub> Rezeptors für die Pathologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>4. 1</b>	<b>Experimentelles Modell</b>	<b>73</b>
4. 1. 1	Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie	73
4. 1. 2	Versuchstiere und ihre Charakterisierung	79
4. 1. 3	Anästhesie	90
<b>4. 2</b>	<b>Das Kallikrein-Kinin System im Zentralnervensystem</b>	<b>92</b>
4. 2. 1	Bedeutung des Kallikrein-Kinin Systems im Zentralnervensystem	93
4. 2. 2	Mögliche Wege der Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie	96
4. 2. 3	Bradykinin und die Kinin Rezeptoren nach transienter fokaler zerebraler Ischämie	102
<b>4. 3</b>	<b>Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für den neuronalen Zelltod nach transienter fokaler zerebraler Ischämie</b>	<b>111</b>
4. 3. 1	Hirnödem	111
4. 3. 2	Infarktvolumen	113
4. 3. 3	Kurz- und langfristige Folgen der Ischämie	115
4. 3. 4	Schlussfolgerung	117

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>153</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>





# 1 Einleitung

Bei Schlaganfällen handelt es sich laut WHO um Krankheitsbilder, bei denen sich die klinischen Zeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich nicht auf andere als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können.

Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen und weltweit für ca. 10% aller Todesfälle verantwortlich (Lo et al., 2003). Auch ist der akute Schlaganfall die häufigste akute neurologische Erkrankung und wegen der hohen Behandlungskosten von großer gesundheitspolitischer Bedeutung. Obwohl Präventionsmaßnahmen wie die Einnahme von gerinnungshemmenden Mitteln oder Cholesterinsenkenden Medikamenten die Mortalität und Morbidität in den letzten Jahrzehnten deutlich vermindert haben, bleibt der Schlaganfall eine der Hauptursachen für Tod, Behinderung und Erwerbsunfähigkeit (Thomassen et al., 2003). Besonders aufgrund des steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerung besteht ein großer und dringender Entwicklungsbedarf einer klinisch effektiven Therapie des akuten Schlaganfalls (Sobey, 2003).

Die meisten Schlaganfälle sind ischämischer Natur, verursacht durch den thromboembolischen Verschluss einer großen hirnversorgenden Arterie. Wird das entstandene Blutgerinnsel nicht innerhalb kurzer Zeit aufgelöst, entwickelt sich im Kernversorgungsgebiet der verlegten Arterie eine Nekrose – dieses ischämische Hirngewebe kann nicht mehr gerettet werden. Pharmaka, die Blutgerinnsel innerhalb kurzer Zeit auflösen, führen zu einer Reperfusion des ischämischen Gewebes und bilden somit die Grundlage der Thrombolysetherapie. Thrombolyse wird in den meisten europäischen Ländern und den USA in der Akuttherapie des Schlaganfalls eingesetzt (Fisher, 2003; Lo et al., 2003; Thomassen et al., 2003), und der thrombolytische rekombinante tissue Plasminogen Activator (rtPA) ist bisher die einzige zugelassene pharmakologische Therapie des akuten Schlaganfalls (Hacke et al., 1995; Hacke et al., 1999; Morgenstern, 1997). Die Durchführung dieser Therapie ist jedoch nur innerhalb eines sehr engen Zeitfensters von drei Stunden nach Beginn der Symptomatik möglich (Fisher, 2003; Thomassen et al., 2003) und kann nur in einem geringen Prozentsatz der Fälle angewandt werden. Dies ist meist dadurch bedingt, dass die Patienten das Krankenhaus zu spät erreichen, aber auch durch eines der zahlreichen anderen

Ausschlusskriterien wie beispielsweise eine Gerinnungsstörung oder –hemmung, eine Hypo- oder Hyperglykämie, einen Krampfanfall seit Beginn der Symptomatik, eine im CT sichtbare intrakranielle Blutung, ein Schädel-Hirn Trauma u.v.a. verursacht sein kann (Fisher, 2003; Hacke et al., 1995; Hacke et al., 1999; Morgenstern, 1997). Die bestehenden therapeutischen Möglichkeiten sind also bei weitem nicht suffizient, sodass weiterhin die dringende Notwendigkeit besteht, die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie zu erforschen und neue Therapien zu entwickeln.

Der Teil des Schadens, der einer Therapie potentiell zugänglich ist, wird als sekundärer Hirnschaden bezeichnet. Er beschreibt den Zellschaden, der noch nicht sofort nach dem Insult offensichtlich ist, sondern mit einer Verzögerung von Stunden bis Tagen durch Mechanismen entsteht, die durch die Ischämie in Gang gesetzt worden sind. Sein Auftreten ist von der Schwere und Dauer der Ischämie sowie der selektiven Vulnerabilität von Neuronen in verschiedenen Hirnregionen abhängig (Siesjo und Siesjo, 1996; White et al., 2000). Sehr wichtige Mechanismen, die in dieser Periode der Infarktreifung zur Einleitung des ultimativen Zelltods führen, sind die Störung der Calcium Homeostase mit Überladung der Zellen mit Calcium, die Akkumulation von Laktat mit Azidose, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Störungen des Energiehaushalts der Zellen (Dirnagl et al., 1999; Kristian und Siesjo, 1998; Lipton, 1999; Raichle, 1983; Siesjo et al., 1995). Gefördert werden können diese Mechanismen durch extrinsische Faktoren wie z.B. Hypoxie, Hypotonie, Hyperthermie und Infektionen oder durch intrinsische Faktoren, zu denen Periinfarktdepolarisationen, Exzitotoxizität durch Glutamat, Inflammation, mikrovaskuläre Dysfunktion oder Störung der Blut-Hirn Schranke zählen (Dirnagl et al., 1999; Siesjo und Siesjo, 1996).

Dass Bradykinin, ein aktiver Bestandteil des Kallikrein-Kinin Systems, zu einer solchen Störung der Blut-Hirn Schranke führen kann, wurde in der Arbeitsgruppe 1984 von Unterberg et al. gezeigt. In dieser intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Studie an Katzen führte die Superfusion des Kortex mit Bradykinin zu einer Permeabilitätserhöhung pialer Gefäße für  $\text{Na}^+$ -Fluorescein (Unterberg et al., 1984). Raymond et al. bestätigten diesen Befund, indem sie nach der Applikation von Bradykinin in die Carotis von Ratten im zerebralen Gefäßsystem eine starke Extravasation des systemisch verabreichten Enzyms Meerrettichperoxidase sowie im Endothel viele pinocytotische Vesikel, die dieses Enzym enthielten, beobachteten (Raymond et al., 1986).

Der in diesen Studien verwendete Entzündungsmediator Bradykinin wird nach Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems gebildet (Regoli und Barabe, 1980). Der Hageman Faktor (Faktor XII der Blutgerinnung), Trypsin oder andere Peptidasen aktivieren das Enzym Kallikrein, von dem es eine Plasma- (p) und eine Gewebe- (tissue = t) Variante gibt, durch proteolytische Spaltung aus seinem inaktiven Proenzym Präkallikrein. Die aktiven Metabolite des Systems, die Kinine, werden dann von Kallikrein aus ihren inaktiven Vorstufen, den Kininogenen, gebildet. Dabei entstehen das Nonapeptid Bradykinin, das durch p-Kallikrein aus High Molecular Weight Kininogen (HMWK) abgespalten wird, und das Dekapeptid Kallidin, das sich von Bradykinin nur durch ein zusätzliches Lysin am N-Terminus unterscheidet und durch t-Kallikrein aus Low Molecular Weight Kininogen (LMWK) abgespalten wird. Die Kinine Bradykinin und Kallidin sind die Hauptagonisten am Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor und können durch die Kininasen I und II sowie andere Peptidasen abgebaut werden. Während dabei zumeist inaktive Peptide entstehen, führt die Abspaltung des C-terminalen Arginins durch die Kininase I zur Bildung der Hauptagonisten am Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor, nämlich des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin.

Alle soeben in der Aktivierungskaskade beschriebenen Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems sind in Gehirnen unterschiedlicher Spezies nachgewiesen worden. So wurde das Vorkommen von p und t Kallikrein bzw. deren mRNA nicht nur in verschiedenen Regionen des Gehirns von Ratten (Chao et al., 1983; Kizuki et al., 1994; Scicli et al., 1984) und von der Arbeitsgruppe um Raidoo in humanem zerebralen Atopsie-Gewebe gezeigt (Cerf und Raidoo, 2000; Mahabeer et al., 2000; Raidoo et al., 1996b), sondern ebenso in Liquor (Khan et al., 1993; Scicli et al., 1984) und Gefäßen (Raidoo et al., 1997; Saed et al., 1990) beider Spezies. Ferner ist die Expression von Kininogen mRNA im Gehirn der Ratte bestimmt worden (Takano et al., 2000). Der Versuch des Nachweises von HMWK im menschlichen Gehirn war jedoch nicht erfolgreich (Kleniewski und Bogumil-Oczkowska, 1980). Wahrscheinlich sind Kinine im menschlichen Gehirn aufgrund von methodischen Problemen bisher noch nicht nachgewiesen worden, die sich aus einer sehr kurzen biologischen Halbwertszeit – nach intrazerebroventrikulärer Injektion bei der Ratte 26,6±3,6 Sekunden (Kariya et al., 1982b) – und einer geringen Verfügbarkeit von Probenmaterial ergeben. Ihr zerebrales Vorkommen wurde dafür aber von mehreren Autoren im Rattenhirn bewiesen (Correa et al., 1979; Kariya et al., 1982b; Kariya et al., 1985; Perry und Snyder, 1984; Shi et al., 1998; Xu et al., 1991; Yamauchi et al., 1985). Die Konzentration von Kininogenen und Kininen ist bisher lediglich im Liquor des Menschen gemessen worden

(Scicli et al., 1984). Der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor wiederum konnte im Gehirn des Menschen nachgewiesen werden (De Sousa et al., 2002; Mahabeer et al., 2000; Raidoo et al., 1996a; Raidoo und Bhoola, 1997), sowie auch in den Gehirnen von Meerschweinchen (Fujiwara et al., 1988; Fujiwara et al., 1989; Murone et al., 1996; Privitera et al., 1992), Ratte (Chen et al., 2000; Ongali et al., 2003; Privitera et al., 2003; Shi et al., 1999) und Schaf (Murone et al., 1997). Während der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor konstitutiv exprimiert wird, geht man beim Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor davon aus, dass dieser erst nach Stimulation hergestellt wird (Marceau et al., 1998; Regoli und Barabe, 1980). Dass die Arbeitsgruppe um Raidoo dennoch den B<sub>1</sub> Rezeptor in Hypothalamus und Thalamus des menschlichen Gehirns detektieren konnte, könnte darauf hinweisen, dass dieser Rezeptor in einer bestimmten Subgruppe von Neuronen konstitutiv exprimiert wird (Mahabeer et al., 2000; Raidoo und Bhoola, 1997). Die Existenz eines allgemeinen Bradykinin inaktivierenden Systems wurde in den Gehirnen von Kaninchen und Ratten gezeigt (Camargo und Graeff, 1969; Kariya et al., 1981b), im Speziellen die der Kininase II, die dem Angiotensin Converting Enzyme entspricht, von der Arbeitsgruppe um Correa im Rattenhirn (Correa et al., 1986; Correa et al., 1990). Somit ist das Vorkommen sämtlicher Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems im Gehirn gezeigt worden, wobei diese aber nicht gleichmäßig über das gesamte Hirn verteilt sind, sondern in bestimmten Regionen in höherer Quantität zu finden sind.

Es wird vermutet, dass das Kallikrein-Kinin System entsprechend den Aufgaben der anatomischen Strukturen, in denen es verstärkt nachgewiesen wurde, als Neuromodulator von funktioneller physiologischer Bedeutung sein könnte. Am umfassendsten ist bisher untersucht worden, inwiefern Bradykinin in der zentralen Blutdruckregulation eine Rolle spielt. Durch Graeff et al. konnte 1969 erstmals gezeigt werden, dass es nach der Injektion von Bradykinin in den Seitenventrikel von nicht-anästhesierten Kaninchen zu einer exzitatorischen Phase von 1-2 Minuten kommt, auf die eine sedative folgt, die ihr Maximum zwischen 5 und 10 Minuten erreicht und 20-40 Minuten anhält (Graeff et al., 1969). In der Exzitationsphase, die beim Kaninchen durch eine erhöhte Wachsamkeit, Fluchtreaktion und Vokalisationen, bei der Ratte eher durch Unruhe und Zittern gekennzeichnet ist, kommt es neben Hyperventilation und Tachykardie auch zu Hypertonie (Graeff et al., 1969; Kariya et al., 1981a; Kariya et al., 1982a; Kariya und Yamauchi, 1981). Untermuert werden diese Ergebnisse durch den Befund, dass B<sub>2</sub> Rezeptoren vermehrt in den Regionen zu finden sind, denen eine Bedeutung für die kardiovaskuläre Regulation zugeschrieben wird (Cloutier et al., 2004). So bewirkte die intraventrikuläre Injektion von Bradykinin bei Ratten eine verstärkte Antidiurese durch

Ausschüttung von Vasopressin, was jedoch nicht für den beobachteten Blutdruck steigernden Effekt verantwortlich ist (Brooks et al., 1986; Hoffman und Schmid, 1978). Wahrscheinlicher ist, dass Bradykinin das vegetative Nervensystem beeinflusst – hauptsächlich sympathoneuronal, nicht sympathoadrenal (Graeff et al., 1969; Guo et al., 2002; Qadri et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass Bradykinin über eine Beeinflussung des Tonus sympathischer Zentren – z.B. des Hypothalamus dorsalis, der rostroventrolateralen Medulla oder des Nucleus paratrigenus – und parasymphischer Kerne wie der Nuclei hypothalamicus anterior oder tractus solitarii durch Verschiebung der Kräfteverhältnisse der beiden Systeme entweder zu einem Anstieg oder einem Abfall des Blutdrucks führen kann (Caligiore et al., 1996; Lindsey et al., 1997; Madeddu et al., 1996; Qadri et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist noch erwähnenswert, dass bei spontan hypertensiven Ratten Störungen in der Aktivität des Kallikrein-Kinin Systems in bestimmten Hirnregionen als Ursache für ihren hypertensiven Phänotyp diskutiert werden (Cloutier et al., 2004; Khan et al., 1993; Privitera und Yates, 1995; Qadri et al., 2002; Wang et al., 1998). Neben der Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Blutdruckregulation scheint Bradykinin auch für die Wahrnehmung und Verarbeitung von Schmerz von Bedeutung zu sein. Während Bradykinin peripher hyperalgetisch wirkt (Levy und Zochodne, 2000; Steranka et al., 1988) – es gilt allgemein als Entzündungsmediator, der in der Akutphase über den B<sub>2</sub> Rezeptor und in der chronischen Phase über den B<sub>1</sub> Rezeptor wirkt (Couture et al., 2001) –, hat die zentrale Applikation durch intraventrikuläre Injektion einen antinozizeptiven Effekt (Couto et al., 1998; Ribeiro et al., 1971). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Bradykinin an der zentralen Thermoregulation (Almeida e Silva TC und Pela, 1978) und an der Ausschüttung von Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) im Hypothalamus (Shi et al., 1998; Shi et al., 1999).

Neben dieser breit gefächerten, aber noch nicht ausreichend verstandenen physiologischen Bedeutung im Gehirn, kommt dem Kallikrein-Kinin System – wie bereits erwähnt – auch eine Bedeutung in der Pathophysiologie des zentralen Nervensystems zu. Dass die von Unterberg et al. 1984 beobachtete Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch Bradykinin von praktischer Relevanz ist, zeigten Unterberg et al. 1986 für das Trauma und Kamiya et al. 1993 für die Ischämie. Beide hemmten mit Aprotinin die Enzyme p- und t-Kallikrein und damit die Bildung von Kininen. Unterberg et al. erzielten nach Kälte-induzierter Läsion des Kortex am Kaninchen eine Zuwachsverminderung des Wassergehalts der traumatisierten Hemisphäre (Unterberg et al., 1986). Ebenfalls eine verminderte Zunahme

des Wassergehalts im Gehirn sahen Kamiya et al. nach dreistündiger globaler Ischämie der Ratte (Kamiya et al., 1993). Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems nach Trauma oder Ischämie zu einer Störung der Blut-Hirn Schranke mit daraus folgendem Hirnödem führt. Dass dieser pathologische Mechanismus über den B<sub>2</sub> Rezeptor vermittelt wird, zeigen mehrere tierexperimentelle Studien mit Kinin Rezeptor Antagonisten. Mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten LF 16-0687Ms erreichten Pruneau et al. beim geschlossenen Schädel-Hirn Trauma an der Ratte eine Verminderung des Hirnödems um 64% und eine Verbesserung der motorischen Funktion (Pruneau et al., 1999). Hellal et al. bewirkten an der Maus eine 22%ige Ödemreduktion sowie ein um 26% vermindertes neurologisches Defizit (Hellal et al., 2003). Die Verringerung der Ödembildung durch diesen Antagonisten wurde in anderen experimentellen Modellen des Schädel-Hirn Traumas an der Ratte bestätigt, nämlich im Controlled Cortical Impact (Kaplanski et al., 2002; Kaplanski et al., 2003; Stover et al., 2000) und in der Kälteläsion (Plesnila et al., 2001a; Schulz et al., 2000). Gorlach et al. lieferten eine weitere Bestätigung, indem sie bei der Kälteläsion an der Ratte mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten HOE 140, nicht aber dem B<sub>1</sub> Rezeptor Antagonisten B 9858 einen ähnlichen Effekt erzielten (Gorlach et al., 2001). Für die zerebrale Ischämie zeigten Relton et al. 1997 die Bedeutung des B<sub>2</sub> Rezeptors. Sie erreichten mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten CP-0597 bei der transitorischen Okklusion der A. cerebri media der Ratte eine Reduktion des Infarktolumens um 55% und der Hemisphärenschwellung um 49% sowie eine Verbesserung der neurologischen Funktion (Relton et al., 1997). Dieser protektive Effekt wurde im selben Modell der transitorischen fokalen zerebralen Ischämie mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten LF 16-0687Ms von Zausinger et al. an der Ratte (Zausinger et al., 2002) und von Ding-Zhou et al. an der Maus (Ding-Zhou et al., 2003) bestätigt. Ein weiteres Krankheitsbild, bei dem die Rolle des B<sub>2</sub> Rezeptors untersucht wurde, ist die bakterielle Meningitis. Lorenzl et al. erreichten in einem Rattenmodell der Pneumokokken Meningitis mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten HOE 140 eine Abschwächung der Zunahme von regionaler Hirndurchblutung, intrakraniellm Druck und Hirnwassergehalt (Lorenzl et al., 1996). Diese Ergebnisse zeigen, dass es im Rahmen pathologischer Prozesse im Gehirn zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems kommt und dass die dabei gebildeten Kinine über den B<sub>2</sub> Rezeptor pathologische Mechanismen, wie beispielsweise die Entstehung eines Hirnödems, in Gang setzen.

Es existieren also sehr starke Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz des Kallikrein-Kinin Systems bei zerebralen Pathologien im Allgemeinen und beim

experimentellen Schlaganfall im Besonderen. Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse ist die Rolle des Kallikrein-Kinin Systems bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach fokaler zerebraler Ischämie bisher nicht weiter erforscht worden. Daher ist noch immer unbekannt, ob und wann Bradykinin im ischämischen Hirngewebe freigesetzt wird, und wie die Expression der Kinin Rezeptoren durch die zerebrale Ischämie beeinflusst wird. Zusätzlich zu diesen offenen Fragen beschreibt eine kürzlich erschienene Publikation einen neuen Kinin Rezeptor Subtyp mit einer dem Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor sehr ähnlichen Aminosäure Sequenz (Boels und Schaller, 2003). Diese neue Erkenntnis stellt die Selektivität der bisher verwendeten Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten in Frage.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den zeitlichen Verlauf der Bradykinin-Produktion und der Expression von Kinin Rezeptor mRNA und Protein im ischämischen Hirngewebe zu untersuchen und die Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für den neuronalen Zelltod und die Bildung des Hirnödems nach transientser fokaler zerebraler Ischämie weiter zu erhellen. Um nicht mit Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten, deren Selektivität nicht gesichert ist, arbeiten zu müssen, führten wir den letzten Teil unserer Studie an Mäusen durch, die nach einer Deletion des Gens des B<sub>2</sub> Rezeptors diesen nicht exprimierten – sogenannten B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen.

## 2 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum 2000 bis 2003 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München unter dem damaligen Direktor Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“ von Prof. Dr. med. Alexander Baethmann unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben AZ 211-2531-93/99 und AZ 211-2531-59/01) durchgeführt.

### 2.1 Versuchstiere

Nach Vorversuchen an 38 Mäusen zur Etablierung des experimentellen Modells und an weiteren 18 Mäusen zur Überprüfung der Therapierbarkeit des Infarktes in diesem Modell wurden die eigentlichen Versuche an insgesamt 137 C57Bl/6 (Charles River Deutschland, Sulzfeld, Deutschland) oder B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen durchgeführt. Es wurden weibliche Tiere mit einem Gewicht von 20-25g verwendet. Nach Lieferung konnten sich die C57Bl/6 Mäuse mindestens 24 Stunden im Tierstall erholen, bevor die Experimente durchgeführt wurden. Die B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) waren ursprünglich 1995 von Borkowski et al., Merck Research Laboratories, USA, (Borkowski et al., 1995; Borkowski und Hess, 1995) geschaffen worden. Um die genetische Variabilität zu vermindern, waren sie 8 Generationen auf den Mäusestamm C57Bl/6 zurück gekreuzt worden. Die für unsere Untersuchungen verwendeten Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gezüchtet. Alle Tiere wurden in Macrolonkäfigen Typ 2 bei einer konstanten Raumtemperatur von 20±1°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem zwölf Stunden Tag/Nachtzyklus gehalten. Futter (ssniff® R/M-H, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den betreffenden Richtlinien und Bestimmungen der Regierung von Oberbayern durchgeführt.



## **2.2 Experimentelles Modell**

### **2.2.1 Anästhesie**

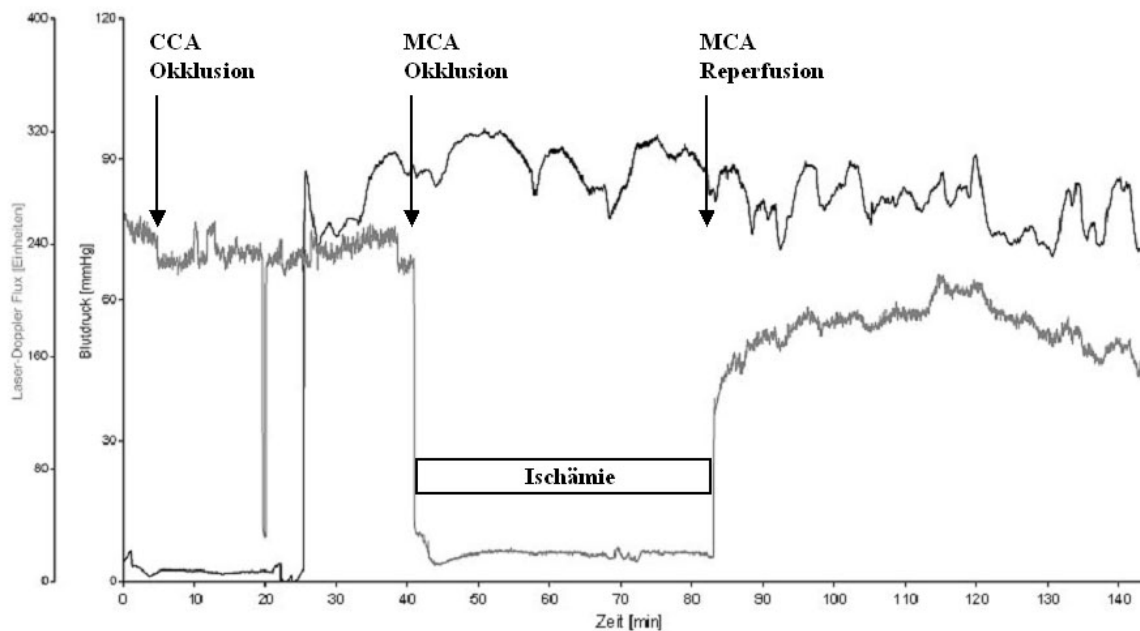
Die Narkose wurde mit Halothan (Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland; Eurim-Pharma, Piding, Deutschland) durchgeführt, das in einem Halothan-Verdampfer (Halothane Vapor 19.3, Drägerwerke AG, Lübeck, Deutschland) vaporisiert wurde. Das Gasgemisch bestand aus 66-69% Lachgas (N<sub>2</sub>O) mit 30% Volumenanteil Sauerstoff und 1-4% Halothan. Der inspiratorische Sauerstoffgehalt wurde oximetrisch (Oxidig, Drägerwerke AG, Lübeck, Deutschland) kontrolliert. Zur Einleitung erhielten die Mäuse unter einem Plastikbecher für 2 Minuten 4% Volumenanteil Halothan. Danach wurde den spontan atmenden Tieren zur weiteren Applikation des Narkosegases eine Maske über die Schnauze gestülpt. Die Maske war aus einem abgeschnittenen und gepolsterten Spritzenkopf (10ml Spritze, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gefertigt. Das Narkosegas (2 l/min) wurde durch einen in diesen Spritzenkopf eingelassenen Gummischlauch eingeleitet und durch einen zweiten Gummischlauch abgesaugt. Über dieses System atmeten die Tieren für weitere 2 Minuten 2% Volumenanteil Halothan. Für die restliche Zeit wurde die Narkose mit 1,2-1,3% Volumenanteil Halothan aufrechterhalten. Dieses Narkoseprotokoll war in Vorversuchen an 8 Tieren, denen ein Katheter in die A. femoralis gelegt worden war, mit Hilfe arterieller Blutdruckmessung und Blutgasanalyse etabliert worden. Da die Mäuse nur während des chirurgischen Eingriffes, nicht aber in der Ischämiephase in Narkose gehalten wurden, mussten sie für die Reperfusion erneut narkotisiert werden. Hierfür wurden sie wie beschrieben eingeleitet und erhielten dann für die nur fünf Minuten dauernde Operation konstant 1,5% Volumenanteil Halothan.

### **2.2.2 Aufrechterhaltung der Körpertemperatur**

Auskühlung wurde durch eine dem Tier untergelegte Heizplatte (Heater Control Module, FHC, Bowdoinham, ME, USA) verhindert, deren Temperatur automatisch über eine rektale Temperatursonde geregelt wurde. Die Körpertemperatur wurde während der operativen Versuchsanteile bei 37±0,1°C aufrechterhalten. Während der Zeit der Okklusion der A. cerebri media sowie nach Reperfusion wurden die Tiere in einem auf 32°C geheizten

Inkubator (Intensivpflege-Inkubator 7510, Drägerwerke AG, Lübeck, Deutschland) aufbewahrt.

### 2.2.3 Messung der lokalen Hirndurchblutung mit Laser-Doppler Fluxmetrie



**Abbildung 1:** Beispiel einer Aufzeichnung von regionaler Hirndurchblutung (rCBF) im Versorgungsgebiet der A. cerebri media mittels Laser-Doppler Fluxmetrie und arteriellem Mitteldruck über einen Katheter in der A. carotis communis. Deutlich zu sehen ist der stark abgefallene rCBF in der Ischämiephase in der Zeit zwischen 40 und 85 Minuten nach Aufzeichnungsbeginn.

Alle präparatorischen Arbeiten wurden unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (OpMi-1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Bei dem auf den Bauch gelagerten Tier wurde ein V-förmiger Hautschnitt zwischen dem linken Auge und dem linken Ohr gelegt und die Haut wurde nach oben geklappt. Der linke M. temporalis wurde scharf mit einem Skalpell vom Os temporale getrennt und nach lateral mobilisiert. In der hierdurch entstandenen Tasche zwischen Os temporale und M. temporalis wurde eine flexible Laser-Doppler Sonde 2mm caudal und 6mm lateral des Bregmas positioniert (Connolly, Jr. et al., 1996), was einem Punkt zentral über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media entspricht. Die Sonde wurde mit einem Tropfen Cyanoacrylat Klebstoff (INSTA-CURE Glue, Plastruct, City of Industry, CA, USA) an der Kalotte festgeklebt, der mit Härter (INSTA-SET Accelerator, Plastruct, City of Industry, CA, USA) zum schnellen aushärten gebracht wurde. Noch während des Härtevorgangs wurde der Hautlappen über Klebstoff und Sondenspitze

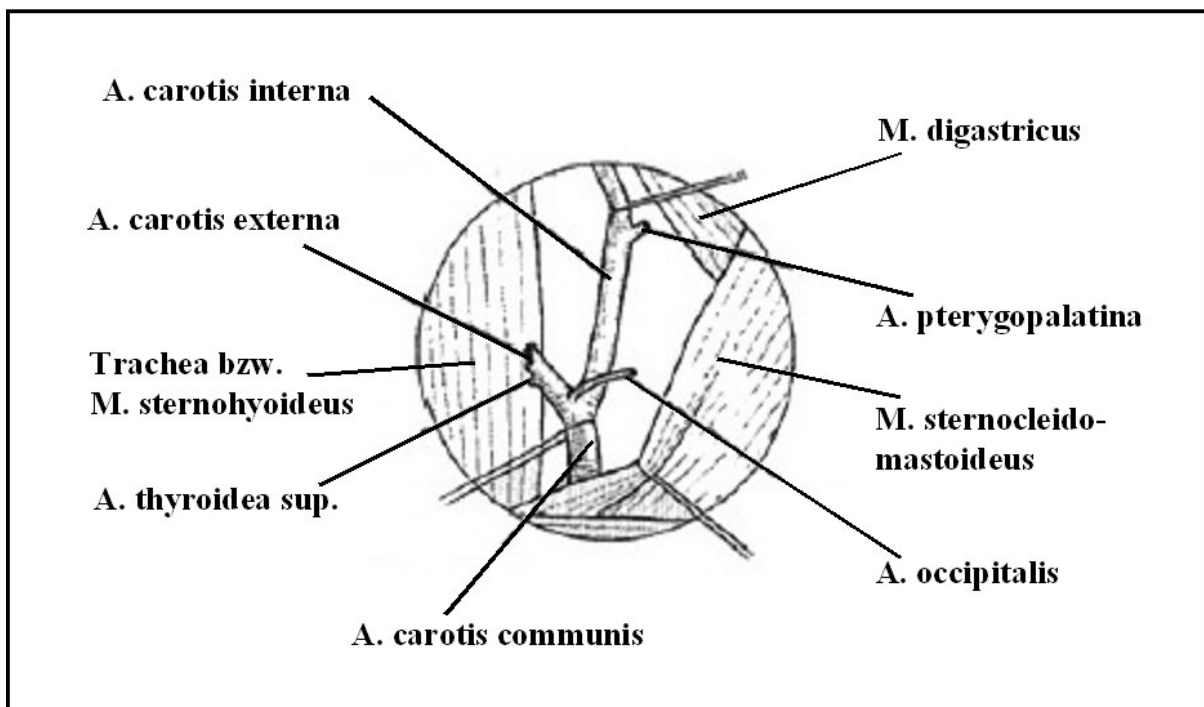
gelegt und mit eingeklebt, um die Sondenspitze noch stabiler zu fixieren. Das Tier wurde dann auf den Rücken umgelagert, die Sondenspitze an die Sonde angeschlossen und die lokale Hirndurchblutung mit Laser-Doppler Fluxmetrie (Peri Flux 4001 Master, Perimed AB, Järfälla, Schweden) gemessen.

## **2.2.4 Transiente fokale zerebrale Ischämie durch temporäre Okklusion der A. cerebri media**

Als Modell der transitorischen fokalen zerebralen Ischämie verwendeten wir die intraluminale Fadenokklusion der A. cerebri media, die von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen, leichten Modifikationen beschrieben worden ist (Connolly, Jr. et al., 1996; Ding-Zhou et al., 2002; Hara et al., 1996; Hata et al., 1998). Nach Anbringen der Laser-Doppler Sonde wurde bei dem auf dem Rücken gelagerten Tier die Haut zwischen Mandibula und Manubrium sterni mit einem medianen Schnitt eröffnet. Die Glandulae submandibulares und das Unterhautfettgewebe wurden mobilisiert und nach lateral gedrängt und das Operationsgebiet mit Hilfe eines Hakens offen gehalten. Nach Spaltung der oberflächlichen Halsfaszie wurde die linke A. carotis communis in dem Winkel, den die Mm. sternohyoideus und sternocleidomastoideus bilden, in ihrem Verlauf entlang der Trachea dargestellt. Hierbei wurde besonderer Wert darauf gelegt, umliegende Strukturen wie z.B. die Nn. vagus und phrenicus und den M. omohyoideus zu schonen. Die Bifurcatio carotis und die angrenzenden proximalen Anteile der Aa. carotis interna und carotis externa wurden vorsichtig präpariert. Anschließend wurden die A. carotis communis möglichst weit proximal und die A. carotis externa direkt an ihrem Ursprung in der Bifurkation mit 5/0 Fäden (Silk braided, Pearstalls Ltd., Taunton Somerset, UK) ligiert. Die Enden dieser Ligationsfäden wurden nach 5 bzw. 11 Uhr leicht gespannt, um die A. carotis communis in einer guten Position zu fixieren. Mit einem weiteren 5/0 Faden, der der Fixierung des intraluminale Okklusionsfadens dienen sollte, wurde die A. carotis communis anschließend zwischen proximaler Ligatur und Bifurkation angeschlungen und die A. carotis interna wurde kurz vor Abgang der A. pterygopalatina mit einem Mikroclip (Zen Temporary Clip No.10-b 13x0,4mm, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan) verschlossen.

Nach Inzision der A. carotis communis mittig zwischen proximaler Ligatur und Bifurkation wurde der 1,2cm lange 8/0 Okklusionsfaden (Ethilon, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland), der zuvor – um die Gefahr einer Verletzung des Endothels oder gar

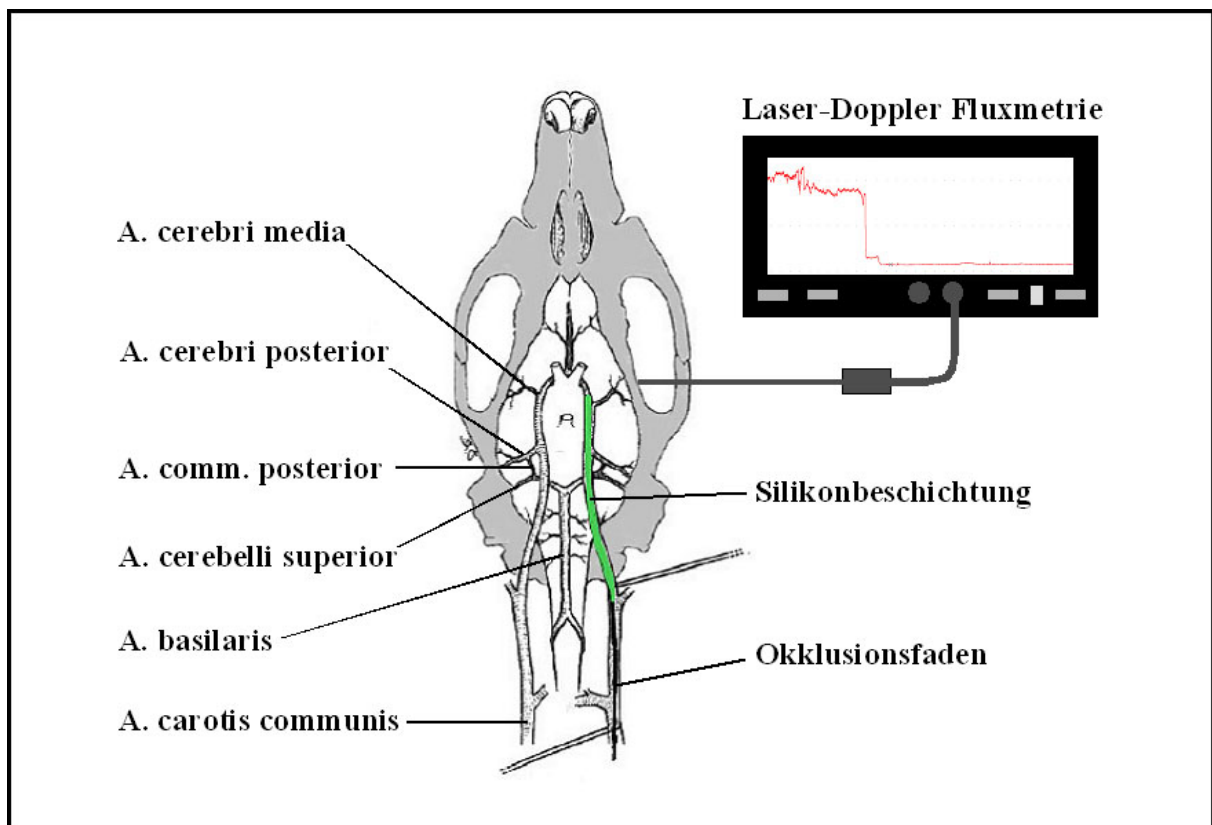
einer Gefäßperforation zu vermindern – mit Silicon (Xantopren® M und Activator universal, Heraeus Kulzer, Dormagen, Deutschland) ummantelt worden war, in das Lumen eingeführt, bis zum Mikroclip in die A. carotis interna vorgeschoben und mit dem hierfür vorgesehenen 5/0 Faden fixiert. Der Mikroclip wurde entfernt, die Fixation gelockert und der Okklusionsfaden weiter vorgeschoben, bis ein rapider Abfall des Laser-Doppler Fluxes die Verlegung des Abganges der A. cerebri media anzeigte (Abbildung 1). Beim Vorschieben des Fadens war darauf zu achten, dass er nicht den Weg in die A. pterygopalatina nahm, was dadurch verhindert wurde, dass deren Abgang während des Vorschiebens durch leichte Kompression mit einer Pinzette verschlossen wurde. Nachdem die mit dem Laser-Doppler gemessene regionale Hirndurchblutung über eine Minute auf dem deutlich verminderten Niveau verblieben war, galt die Okklusion der A. cerebri media als gesichert. Daraufhin wurde der Okklusionsfaden erneut fixiert, die Haut mit einem 5/0 Faden (Ethibond® Excel, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Einzelknopfnahnt provisorisch verschlossen und die Spitze der Laser-Doppler Sonde nahe am Schädel abgeschnitten.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Operationsgebietes mit seinen wichtigsten anatomischen Strukturen aus Connolly et al. (1996)

Um die Narkosezeit und damit den Einfluss der Narkose möglichst gering zu halten, ließen wir die Tiere aufwachen und gaben sie für die Zeit der Ischämie in einen auf 32°C geheizten Inkubator (Intensivpflege-Inkubator 7510, Drägerwerke AG, Lübeck, Deutschland), was eine Auskühlung verhindern sollte. Die Tiere wurden rechtzeitig erneut narkotisiert, die

Hautnaht wurde geöffnet, die Fixation des Okklusionsfadens gelockert und dieser 45 Minuten nach Beginn der Ischämie zurückgezogen. Mit dem Faden, der bisher der Fixierung des Okklusionsfadens gedient hatte, wurde die A. carotis communis distal des Inzision ligiert und die Haut erneut mit einem 5/0 Faden in Einzelknopfnahnt zugenäht. Die Tiere erwachten aus der Narkose und wurden für eine Stunde erneut in den Inkubator gegeben, bevor sie wieder zurück in den Tierstall gebracht wurden, wo sie für die restliche Zeit des Experiments verblieben. Sham operierte Tiere wurden der gleichen Operation unterzogen, jedoch ohne Einbringen des Okklusionsfadens.



**Abbildung 3:** Schemazeichnung von Connolly et al. (1996) – leicht modifiziert - des Circulus arteriosus Willisii mit Verlegung des Abganges der A. cerebri media durch den Okklusionsfaden unter Kontrolle der lokalen Hirndurchblutung mittels Laser-Doppler Fluxmetrie

## 2.2.5 Protokolle der unterschiedlichen Versuchsgruppen

Die gesamte Arbeit lässt sich in die folgenden vier Abschnitte unterteilen:

1. Aufbau des Modells in Vorversuchen: Etablieren eines Narkoseprotokolls an acht Tieren durch Analyse der Blutgase im Abstand von ca. 15 Minuten; Einüben der

Operationstechnik an insgesamt 30 Tieren mit dem Ziel eines komplikationslosen Operationsverlaufs, einer möglichst kurzen Operationsdauer und dem Erzeugen möglichst gleich großer Infarkte; Überprüfung der Therapierbarkeit des Infarktes an 18 Tieren

2. Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Bradykininproduktion und der Expression der Kinin Rezeptoren nach transientser fokaler zerebraler Ischämie (Tabelle 1, Gruppen 1, 2, 3)
3. Validierung von C57/Bl6 Mäusen als geeignete Kontrollen für die geplanten Untersuchungen mit B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen (Tabelle 1, Gruppen 4, 5, 6)
4. Untersuchung der Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach experimentellem Schlaganfall (Tabelle 1, Gruppen 7, 8, 9)

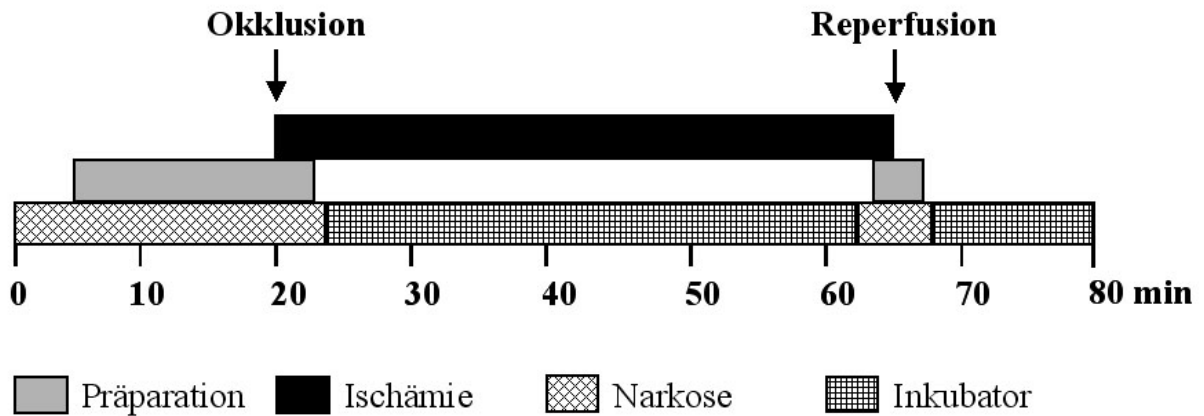
Nach Abschluss der Vorversuche wurden für die einzelnen Versuchsgruppen dieser Studie Protokolle für den Ablauf des Versuchs festgelegt. Hier soll ein kurzer Überblick gegeben werden. Genaueres ist unter den entsprechenden Punkten in „Material & Methoden“ zu erfahren.

Gruppe	Anzahl	Stamm	Untersuchung
1	25	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Bestimmung der Bradykininkonzentration
2	14	C57/Bl6	Quantifizierung der mRNA der Kinin Rezeptoren
3	20	C57/Bl6	Immunhistochemie der Kinin Rezeptoren
4	6	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Western Blot Analyse der Kinin Rezeptoren
5	10	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Charakterisierung der Gefäßanatomie
6	12	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Bestimmung physiologischer Parameter
7	16	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Bestimmung des Hirnwassergehalts
8	14	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Quantifizierung des Infarktolumens, Test der motorischen Funktion
9	20	C57/Bl6, B <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	Langzeitbeobachtung

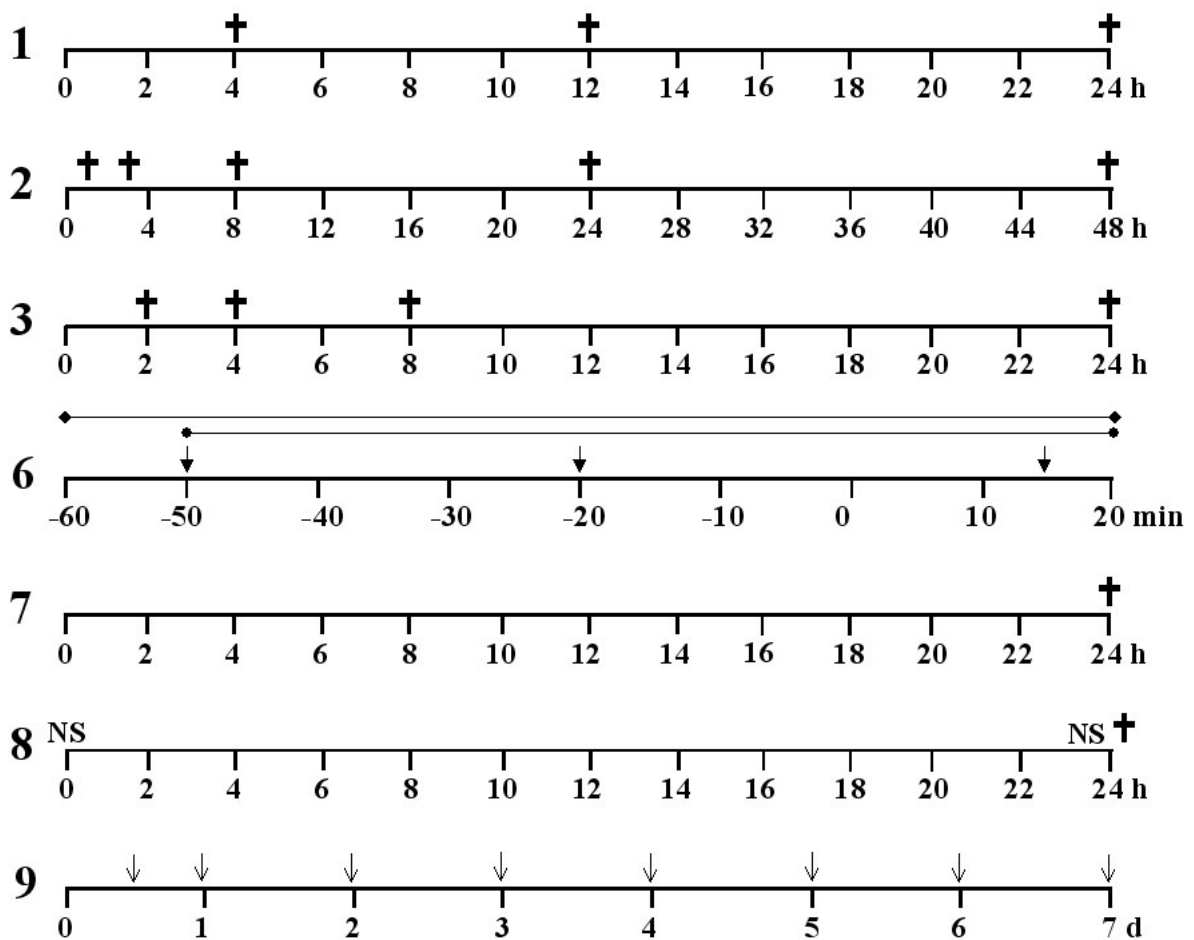
**Tabelle 1:** Überblick über die einzelnen Versuchsgruppen mit Anzahl und Stamm der jeweils verwendeten Versuchstiere und Ziel der Untersuchung

Das Versuchsprotokoll kann in eine akute und eine chronische Phase unterteilt werden. In der akuten Phase, die die zwei Narkosen und die dazwischen liegende Zeit im Inkubator umfasst, wurden nur in den Gruppen 6 und 8 Untersuchungen durchgeführt. In der chronischen Phase nach Ischämie, die sich je nach Versuchsgruppe auf bis zu 7 Tage

erstreckte, erfolgten in den Gruppen 1, 2, 3, 7, 8 und 9 Untersuchungen bzw. Probeentnahmen für Analysen. Für die Gruppen 4 und 5 ließ sich kein solches Versuchsprotokoll erstellen, da mit ihnen durchgeführten Studien keine zerebrale Ischämie beinhalteten.



**Abbildung 4:** Darstellung des zeitlichen Ablaufs des operativen Teils der Experimente beginnend mit der Narkotisierung der Versuchstiere



**Abbildung 5:** Versuchsprotokolle der Gruppen 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 9. Die Zeitleisten beziehen sich auf den Zeitpunkt der Reperfusion (Zeitpunkt 0). Dargestellt sind Gehirnentnahme (†), Blutgasanalyse (‡), Blutdruckmessung (●), Messung der regionalen Hirndurchblutung (◆), Erhebung des Neurostatus (NS) und Messung von Körpertemperatur und -gewicht (↓).

## 2.3 Bestimmung der Bradykinin Konzentration in Blut und Gehirn

4,5ml Röhrchen (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurden gewogen, mit 2ml 100% -igem Alkohol gefüllt, beschriftet, erneut gewogen und mit Trockeneis auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Native  $\text{B}_2^{-/-}$  Mäuse und C57/Bl6 Mäuse in nativem Zustand oder nach 4, 12 oder 24 Stunden Reperfusion nach transienter MCAO (n=5 pro Gruppe) wurden in tiefer Halothannarkose auf einer Styroporplatte fixiert. Nach einem medianen Hautschnitt wurde die Haut nach lateral mobilisiert. Mit einer Injektionskanüle der Stärke 27G (Sterican, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde durch einen Zwischenrippenraum das Herz punktiert und mit einer heparinisierten (Heparin-Natrium, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 1ml Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) so viel Blut als möglich aspiriert. Das Blut wurde in eines der vorbereiteten Röhrchen gegeben und auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Um intravasales Bradykinin zu entfernen, wurde das Tier thorakotomiert, mit einem Butterfly (Butterfly<sup>®</sup>-25 Short, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) der linke Ventrikel punktiert, das Butterfly mit einer Klemme fixiert, die rechte Auricula inzidiert und das Tier mit 20ml PBS (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) perfundiert. Der Schädel wurde geöffnet, indem zunächst der Knochen zwischen den beiden Orbitae mit einer Schere durch-, die Kalotte vom Ansatz der Nackenmuskulatur bis zum interorbitalen Schnitt aufgeschnitten und die beiden Hälften der Kalotte nach lateral weggeklappt wurden. Mit einem Spatel wurde das Rückenmark durchtrennt, das Gehirn entnommen und in eine mit Eis gekühlte Schnittform (Matrix) gegeben. Bei dem in der Matrix liegenden Hirn wurde mit dem Spatel das Mittelhirn abgetrennt, mit einer gekühlten Rasierklinge (Apollo, Solingen, Deutschland) der Okzipitalpol sowie der Frontalpol mit Riechhirn abgeschnitten und die Hemisphären in der Medianebene getrennt. Beide Hemisphären wurden in vorbereitete Röhrchen gegeben und auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Alle Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Gefrierschrank gelagert.

Die Messung der Bradykininkonzentration erfolgte nach einer etablierten Methode (Nussberger et al., 1998) im Labor von Prof. Dr. J. Nussberger, Lausanne, Schweiz. Nach Zugabe verschiedener Protease und Peptidase Inhibitoren wurden die in Ethanol eingelegten Proben auf  $1-2^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Die aus Hirngewebe bestehenden Proben wurden homogenisiert und zusammen mit den Blutproben bei  $2^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurden die Ethanolextrakte – die Arbeitsgruppe um Nussberger hatte bereits 1994 das Extraktionsverfahren mit Ethanol als



vorteilhaft beschrieben (Pellacani et al., 1994) – unter Stickstoff bei 37°C verdampft und die Rückstände mit 140µl Essigsäure (0,01mol/l) gelöst. 100µl dieser Lösung wurden einer isokratischen HPLC (Hewlett Packard 1090A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) zugeführt, um Bradykinin von seinen Vorläufern und Metaboliten zu trennen, die mit dem Antiserum kreuzreagieren könnten. Die stationäre Phase war Permacoat Dodecylsilyl-Silizium von 5µm Partikelgröße in einer 125mm langen Stahlsäule mit 4mm Innendurchmesser. Die mobile Phase bestand aus Methanol und 0,1%iger Phosphorsäure in einem Verhältnis von 28/72 bei einer Flussrate von 0,5ml/min und 45°C. Zur für Bradykinin ermittelten Rückhaltezeit von 4,3-5,7 Minuten wurden sieben Fraktionen von jeweils sechs Tropfen (100µl) der mobilen Phase in Gelatine-gecoateten Polypropylen Röhren, die 10µl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> enthielten, gesammelt und unter Stickstoff bei 37°C verdampft. Für den Radioimmunoassay (RIA) wurde den Proben Kaninchen-Antiserum 1881 in einer Verdünnung von 1:35000 und I<sup>125</sup>-markiertes Bradykinin (markiert am Tyrosin 8; 2000cpm bzw. 1fmol, New England Nuclear, Herts, UK) in insgesamt 0,525ml Phosphatpuffer mit pH 7,5 (0,05mol/l), der 1g/l Gelatine und 0,2g/l N<sub>3</sub>Na enthielt, hinzugegeben. Für die Standardkurve des RIA wurden steigende Bradykininmengen (0,06-125fmol, Peninsula Labs, St. Helens, UK) mit Antiserum und radiojodiertem Bradykinin inkubiert. Alle Proben wurden für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. An Antikörper gebundene und freie Peptide wurden durch Zugabe von 0,2ml Dextran-gecoateter Kohle (1%ige Suspension in Wasser), Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes getrennt. Die Bradykininmenge der HPLC Fraktionen wurde durch Vergleichen der gebundenen Radioaktivität mit der Standardkurve, und die Bradykininkonzentration in den Gewebeproben durch Rückrechnen auf deren Masse ermittelt.

## **2.4 Quantifizierung der mRNA der Kinin Rezeptoren mit Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die mRNA der Bradykinin Rezeptoren wurde in den Gehirnen nativer und sham-operierter (3h bzw. 24h nach der Operation) Mäuse gemessen sowie solchen, die einer fokalen zerebralen Ischämie unterzogen worden waren (1, 3, 8, 24, 48h nach Reperfusion; n=2 pro Gruppe). Hierfür wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Gehirne wie bereits beschrieben entnommen. Auf einer mit Aluminiumfolie abgedeckten Platte Trockeneis wurden die Gehirne unter RNase freien Bedingungen mit kalten Rasierklingen umgehend in

ca. 3mm dicke koronare Scheiben geschnitten. Aus der Scheibe, die den größten Teil des Versorgungsgebietes der A. cerebri media umfasste, wurden Proben, die ungefähr Würfeln mit der Kantenlänge 3mm entsprachen, aus dem Striatum und dem lateroparietalen Cortex der ipsilateralen Hemisphäre sowie aus dem Cortex der kontralateralen Hemisphäre herausgeschnitten. Diese Proben repräsentierten den Core und die Penumbra des Infarktes sowie gesundes Gewebe.

Die GesamtRNA der Proben wurde mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) wurde die isolierte RNA (2µg) für 60 Minuten bei 37°C in 30µl Reverse Transcriptase Puffer (Gibco BRL, Paisley, UK) gelöst, dem je 0,5mmol/l dATP, dGTP, dCTP und dTTP (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), 32 Einheiten RNase Inhibitor (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland), 400 Einheiten MMLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Gibco BRL, Paisley, UK), 10mmol/l Dithiothreitol und 1,5µmol/l p(dT)<sub>15</sub> Primer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) zugegeben worden waren. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 10 Minuten bei 95°C Hitze inaktiviert.

Nachfolgend wurden die Proben auf Trockeneis zu Frau Dr. D. Lebesgue, Daix, Frankreich, verschickt, wo die semiquantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt wurde. Die komplementäre DNA (20ng) und Gen-spezifische Primer (300nmol/l) wurden einem QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green PCR master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland) hinzugefügt, der SYBR<sup>®</sup> Green I Farbstoff, ROX (passiver Referenzfarbstoff), HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland), einen dUTP enthaltenden dNTP Mix und optionale Pufferkomponenten beinhaltet.

Die Primer für die PCR wurden mit der Beacon Designer Software (Biorad, Hercules, CA, USA) designed und basierten auf folgenden Genbank Nummern:

Maus  $\beta$ -Actin (X03672): CCACTGCCGCATCCTCTTCC und  
CGCTCGTTGCCAATAGTGATGAC.

Maus Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor (NM\_007539): GGGTTCGTCATCACTGTCTGTT und  
GCCAGGTAGATTTCTGCTATGGT.

Maus Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor (NM\_009747): CACTGTGGCCGAGATCTACCT und  
GGCACAACACCTCTCCAAACA.

Es wurden 25µl PCR Reaktionsmischung im iCycler iQ (Biorad, Hercules, CA, USA) amplifiziert (1 Zyklus bei 95°C für 15min und 40 Zyklen bei 94°C für 15sec, 60°C für 30sec, 72°C für 30sec und 95°C für 1min). Um das Vorhandensein und die vorhergesagte Größe der spezifisch amplifizierten Produkte zu verifizieren, wurden die Produkte der Real-Time PCR durch Elektrophorese aufgetrennt und auf einem 4% bis-tris E-Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), das Ethidiumbromid enthielt, sichtbar gemacht. Für jedes Sample-Primer Set wurde eine Lösungskurve mit einer Temperaturerhöhung von 55°C auf 95°C durchgeführt. Es wurde weder eine Bildung von Primerdimeren noch von unspezifischen Amplifikationsprodukten beobachtet.

Die spezifisch amplifizierten Transkripte (Target) wurden über die „comparative threshold cycle“-Methode mit  $\beta$ -Actin als Normalizer und der korrespondierenden Probe aus der kontralateralen Hemisphäre (Baseline) als interne Kontrolle quantifiziert. Die Expression wird semiquantitativ als Vervielfachung des Grundniveaus dargestellt:  $\text{relative Expressionslevel} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  [CT = threshold cycle,  $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{(\text{Target})} - \text{CT}_{(\text{Normalizer})}$ ,  $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} - \Delta\text{CT}_{(\text{Baseline})}$ ].

Die Standardkurven, in denen die anfängliche Menge an cDNA gegen die entsprechenden CT-Werte aufgetragen wurden, wurden für jedes Set Primer neu erstellt. Sie zeigten, dass für den verwendeten Bereich an cDNA Amplifikationen die Effizienz der Zielgene wie des Normalizers  $\beta$ -Actin ähnlich waren.

## 2.5 Immunhistochemie der Kinin Rezeptoren

C57/Bl6 Mäuse (n=4 pro Gruppe) wurden einer 45minütigen MCAO unterzogen oder sham operiert und 2, 4, 8 oder 24h nach Reperfusion in tiefer Halothannarkose mit Kanülen auf einer Styroporplatte fixiert und thorakotomiert. Mit einer stumpfen Injektionskanüle der Stärke 24 G (Microlance<sup>®</sup>, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde der linke Ventrikel punktiert, die Kanüle mit einer Klemme fixiert, die rechte Auricula mit einem Scherenschlag eröffnet und das Tier zunächst für ca. 1 Minute mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), dann für ca. 10 Minuten mit 4% -iger Phosphat-gepufferter (pH 7,4) Paraformaldehydlösung unter dem Druck von 100cm Wassersäule perfundiert. Das Gehirn wurde wie zuvor beschrieben aus dem Kranium

entnommen, in ein mit 4% -iger gepufferter Paraformaldehydlösung gefülltes Gefäß gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Später wurde das Gehirn in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 90% - 96% Ethanol) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Mikrotom 2030, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) 5µm dicke koronare Serienschnitte angefertigt und auf Objektträger, die mit Amino-propyl-tri-ethoxy-silane (Merck, Darmstadt, Deutschland) überzogen waren, aufgebracht.

Unspezifische Bindungen wurden durch 20minütiges Auftragen von Pferdeserum (Vectastain Elite ABC kit PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) geblockt und die endogene unspezifische Peroxidase-Aktivität durch Einlegen für 10 Minuten in 3% -iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol eliminiert.

Für die Immunhistochemie des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen das N-terminale Fragment des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors der Ratte hervorgebracht worden war (Biogen, Cambridge, ME, USA), als Primärantikörper verwendet. Er wurde in PBS, das 2% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 0,3% Triton X-100 enthielt, gelöst (6µg/ml) und über Nacht bei 4°C auf die Schnitte aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 100µl eines Pferd-gegen-Maus/Kaninchen biotinyliertem Sekundärantikörpers (BA-1400, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und 100µl einer universellen Blockerlösung (Vectastain Elite ABC kit PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers inkubiert. Sichtbar gemacht wurde der Antikörper mit Amino-9-ethylcarbazole (AEC-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Die Immunhistochemie des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors wurde identisch durchgeführt mit der einzigen Ausnahme, dass als Primärantikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper verwendet wurde, der gegen das C-terminale Fragment Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors des Menschen hervorgebracht worden war (1:250, BD Bioscience/Transduction Laboratories, San Lose, CA, USA).

Für die Quantifizierung wurden pro Tier je zwei Schnitte ausgesucht, die durch den Infarkt reichten (Bregma +0,5mm und -2,5mm). Auf diesen Schnitten wurden vier Bereiche (regions of interest, ROI; 0,3mm x 0,2mm) für die Analyse ausgewählt: zwei im mittleren Bereich (Core: 3,2mm lateral und 2,5mm bzw. 3,5 mm tief) und je einer am oberen und unteren Rand des infarzierten Kortex (Penumbra: 2,5mm lateral und 1,5mm tief bzw. 3,1mm lateral und 4,5mm tief). In diesen ROIs wurden alle Strukturen, die als Zellen identifiziert

wurden – unabhängig ob sie morphologisch normal, geschädigt oder tot erschienen – gezählt und hinsichtlich ihres Färbemusters für die Kinin Rezeptoren in zwei Kategorien, nämlich in normale und verstärkte Färbeintensität, eingeteilt. Die Abbildungen 15b und 18b zeigen Zellen, die ein normales Färbemuster für den Kinin B<sub>1</sub> bzw. B<sub>2</sub> Rezeptor aufweisen, auf den Abbildungen 15d und 18d ist eine verstärkte Färbeintensität und ein verändertes Muster (B<sub>1</sub> Rezeptor: Immunoreaktivität des Nukleus; B<sub>2</sub> Rezeptor: Immunoreaktivität der Zellmembran) zu sehen. Da die Zelldichte in den untersuchten Arealen nach zerebraler Ischämie abnahm, wurden die Ergebnisse als Anteil an der Gesamtzahl an Zellen innerhalb der ROIs ausgedrückt. Als Kontrolle wurden Zellen in den gleichen Gebieten sham operierter Tiere gezählt. So wurden insgesamt je acht ROIs in fünf Mäusen pro Gruppe untersucht.

## 2.6 Western Blot Analyse der Kinin Rezeptoren

Insgesamt wurden sechs Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Gehirne wie beschrieben entnommen und in eine gekühlte Matrix gelegt. In der Matrix wurden Kleinhirn sowie Riechhirn abgetrennt und die Hemisphären durch einen medianen Schnitt geteilt.

Nach dem Wiegen wurden die Proben in der 10-fachen Menge eiskalten Lysepuffers (Hepes pH 7,6; 1% SDS; 1mmol/l DTT) aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

Der Proteingehalt der Proben wurde nach Bradford bestimmt. Hierzu wurden jeweils 3µl der 1:10 mit PBS (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) verdünnten Proben oder der aus BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) bestehenden Standardreihe zusammen mit 300µl Farblösung, bestehend aus 1:5 mit Aqua bidest verdünntem Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Coomassie brilliant blue G-250 dye, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), in eine 96-well-Platte (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden bei 595nm in einem Plattenleser (MRX TC II, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) die Extinktion gemessen und der Proteingehalt anhand der Standardkurve errechnet.

Aus jeder Probe wurden durch Verdünnung mit Aqua bidest Samples mit einer Proteinkonzentration von 0,75 bzw. 1,00µg/µl hergestellt. Die Samples wurden 1:2 mit Ladepuffer (2,5ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8; 1,0ml SDS 20%; 2,0ml Glycerol; 3,5ml Aqua bidest; 1,0ml β-Mercaptoethanol; 0,02g Bromophenol Blue) gemischt und für fünf Minuten

gekocht. Das 10% NuPage Bis-Tris-Gel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde in jeder Kammer mit jeweils 20µl dieser Lösungen, also jeweils 7,5µg bzw. 10µg Protein, beladen. Vom Molekulargewichtsmarker SeeBlue Plus 2 (Prestained Protein-Standard, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden in zwei Kammern jeweils 10µl ohne Ladepuffer gegeben. Der MOPS SDS Laufpuffer bestand aus Aqua bidest mit MOPS (1,00mol/l), Tris-Base (1,00mol/l), SDS (69,3mmol/l) und EDTA (20,5mmol/l). Das Gel lief bei 135V für 97 Minuten (Hofer Mini VE, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

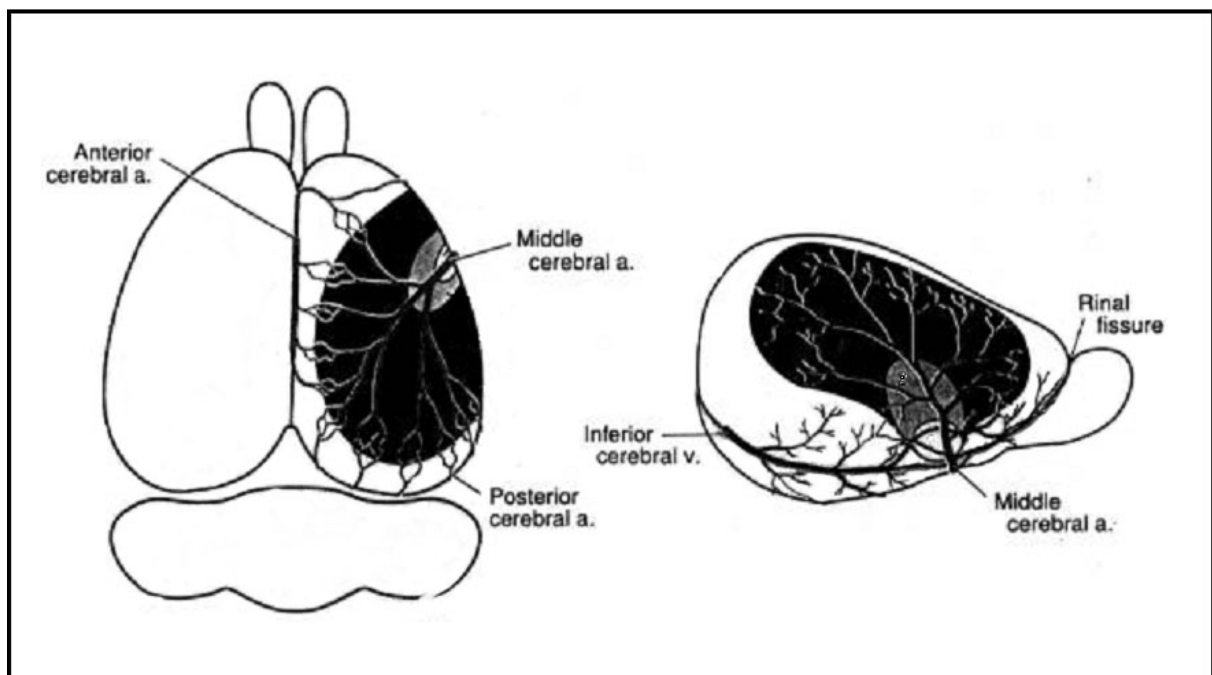
Für den Western Blot wurden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine in einem Blot Modul (Hofer Mini VE, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in 17 Stunden bei 35mA vom Gel auf eine Hybond PVDF-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen. Der Transferpuffer bestand aus Aqua bidest mit Bicine (500mmol/l), Bis-Tris (500mmol/l), EDTA (20,5mmol/l) und Chlorobutanol (1mmol/l).

Die Blots wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper (1,5µg/ml) inkubiert, der gegen das N-terminale Fragment des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors der Maus gerichtet ist, oder mit dem gleichen B<sub>2</sub> Antikörper als Primäantikörper, der auch für die Immunhistochemie (siehe oben) verwandt wurde. Dann wurden die Membranen einem HRP-konjugiertem Ratte-gegen-Kaninchen-Sekundäantikörper (1:5000, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) ausgesetzt. Die Antikörperbindung wurde mit dem Opti-4CN Substrat (Opti-4CN Substrate Kit, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) sichtbar gemacht. Um zu kontrollieren, dass die Membran mit ähnlichen Proteinmengen beladen worden war, wurde diese gewaschen und neu mit einem gegen α-Tubulin gerichteten Antikörper (B-7, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert.

## **2.7 Charakterisierung der Gefäßanatomie von C57/Bl6 und B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen**

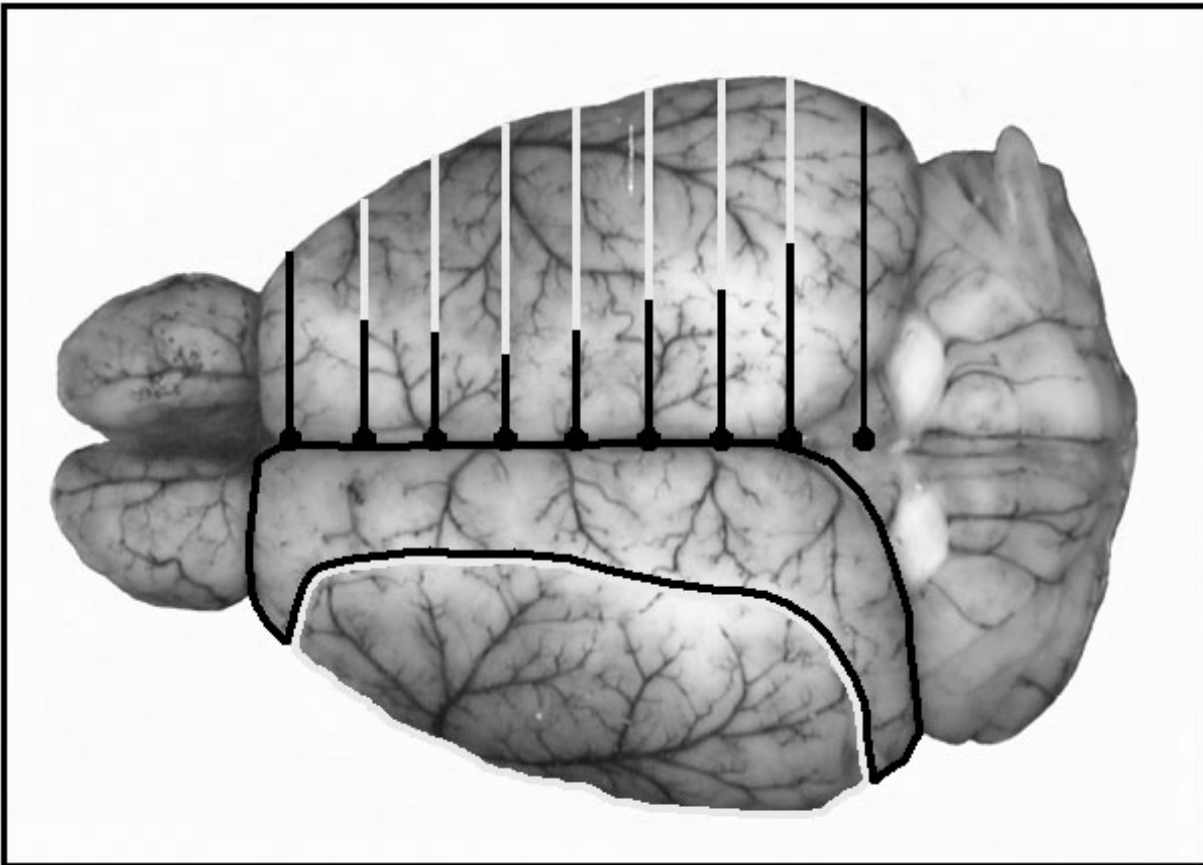
C57/Bl6 und B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden in tiefer Halothannarkose mit Kanülen auf einer Styroporplatte fixiert und thorakotomiert. Mit einem Butterfly (Butterfly®-25 Short, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurde der linke Ventrikel punktiert, das

Butterfly mit einer Klemme fixiert, die rechte Auricula inzidiert und das Tier mit 20ml 4%iger gepufferten Paraformaldehydlösung perfundiert. Nachdem das Blut aus dem Gefäßsystem gewaschen und das Gehirn gleichzeitig fixiert worden war, wurde über eine mit 200µl Tusche (Pelikan, Hannover, Deutschland) befüllte 1ml Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) Farbstoff zur besseren Sichtbarmachung der Gefäße zügig transcordial in das Gefäßsystem infundiert. Das Gehirn wurde wie bereits beschrieben entnommen und in eine Petrischale gelegt, die mit 4%iger gepufferten Paraformaldehydlösung gefüllt war. Mit einer computergestützten CCD-Kamera wurde es anschließend von oben und unten fotografiert.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Mäusegehirns mit seinen Gefäßen. Das Versorgungsgebiet der *A.cerebri media* ist schwarz hinterlegt. Zu sehen sind die Anastomosen zwischen der *A. cerebri media* und den *Aa. cerebri anterior* und *posterior*.

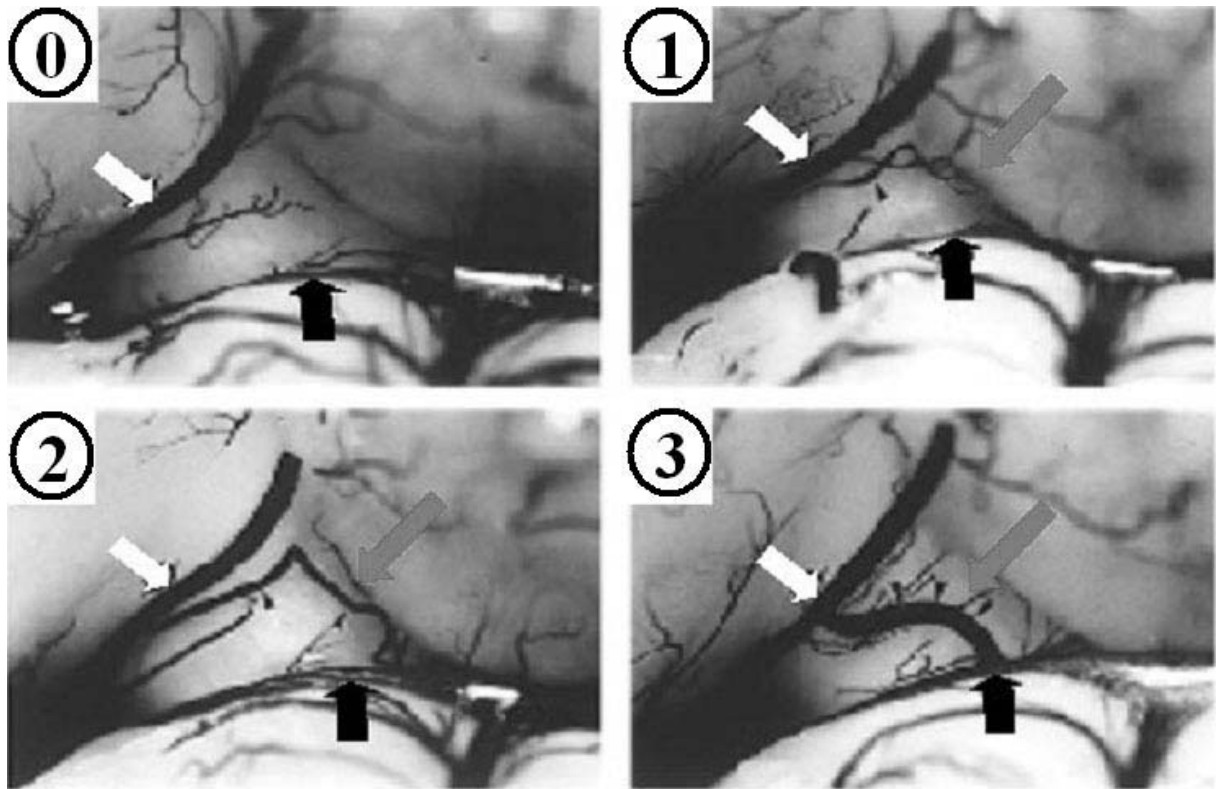
Zur Bestimmung des Anteils der *A. cerebri media* an der Gefäßversorgung des Kortex wurde in einem Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop® 6.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) ein Raster über das Bild der Gehirnoberseite gelegt und am Interhemisphärenspalt ausgerichtet. Im Anschluss wurde in gleichmäßigen Abständen auf senkrecht zum Interhemisphärenspalt stehenden Linien die Gesamtbreite der Hemisphäre sowie die Breite der Areale, die von der *A. cerebri media* oder den *Aa. cerebri anterior* und *posterior* versorgt wurden, ausgemessen (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Photo eines Mäusegehirns von oben zur Veranschaulichung der Bestimmung des Anteils der *A. cerebri media* (grau) sowie der *Aa. cerebri anterior* und *posterior* (schwarz) an der Gefäßversorgung des Kortex.

Zur Bestimmung der Ausbildung der *A. communicans posterior* wurden die Bilder ebenfalls in ein Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop® 6.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) eingelesen und mehrfach vergrößert, bis der Bereich der *Pedunculi cerebri* zwischen Neokortex und Pons, in dem die *A. communicans posterior* verläuft, gut zu beurteilen war. Die Ausbildung der *A. communicans posterior* wurde, wie von Murakami et al. 1998 beschrieben (Murakami et al., 1998), in vier Stadien eingeteilt: 0 = no anastomosis between posterior cerebral artery (PCA) and superior cerebellar artery (SCA), 1 = anastomosis between PCA and SCA in capillary phase, 2 = small truncal PcomA, 3 = truncal PcomA (siehe Abbildung 8).





**Abbildung 8:** Einteilung des Ausbildungsgrades der *A. communicans posterior* (grauer Pfeil) zwischen *A. cerebri posterior* (weißer Pfeil) und *A. cerebelli superior* (schwarzer Pfeil) nach Murakami et al. (1998)

## 2.8 Erhebung physiologischer Parameter

In  $B_2^{-/-}$  und C57Bl6 Mäusen ( $n=6$  pro Gruppe) wurden vor, während und nach Ischämie der Blutdruck gemessen und die Blutgase analysiert. Die Operation wurde weitestgehend wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Der einzige Unterschied zur dortigen Darstellung, die die Operation zur alleinigen Induktion der Ischämie beschreibt, besteht darin, dass beim zusätzlichen Einbringen des Katheters in die linke *A. carotis communis* anstelle der proximalen Ligation der *A. carotis communis* diese mit einem Mikroclip (Zen Temporary Clip No.10-b 13x0,4mm, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan) verschlossen und distal davon mit zwei 5/0 Fäden (Silk braided, Pearstalls Ltd., Taunton Somerset, UK) angeschlossen wurde. Nach Einbringen des Katheters in die *A. carotis communis* wurde dieser bis zu seiner ersten Biegung nach proximal vorgeschoben und durch Zuziehen der beiden 5/0 Fäden fixiert. Zur weiteren Sicherung wurde der Katheter mit einem geflochtenen 5/0 Polyesterfaden (Ethibond<sup>®</sup> Excel, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) an der Haut angenäht.

Der in die linke A. carotis communis eingeführte Polyäthylenkatheter mit einem Außen- und Innendurchmesser von 0,8mm bzw. 0,4mm (Portex Polythene Tubing, Fa. Portex Limited, Hythe, UK) war, um ihm eine der Anatomie des Operationsgebietes entsprechende günstige Form zu geben, zweifach um 90° abgewinkelt auf ein Stück Holz gespannt, bei 100 °C für fünf Minuten in einem Inkubator erwärmt und danach bei Raumtemperatur wieder abgekühlt worden. Ca. 20cm vom proximalen Ende entfernt waren der Katheter durchtrennt und die beiden Enden über eine abgebrochene Injektionskanüle der Stärke 27G wieder konnektiert worden. Durch Diskonnektion an dieser Stelle wurden ca. 5min vor und ca. 25min nach Induktion der Ischämie sowie ca. 15min nach deren Beendigung je 50µl Blut in eine Glaskapillare (MultiCap 60µl, Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland) gefüllt und Blutgase, Säure-Base-Haushalt, Elektrolyte, Laktat und Glukose analysiert (Blood Analysis System 860, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland).

Das distale Ende des Katheters war auf eine Injektionskanüle der Stärke 27G aufgezogen worden, die um die Hälfte gekürzt worden war. Über einen Dreiweghahn waren ein Druckaufnehmer (DTX Plus DT-XX, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) und eine Perfusorleitung (Perfusor®-Leitung, Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) angeschlossen worden, über die eine Perfusorpumpe (WPI sp 100i syringe pump, World Precision Instruments, Sarasota, USA) den Katheter kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung (0,2ml/h, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland) spülte. Der Blutdruck wurde vom Einbringen des Katheters bis zum Ende des Versuchs kontinuierlich aufgezeichnet.

In diesen Versuchen wurde die Laser-Doppler Fluxmetrie nicht nur zur Kontrolle der Okklusion der A. cerebri media verwandt, sondern auch, um die Ischämietiefe und den Grad der Reperfusion in den beiden Gruppen zu vergleichen. Hierzu wurde die lokale Hirndurchblutung vom Anbringen der Sonde bis zum Versuchsende kontinuierlich aufgezeichnet.

## **2.9 Gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehalts**

Der Hirnwassergehalt wurde bei B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> oder C57/Bl6 Mäusen 24 Stunden nach Shamoperation oder MCAO (n=4 pro Gruppe) gravimetrisch bestimmt – wie von unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben (Schulz et al., 2000). Die insgesamt 16 Tiere wurden hierfür durch zervikale Dislokation getötet, die Gehirne entnommen und die Hemisphären

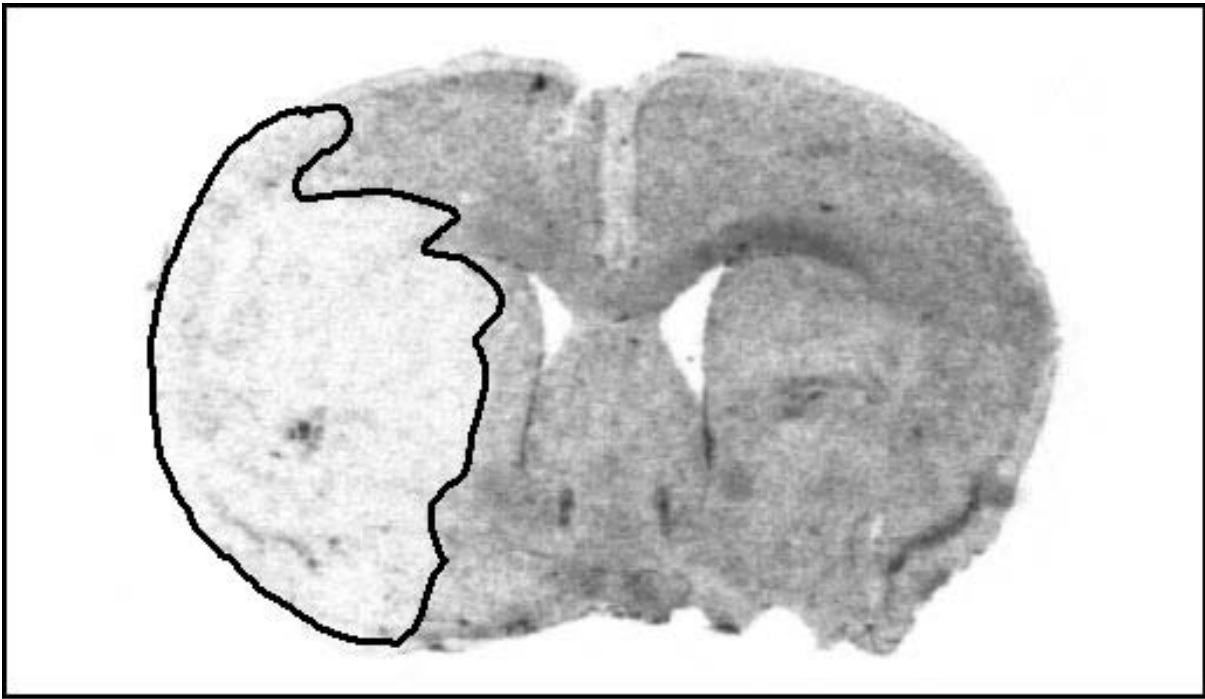
getrennt. Beide Hemisphären wurden gewogen (AG 245, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland), um das Feuchtgewicht zu bestimmen (wet weight – WW). Dann wurden die Hemisphären für 24 Stunden bei 110°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Zur Bestimmung des Trockengewichts (dry weight – DW) wurden sie erneut gewogen. Basierend auf dem Feucht- und Trockengewicht konnte der Wassergehalt der ischämischen und der nichtischämischen Hemisphäre nach der folgenden Formel errechnet werden: Wassergehalt % =  $(WW - DW) / WW \times 100$

## 2.10 Histomorphometrische Quantifizierung des Infarkt- volumens

Die Tiere ( $B_2^{-/-}$  und C57/Bl6 Mäuse; n=7 pro Gruppe) wurden nach 24 Stunden Reperfusion durch zervikale Dislokation getötet und die Gehirne wie zuvor beschrieben entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden sie zum Durchfrieren für 5 Minuten in pulverisiertes Trockeneis gelegt und anschließend in Aluminiumfolie eingewickelt bei –20°C in einem Gefrierschrank gelagert. Später wurden sie in TissueTek® (Sakura Finetek Europe B.V., Zeoterwoude, Niederlande) eingebettet mit einem Cryostat (HM560, Microm, Walldorf, Deutschland) in 10µm dicke koronare Scheiben geschnitten. In einem Abstand von 750µm wurden Gefrierschnitte entnommen, sodass von jedem Gehirn 12 koronare Schnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden mit Cresylviolett nach Nissl gefärbt. Bereits innerhalb der ersten Stunden nach Eintritt der Ischämie fällt dabei ein Schwund an Nissl-Schollen, d.h. des RNA-haltigen rauen endoplasmatischen Retikulums, auf. Durch diese sogenannte Tigrolyse demarkieren sich die ischämischen Zonen im histologischen Übersichtspräparat als Erbleichungsherde (Abb. 9). Die gefärbten Präparate wurden mit einer digitalen Kamera fotografiert und mit einem Bildanalyse-System (Optimas 5.1, MediaCybernetics, Carlsbad, CA, USA) ausgewertet, indem die Flächen der Hemisphären sowie des Infarktes ausgemessen wurden.

Da das infarzierte Gewebe durch Ödembildung stark vergrößert ist, ein direktes Ausmessen des Infarktes also zu einem zu großen Wert führen würde, wurde eine Korrekturrechnung durchgeführt (Swanson et al., 1990). Hierbei wird die Infarktfläche ( $IF_{abs}$ ) als Differenz von nicht infarzierter Fläche der ipsilateralen Hemisphäre ( $IH_{gesund}$ ) und kontralateraler Hemisphäre (KH) ausgedrückt. Um Unterschieden in der Größe der Gehirne Rechnung zu tragen, wurde diese errechnete Infarktfläche nicht als Absolutwert, sondern als

Anteil an der Gesamtfläche der Hemisphäre dargestellt (Zweckberger et al., 2003). Hieraus ergab sich folgende Formel:  $IF_{rel} [\%] = (KH - IH_{gesund}) / KH \times 100$ . Das Volumen des Infarktes wurde errechnet als das Produkt der Summe der Infarktflächen und dem Schnittabstand. Entsprechend konnten die Volumina der Hemisphären bestimmt werden.



**Abbildung 9:** Mit Cresylviolett gefärbter Schnitt durch das Gehirn einer Maus 24h nach MCAO, in dem sich der Infarkt (schwarz umrandet) deutlich demarkiert.

## 2.11 Test der motorischen Funktion

Die motorische Funktion wurde mit Hilfe eines neurologischen Defizit-Scores (Huang et al., 1994) in  $B_2^{-/-}$  und C57/Bl6 Mäusen (n=7 pro Gruppe) unmittelbar vor und 24 Stunden nach Reperfusion bewertet. Hierzu wurden die Tiere zunächst auf eine ausreichend große horizontale Fläche gesetzt und beobachtet. Zeigten sie keine spontane motorische Aktivität, so erhielten sie vier Punkte. Wenn sie auf die kontralaterale Seite fielen, erhielten sie drei Punkte. Zwei Punkte wurden vergeben, wenn sie zur kontralateralen Seite kreisten, also mit dem Uhrzeigersinn im Kreis liefen. Bewegten sie sich soweit normal, so wurden sie am Schwanz bis knapp über den Boden angehoben. War bei diesem Manöver der Stellreflex eingeschränkt, was sich darin äußerte, dass die kontralaterale Vorderpfote nicht ausgestreckt wurde oder es zur Lateralflexion des Körpers zur kontralateralen Seite kam, bekam das Tier

einen Punkt. Keinen Punkt erhielt es, wenn es sich in diesem Test normal verhielt, also eine komplett normale motorische Aktivität zeigte.

<b>Punkte</b>	<b>Kriterium</b>	<b>Beurteilung</b>
0	Normale motorische Funktion	Kein motorisches Defizit
1	Bei Anheben am Schwanz Flexion der kontralateralen Vorderpfote und/oder Lateralflexion des Körpers zur kontralateralen Seite	Leichtes Defizit
2	Kreisen zur kontralateralen Seite	Moderates Defizit
3	Fallen auf die kontralaterale Seite	Schweres Defizit
4	Keine spontane motorische Aktivität	Schweres Defizit

**Tabelle 2:** *Neuroscore zur Beurteilung der motorischen Funktion. Angegeben sind das zu beobachtende Kriterium, die Bewertung dieses Kriteriums in Punkten und seine qualitative Beurteilung*

## 2.12 Langzeitbeobachtung

Für die Langzeitversuche wurden je zehn C57/Bl6 und B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse einer transienten fokalen zerebralen Ischämie unterzogen. Im Anschluss wurden sie eine Woche im Tierstall aufbewahrt und täglich untersucht. Unmittelbar vor Operation, 12 und 24 Stunden nach Reperfusion sowie alle weiteren 24 Stunden wurde der Zustand der Tiere beurteilt, ihr Körpergewicht mit einer digitalen Waage (Kern KB 800-2, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) bestimmt, und ihre Körpertemperatur mit einem digitalen Thermometer (Digital-Präzisions-Taschenthermometer GTH 175/PT, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) rektal gemessen.

## 2.13 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (standard deviation, SD) dargestellt. Die Überlebensanalyse wurde mit dem Peto&Peto Wilcoxon Test (Statistica, StatSoft, Tulsa, OK, USA) durchgeführt. Für alle anderen statistischen Analysen wurde die SigmaStat Software (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) verwendet. Um zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney Rangsummen Test benutzt. Zeitliche

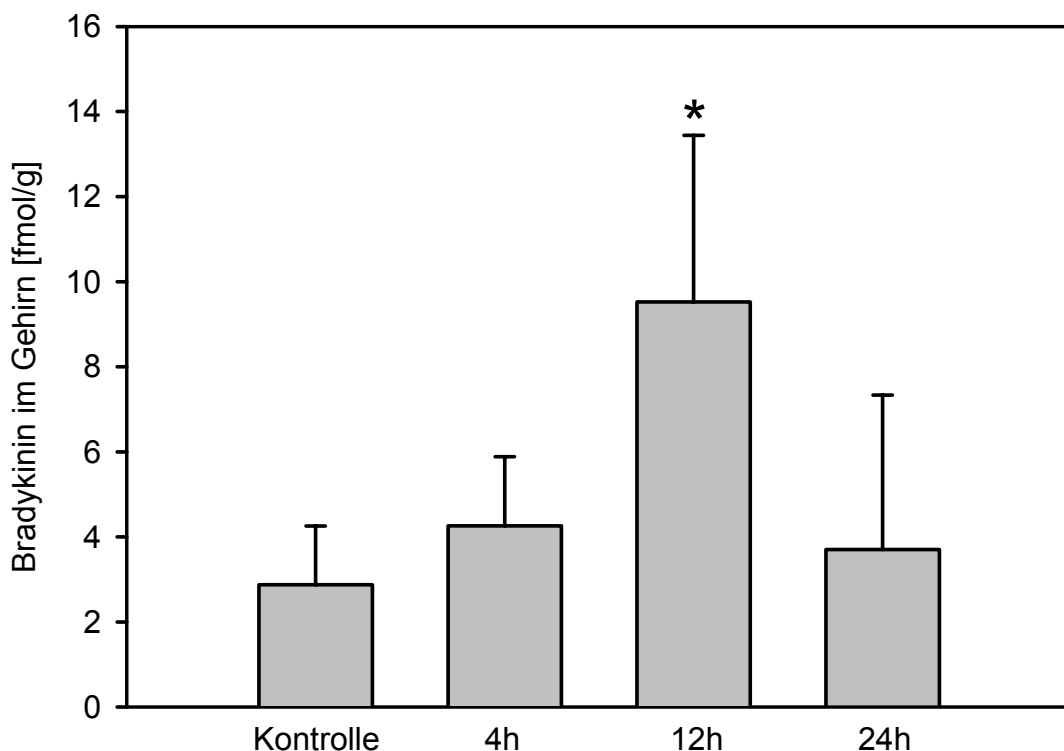
Reihenuntersuchungen (Physiologie, lokale Hirndurchblutung) wurden gegen den Grundwert mit dem Friedman's Repeated Measures ANOVA on Ranks, gefolgt vom Dunn's oder Dunnett's All Pairwise Multiple Comparison Procedure als post hoc Test, getestet. Korrelationen wurden mit der Spearman Rank Order Correlation getestet.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant beurteilt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zeitlicher Verlauf der Bradykinin-Produktion und Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie

#### 3.1.1 Bradykinin Konzentration im Gehirn nach Ischämie

Da dem Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens zugeschrieben wird, untersuchten wir die Produktion von Bradykinin, dem Hauptagonisten an diesem Rezeptor, im Gehirn von Mäusen, die einer 45minütigen Okklusion der A. cerebri media unterzogen worden waren.



**Abbildung 10:** Darstellung der Konzentration von Bradykinin im Gehirn von Mäusen ohne Operation ( $n=4$ ) oder 4h ( $n=5$ ), 12h ( $n=4$ ) oder 24h ( $n=5$ ) nach MCAO (unterschiedliche  $n$  wegen zwei fehlgeschlagener Messungen) als  $MW \pm SD$ . Quantifiziert wurde das Bradykinin in Hirnlysaten mittels RIA nach Extraktion in Ethanol und Trennung durch HPLC. Die Konzentration ist nach 12h signifikant ( $*p < 0,03$ ) höher als in den Kontrollen oder zum Zeitpunkt 4h.

Die Bradykinin Konzentration erhöhte sich im Hirngewebe 12 Stunden nach Ischämie von basalen  $2,9 \pm 1,4 \text{ fmol/g}$  signifikant um das 3fache auf  $9,5 \pm 3,9 \text{ fmol/g}$ . Dieses Maximum ist signifikant doppelt so groß wie die Konzentration zum Zeitpunkt 4h ( $4,3 \pm 1,6 \text{ fmol/g}$ ). Anschließend sinkt die Konzentration wieder auf Ausgangswerte ab (24h nach MCAO:  $3,7 \pm 3,6 \text{ fmol/g}$ ).

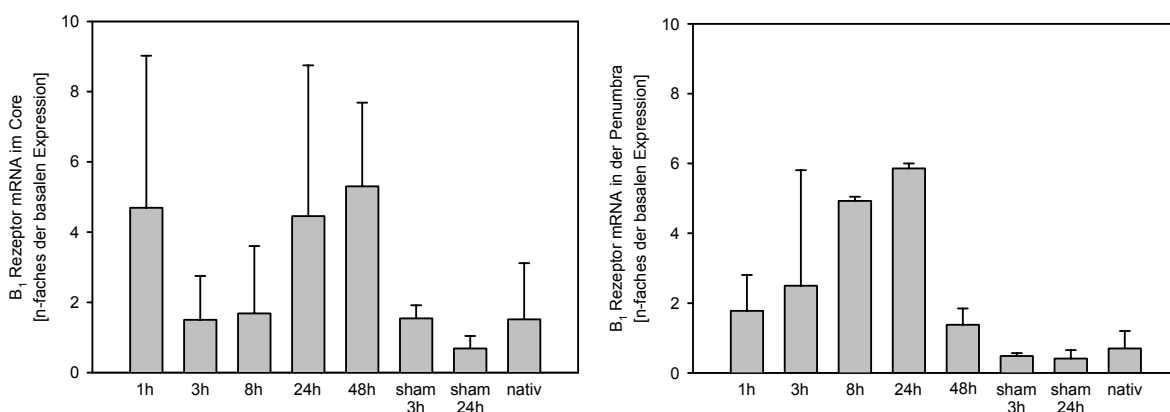
### 3.1.2 Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie

Da die Kinine, deren wichtigster Vertreter das Bradykinin ist, ihre Wirkung über Rezeptoren – die Kinin Rezeptoren  $B_1$  und  $B_2$  – vermitteln, untersuchten wir die Expression dieser Rezeptoren sowohl auf Ebene der Transkription (mRNA) als auch auf Ebene der Translation (Protein).

#### 3.1.2.1 mRNA der Kinin Rezeptoren

Die Vervielfachung der mRNA der Kinin Rezeptoren wurde in Core und Penumbra des Infarktes sowie in der kontralateralen Hemisphäre zu verschiedenen Zeitpunkten nach transienter fokaler zerebraler Ischämie, nach Shamoperation und in Mäusen, die keinerlei Operation unterzogen worden waren, mittels Real-Time PCR ermittelt.

##### 3.1.2.1.1 Kinin $B_1$ Rezeptor



**Abbildung 11:** Die Kinin  $B_1$  Rezeptor mRNA wurde mittels semiquantitativer Real-Time PCR in der kontralateralen Hemisphäre, sowie Core und Penumbra der ipsilateralen Hemisphäre in Kontrollen (nativ, 3h und 24h nach sham Operation) und zu den Zeitpunkten 1h, 3h, 8h, 24h und 48h nach Ischämie bestimmt ( $n=2$  pro Gruppe). Dargestellt ist die Vervielfachung der Menge an mRNA in Core (links) und Penumbra (rechts). Die Ergebnisse sind auf die  $\beta$ -Actin Expression in der jeweiligen



*Probe sowie die Rezeptor Expression im gesunden Gewebe (korrespondierende kontralaterale Hemisphäre) normalisiert und als  $MW \pm SD$  ausgedrückt.*

In den sham operierten Tieren sahen wir keine Änderung der Expression der mRNA des B<sub>1</sub> Rezeptors, weder 3 noch 24 Stunden post operationem.

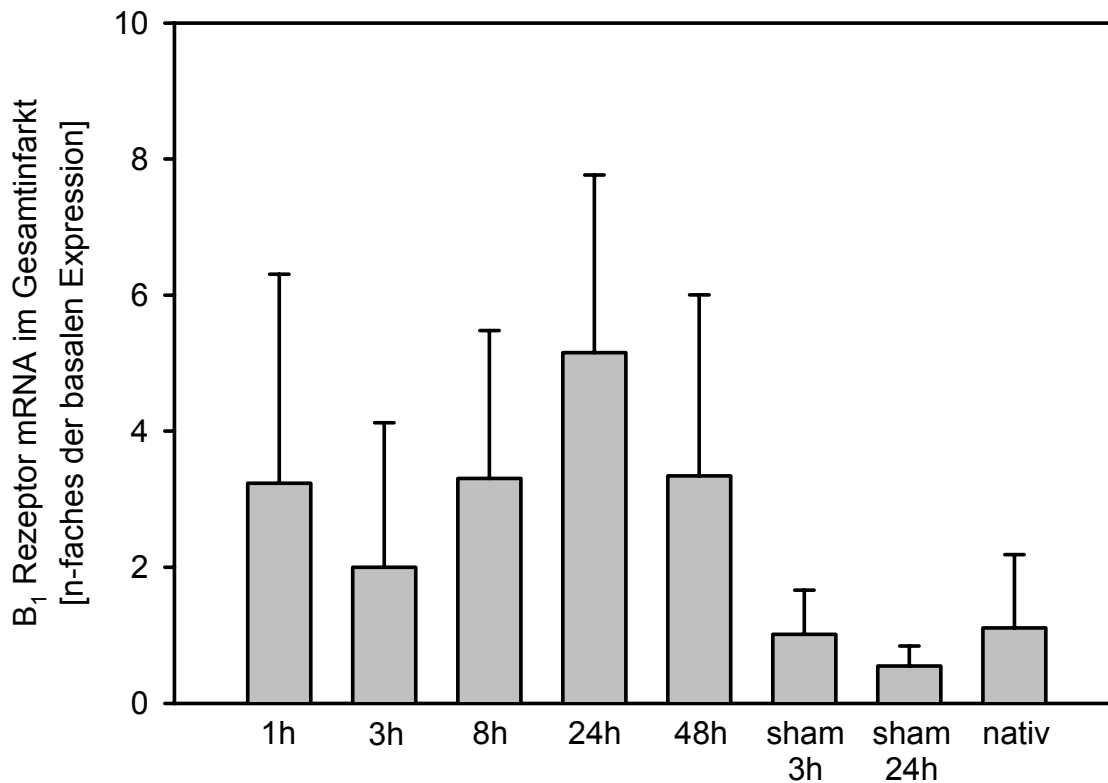
Im Core des Infarktes zeigte sich bereits sehr früh, nämlich zum Zeitpunkt 1h nach Ischämie, eine Steigerung der Expression auf das 4,7-fache, die dann zum Untersuchungszeitpunkt 3h wieder auf das 1,5-fache abnahm. Anschließend stieg sie bis zum letzten Messzeitpunkt 48h wieder auf das 5,3-fache an.

In der Penumbra konnten wir den im Core beobachteten sehr frühen Anstieg zum Zeitpunkt 1h nicht feststellen. Hier fand sich eine kontinuierliche Zunahme über die ersten 24 Stunden bis auf das 5,9-fache. Nach weiteren 24 Stunden war die Expression wieder auf das 1,4-fache abgesunken.

Im Core wie in der Penumbra steigerte sich also die Expression der mRNA des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors auf ähnliche maximale Werte, nämlich auf das ca. 5-fache. Der zeitliche Verlauf dieser Hochregulierung unterschied sich jedoch. Während im Core dieses Maximum in der Akutphase (1h nach MCAO) und nach einer anschließenden Abnahme auf Grundwerte wieder in der chronischen Phase (24h und 48h nach MCAO) zu sehen war, verhielt es sich in der Penumbra quasi invers. Zu den Zeitpunkten 1h und 48h fanden sich Grundwerte, das Maximum wurde hier zwischen 8h und 24h erreicht.

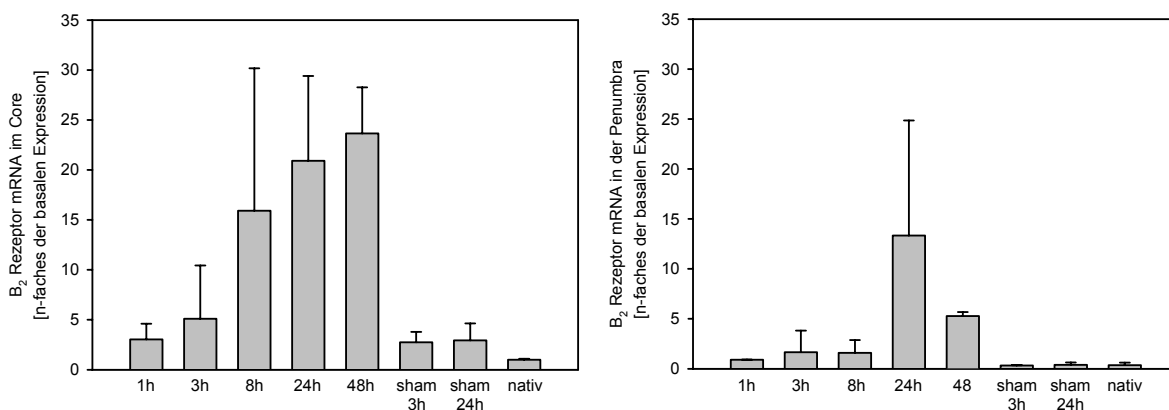
Da sich der Infarkt nicht sichtbar demarkiert, wurden die Proben, in denen die Expression bestimmt wurde, aus Gebieten entnommen, in denen nach unserer Erfahrung die Lokalisation von Core bzw. Penumbra des Infarktes am wahrscheinlichsten war. Die Ausdehnung des Infarktes ist jedoch variabel. Somit können unsere Ergebnisse nicht sicher dem Core oder der Penumbra zugeordnet werden. Deswegen ist es sinnvoll, zusätzlich den Infarkt als Ganzes ohne Differenzierung zwischen Core und Penumbra als Gesamtheit zu betrachten.

Die Hochregulation der Expression des B<sub>1</sub> Rezeptors zeigte zwei Gipfel. Der erste Gipfel fand sich nach einer Stunde mit einer Vervielfachung auf das 3,2-fache. Nach einer Abnahme auf das 2,0-fache des basalen Expressionsniveaus zum Zeitpunkt 3h, stieg sie auf das 3,3-fache nach 8 Stunden und erreichte nach 24 Stunden mit dem 5,2-fachen ihren zweiten Gipfel. Anschließend nahm sie wieder auf das 3,3-fache zum Zeitpunkt 48h ab. Signifikante Unterschiede bestanden nicht.



**Abbildung 12:** Die in der letzten Abbildung für Core und Penumbra getrennt gezeigten Daten sind hier zur Darstellung des Gesamtfarktes zusammengelegt worden und als  $MW \pm SD$  ausgedrückt. Zu sehen ist die Vervielfachung der Menge an B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA im Infarkt in Kontrollen (nativ, 3h und 24h nach sham Operation) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie (1h, 3h, 8h, 24h und 48h).

### 3.1.2.1.2 Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor



**Abbildung 13:** Die Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor mRNA wurde mittels semiquantitativer Real-Time PCR in der kontralateralen Hemisphäre, sowie Core und Penumbra der ipsilateralen Hemisphäre in Kontrollen (nativ, 3h und 24h nach sham Operation) und zu den Zeitpunkten 1h, 3h, 8h, 24h und 48h nach Ischämie bestimmt ( $n=2$  pro Gruppe). Dargestellt ist die Vervielfachung der Menge an mRNA in Core (links) und Penumbra (rechts). Die Ergebnisse sind auf die  $\beta$ -Actin Expression in der jeweiligen Probe sowie die Rezeptor Expression im gesunden Gewebe (korrespondierende kontralaterale Hemisphäre) normalisiert und als  $MW \pm SD$  ausgedrückt.

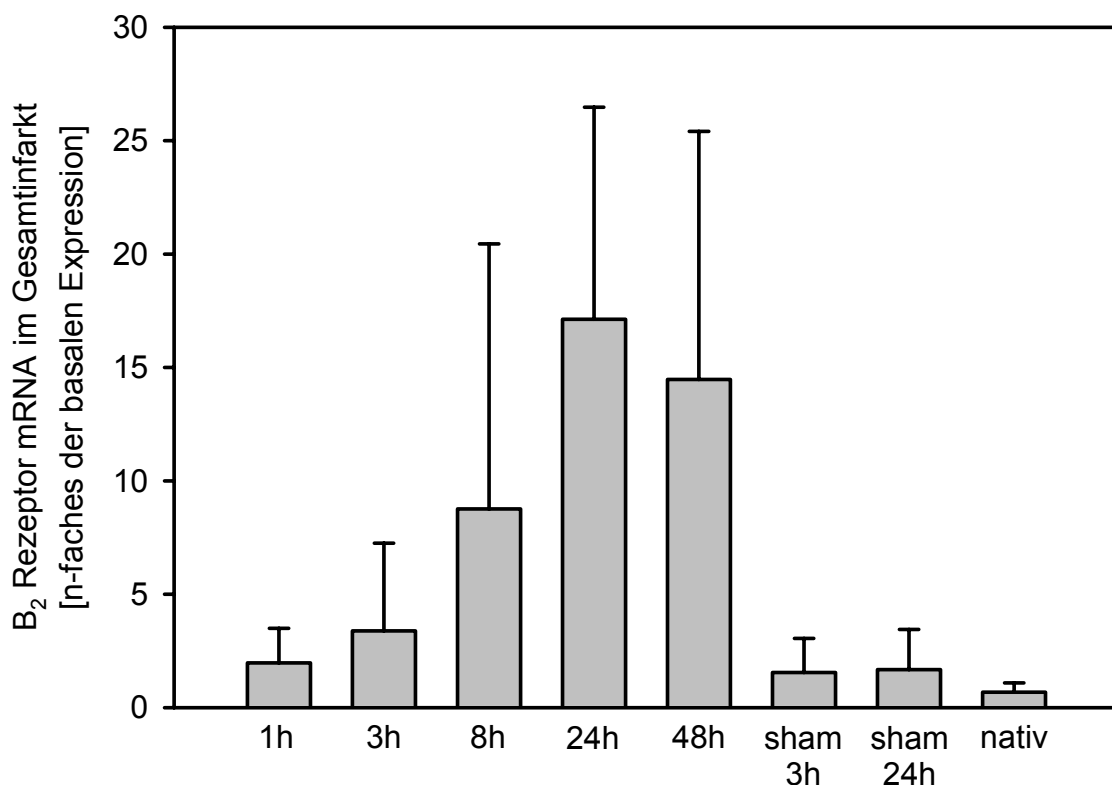
Auch hier konnten wir keinen Effekt von Operation oder Narkose auf die Expression der mRNA des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors feststellen.

Im Core sahen wir eine kontinuierliche (nach 1h 3,0-fach, 3h 5,1-fach, 8h 15,9-fach und 24h 20,9-fach) Zunahme der Expression bis auf das 23,7-fache nach 48 Stunden.

In der Penumbra zeigte sich zu den ersten drei Messzeitpunkten keine Hochregulation der mRNA Expression. Nach 24 Stunden fand sich jedoch ein deutlicher Anstieg auf das 13,3-fache. Weitere 24 Stunden später war die Expression jedoch wieder auf das 5,3-fache herunterreguliert worden.

Somit zeigte sich, dass die Hochregulation der Expression der mRNA des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors in der Penumbra sehr viel geringer ausfiel als im Core (13-fach vs. 24-fach) und nach ihrem Maximum zum Zeitpunkt 24h bereits wieder herunter reguliert wurde, während sie im Core noch weiter anstieg und ihr Maximum erst nach 48 Stunden erreichte.

Wenn man nun nicht zwischen Core und Penumbra differenziert, sondern den Infarkt in seiner Gesamtheit betrachtet, ergibt sich folgendes Bild:



**Abbildung 14:** Die in der letzten Abbildung für Core und Penumbra getrennt gezeigten Daten sind hier zur Darstellung des Gesamtinfarktes zusammengelegt worden und als  $MW \pm SD$  ausgedrückt. Zu sehen ist die Vervielfachung der Menge an B<sub>2</sub> Rezeptor mRNA im Infarkt in Kontrollen (nativ, 3h und 24h nach sham Operation) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie (1h, 3h, 8h, 24h und 48h).

Die Expression der mRNA des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors verdoppelte sich innerhalb der ersten Stunde nach Ischämie und stieg über das 3,4-fache nach 3 Stunden und das 8,8-fache nach 8 Stunden auf das bis zu 17,1-fache nach 24 Stunden an. Zum Zeitpunkt 48h hatte sie dann wieder auf das 14,5-fache abgenommen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

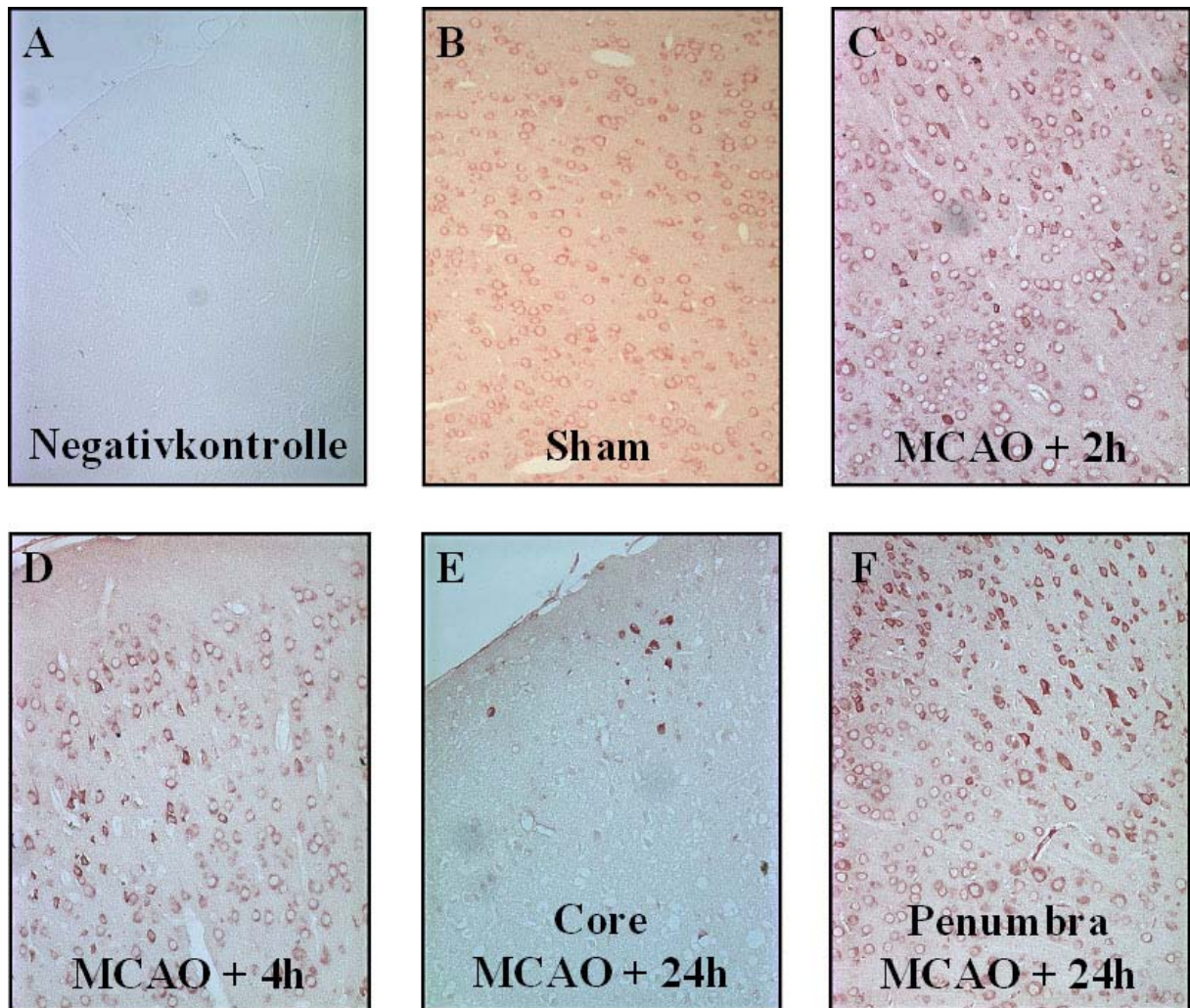
### **3.1.2.2 Immunhistochemie der Kinin Rezeptoren**

Um zu untersuchen, ob sich die beobachtete Hochregulation der Expression der mRNA der Kinin Rezeptoren nach Ischämie auch in einer entsprechend vermehrten Expression der Kinin Rezeptoren als Translationsprodukte dieser mRNA niederschlägt, führten wir eine Immunhistochemie für beide Kinin Rezeptoren durch. Auch interessierte uns, ob die Hochregulation auf Proteinebene einem ähnlichen Zeitverlauf folgt. Hierfür werteten wir auf Hirnschnitten von Mäusen, die einer MCAO oder Shamoperation unterzogen worden waren, die Immunreaktivität der Zellen in bestimmten Regions of Interest (ROI) aus, die dem Core bzw. der Penumbra des Infarktes entsprachen.

#### **3.1.2.2.1 Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor**

Eine Anfärbung des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor Proteins wurde über das gesamte gesunde Gehirn inklusive aller Schichten der Großhirnrinde, des Striatums und des Hippocampus beobachtet. B<sub>1</sub> Rezeptoren wurden ausschließlich auf Zellen, die die Morphologie von Neuronen besaßen, sichtbar. Keine Anfärbung fand sich auf zerebralen Gefäßen oder nichtneuronalen Zellen. Die Färbung war hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, der Zellkern war ausgespart. Die Immunreaktivität der Zellmembran war schwach. Das Weglassen des Primärantikörpers verhinderte ein Anfärben völlig. Beginnend 2 Stunden nach MCAO wurde eine Veränderung der B<sub>1</sub> Rezeptor Immunreaktivität in Zellen beobachtet, die Zeichen ischämischer Schädigung an den Tag legten. In diesen Zellen nahm die Färbung des Kerns zu und eine Immunreaktivität der Zellmembran wurde offensichtlich. Tote Zellen im Infarkt zeigten keinerlei Anfärbung, was darauf hindeutet, dass der B<sub>1</sub> Rezeptor Antikörper keine geschädigten Zellen unspezifisch färbte. Im Gegensatz zu diesen Zellen und zu Zellen normalen Gewebes zeigten Zellen im Randbereich des Infarktes – der Penumbra – eine sehr

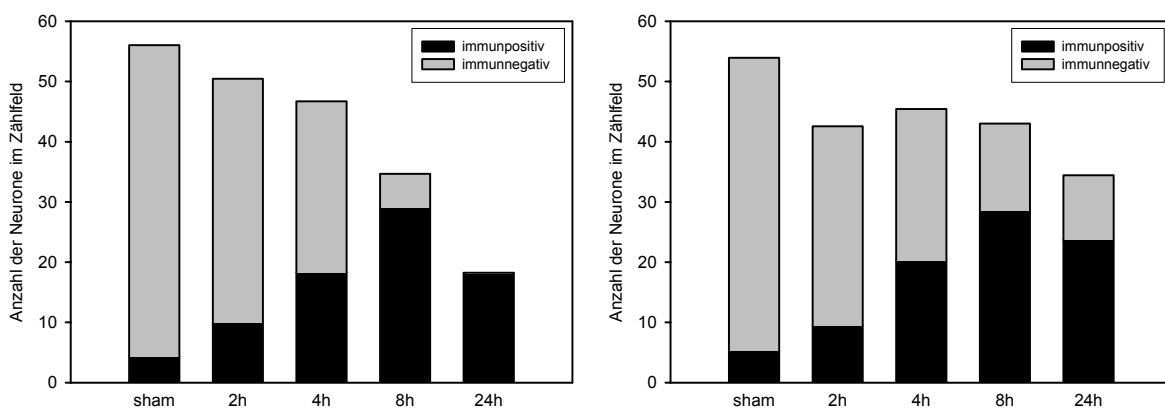
starke Färbung der Zellmembran. Diese Veränderungen in der Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor Proteins wurden in Core und Penumbra des Infarktes quantifiziert.



**Abbildung 15:** Immunhistochemie des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors im gesunden Gehirn und zu verschiedenen Zeitpunkten nach 45minütiger MCAO. Keine Färbung wurde im infarzierten Areal (**E**) oder bei Weglassen des Primärantikörpers (**A**) beobachtet. B<sub>1</sub> Rezeptoren wurden nur in Zellen mit neuronaler Morphologie exprimiert (**B**). Gesunde Zellen zeigten ein zytoplasmatisches Färbemuster unter Aussparung des Kerns (**B**). Nach Ischämie änderten die Zellen, die auch morphologisch Zeichen ischämischer Schädigung zeigten, ihr Färbemuster von zytoplasmatisch zu mehr membranbezogen (**C**). 24h nach Ischämie zeigten die meisten Zellen im Infarktgebiet keine Färbung des B<sub>1</sub> Rezeptors mehr (**E**), während die meisten Zellen im Randbereich des Infarktes deutlich B<sub>1</sub> Rezeptor positive Zellmembranen zeigten (**F**). Bild **A** wurde durch ein x10 Objektiv aufgenommen, Bilder **B-F** mit einem x20 Objektiv.

Im Core nahm die Anzahl an Neuronen von 56,1±12,2 pro Zählfeld in den sham operierten Tieren signifikant (\*p<0,05 vs. sham) um fast 70% auf 18,3±8,2 nach 24 Stunden ab. Dieser Verlust an Neuronen entwickelte sich stetig (50,0±10,8 nach 2h, 46,7±11,6 nach 4h, 34,7±9,1\* nach 8h) und ging mit einer kontinuierlichen Abnahme immunnegativer Neuronen von 51,7±13,6 in Mäusen ohne Ischämie auf 40,1±12,6, 28,4±16,0\*, 5,7±5,9\* und

0,2±0,8\* in Mäusen 2h, 4h, 8h, und 14h nach Ischämie einher. Dieser massiven Abnahme immunnegativer Neuronen stand eine stetige Zunahme des Anteils immunpositiver Neuronen an der Gesamtzahl entgegen. Waren in den unbehandelten Kontrollen kaum immunpositive Neuronen zu finden (8,5±7,0%), so nahm deren Anteil über 21,0±10,0% nach 2 Stunden, 41,4±25,9%\* nach 4 Stunden und 82,5±17,0%\* nach 8 Stunden auf bis zu 98,6±5,5%\* nach 24 Stunden zu. Dieser kontinuierlichen Zunahme des Anteils an der Gesamtzahl der Neuronen entsprach jedoch wegen des starken Verlustes an Neuronen über die Zeit keine kontinuierliche Zunahme in absoluten Werten. Zunächst stieg die Anzahl immunpositiver Neuronen zwar von 4,4±3,5 (sham) über 10,0±4,6 (2h) und 18,3±11,4\* (4h) auf 29,0±10,6\* (8h) an, nahm dann aber wieder auf 18,1±8,3\* (24h) ab.

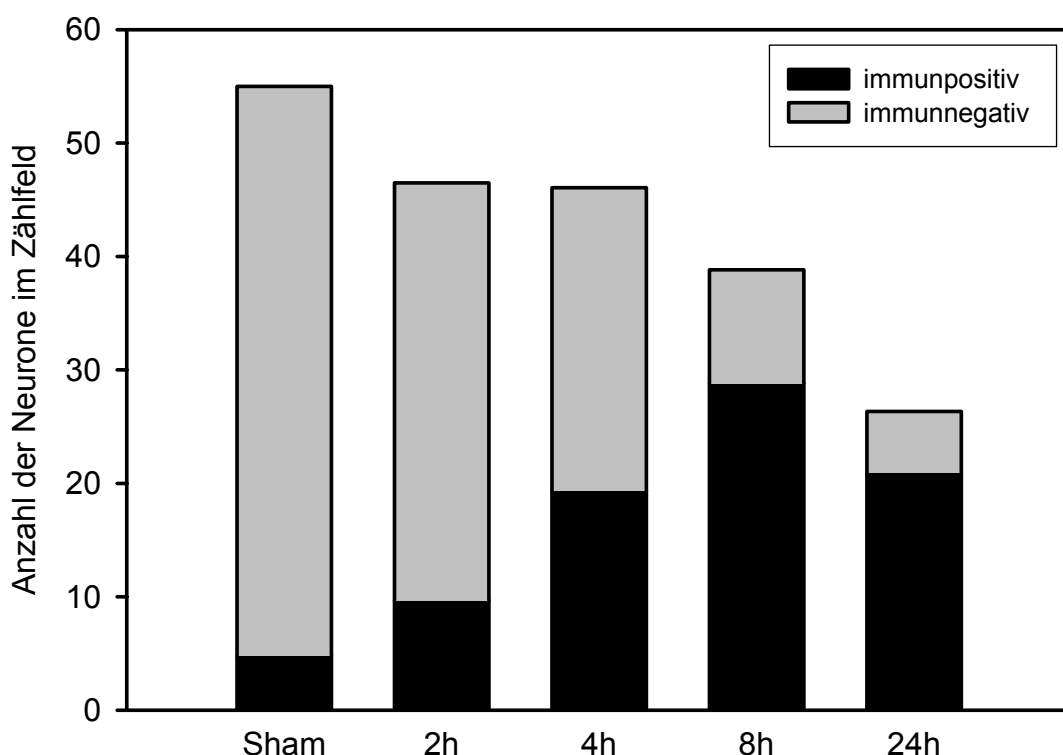


**Abbildung 16:** In je 2 Gehirnschnitten (Bregma +0,5mm oder -2,5mm) der Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor Immunhistochemie von sham operierten Mäusen oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach 45minütiger MCAO (n=5) wurden in je 4 definierten Regions of Interest (ROI), die Core oder Penumbra repräsentierten, die immunpositiven oder -negativen Neuronen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl immunpositiver (schwarz) und -negativer (grau) Neuronen pro Zählfeld des Cores (links) oder der Penumbra (rechts). Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet – sie sind dem Text zu entnehmen.

In der Penumbra verhielt es sich ähnlich. Die Gesamtzahl an Neuronen nahm vergleichbar ab (sham: 54,0±13,3; 2h: 42,6±11,6; 4h: 45,5±13,0; 8h: 43,0±14,4; 24h: 34,4±9,8\*). Der auch hier beobachtete Verlust an immunnegativen Neuronen fiel jedoch geringer aus. Es fanden sich bei einem Ausgangswert von 48,7±12,8 in sham operierten Tieren immerhin noch 10,8±7,5\* 24 Stunden nach MCAO (33,1±14,2 nach 2h, 25,1±15,3\* nach 4h, 14,4±7,7 nach 8h). Dementsprechend nahm der Anteil immunpositiver Neuronen auch nicht in dem im Core beobachteten Maße zu, sondern erreichte nach 24 Stunden ein Maximum von „lediglich“ 68,9±19,8%\* (sham: 10,8±13,0%; 2h: 25,2±17,8%; 4h: 46,0±24,8%\*; 8h: 65,5±16,1%\*). Da der Anteil zwischen 8 und 24 Stunden kaum noch zunahm, die Gesamtzellzahl sich aber weiter deutlich verminderte, nahm die Anzahl

immunpositiver Neuronen wieder auf  $23,7 \pm 10,3^*$  Zellen nach 24 Stunden ab, nachdem sie zuvor von einem Ausgangswert von  $5,3 \pm 6,1$  Zellen (sham) über  $9,5 \pm 5,5$  nach 2 Stunden und  $20,4 \pm 12,4^*$  nach 4 Stunden auf ein Maximum von  $28,6 \pm 11,7^*$  Zellen nach 8 Stunden angestiegen war.

Bei der Analyse der Expression der mRNA der Kinin Rezeptoren war es nötig die Daten aus Core und Penumbra zusammen zu legen. Um Zusammenhänge zwischen dem Niveau der Transkription und der Immunreaktivität erkennen zu können, erscheint es sinnvoll, auch hier zusätzlich zur Einzelbetrachtung von Core und Penumbra den Infarkt ohne Unterteilung in seiner Gesamtheit darzustellen und zu analysieren.



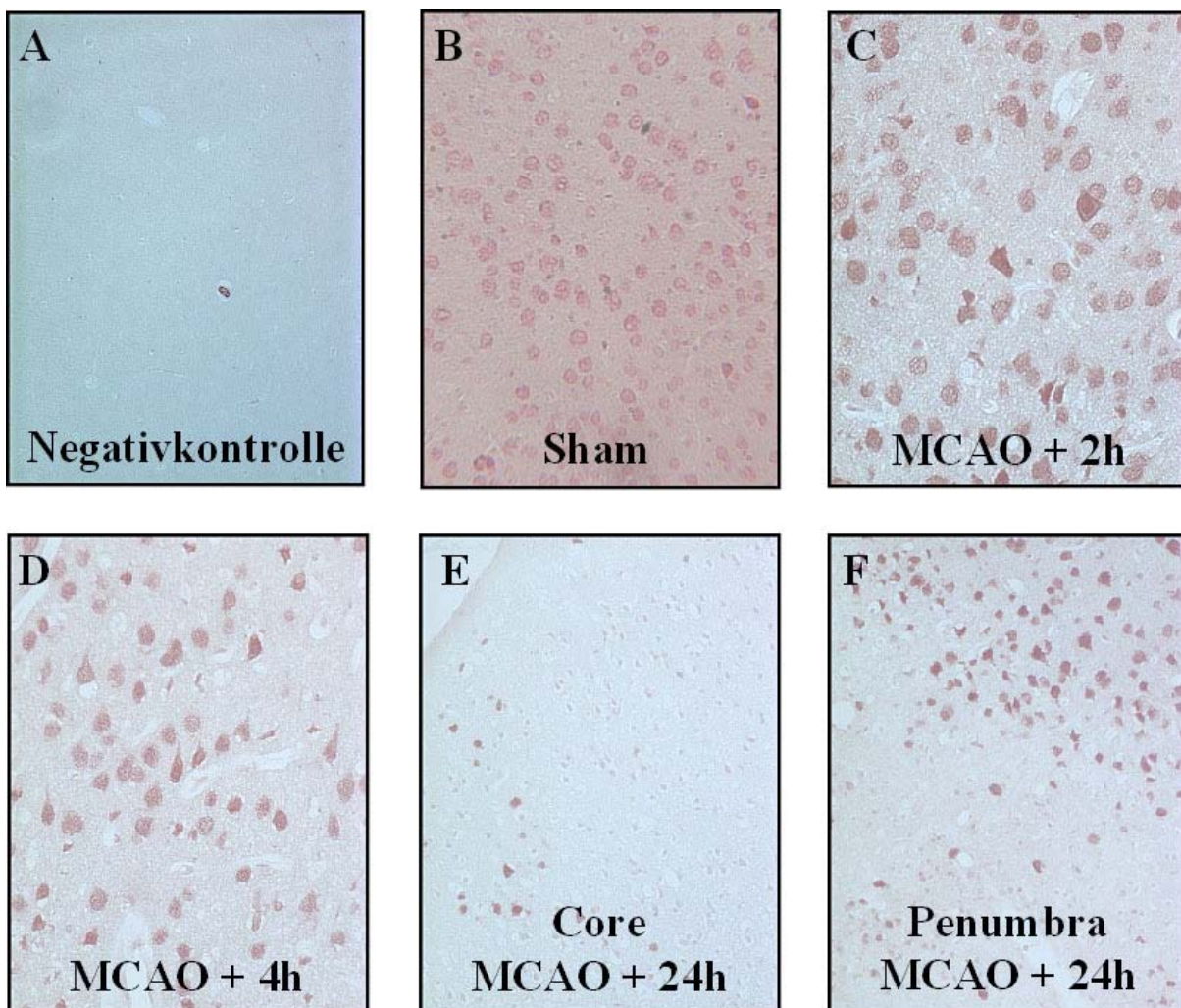
**Abbildung 17:** Die in der letzten Abbildung für Core und Penumbra getrennt gezeigten Daten sind hier zur Darstellung des Gesamtfarktes zusammen gelegt worden. Zu sehen sind die Mittelwerte der Anzahl Kinin  $B_1$  Rezeptor immunpositiver (schwarz) und -negativer (grau) Neuronen pro Zählfeld des Infarktes. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet – sie sind dem Text zu entnehmen.

Die Gesamtzahl an Neuronen pro Zählfeld nahm von ursprünglich 55,0 (sham) auf 46,5 nach 2 Stunden, 46,1 nach 4 Stunden, 38,8 nach 8 Stunden und 26,4 nach 24 Stunden ab. Der Anteil von  $B_1$  Rezeptor immunpositiven Neuronen an dieser Gesamtzahl stieg kontinuierlich an (sham: 8,7%; 2h: 20,9%; 4h: 41,9%; 8h: 74,2%; 24h: 79,2%). Bei sinkender Gesamtzahl war dieses kontinuierliche Anwachsen des prozentualen Anteils jedoch nicht mit einer



kontinuierlichen Zunahme der absoluten Zahl immunpositiver Neuronen verbunden. Die Anzahl immunpositiver Neuronen stieg von 4,8 in sham operierten Mäusen über 9,7 zum Zeitpunkt 2h nach Ischämie und 19,3 zum Zeitpunkt 4h auf 28,8 nach 8 Stunden an. Nach 24 Stunden nahm sie aber wieder auf 20,9 ab. Die Anzahl immunnegativer Neuronen sank kontinuierlich. Bei einem Ausgangswert von 50,2 nahm sie auf 36,8 nach 2 Stunden, 26,8 nach 4 Stunden, 10,0 nach 8 Stunden und 5,5 nach 24 Stunden ab.

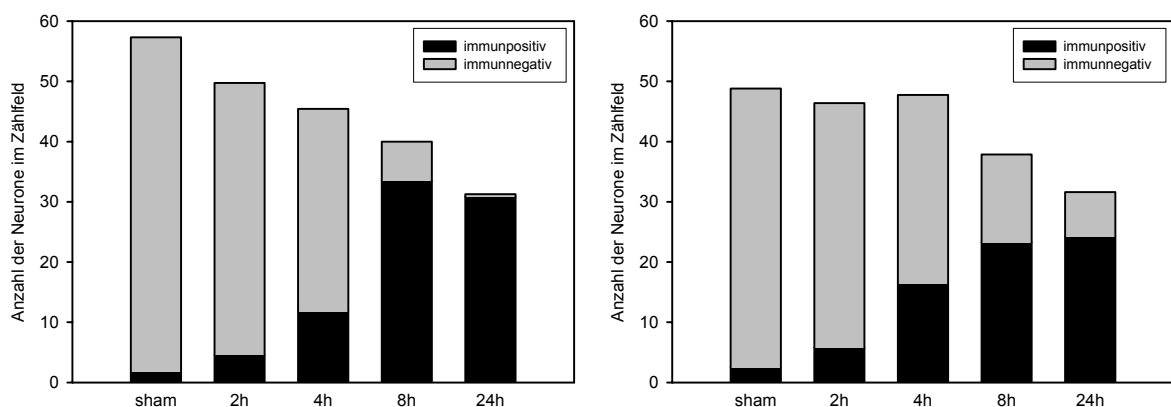
### 3.1.2.2.2 Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor



**Abbildung 18:** Immunhistochemie des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors im gesunden Gehirn und zu verschiedenen Zeitpunkten nach 45minütiger MCAO. Keine Färbung wurde im infarzierten Areal (E) oder bei Weglassen des Primärantikörpers (A) beobachtet. B<sub>2</sub> Rezeptoren wurden nur in Zellen mit neuronaler Morphologie exprimiert (B). Gesunde Zellen zeigten ein nukleäres Färbemuster (B). Nach Ischämie änderten die Zellen, die auch morphologisch Zeichen ischämischer Schädigung zeigten, ihr Färbemuster von nukleär zu mehr membranbezogen (C). 24h nach Ischämie zeigten die meisten Zellen im Infarktgebiet keine Färbung des B<sub>2</sub> Rezeptors mehr (E), während die meisten Zellen im Randbereich des Infarktes deutlich B<sub>2</sub> Rezeptor positive Zellmembranen zeigten (F). Bilder A, B, E und F wurde durch ein x20 Objektiv aufgenommen, Bilder C und D mit einem x40 Objektiv.



Wie bei der Immunhistochemie des B<sub>1</sub> Rezeptors wurde auch hier eine Anfärbung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Proteins in allen Bereichen des Gehirns beobachtet. Diese Anfärbung war ausschließlich auf Zellen, die morphologisch Neuronen entsprachen, nicht aber auf zerebralen Gefäßen oder nichtneuronalen Zellen zu sehen. Die Färbung war hauptsächlich auf der Kernmembran und im Zellkern lokalisiert. Die Immunreaktivität der Zellmembran war auch hier schwach. Ließ man den Primärantikörper weg, so kam es zu keiner unspezifischen Anfärbung durch den Sekundärantikörper. In Zellen, deren Morphologie auf eine ischämische Schädigung hindeutete, veränderte sich die Immunreaktivität bereits 2 Stunden nach MCAO: Die Färbeintensität des Nukleus nahm zu und eine Immunreaktivität der Zellmembran wurde sichtbar. Dass auch der Antikörper gegen den B<sub>2</sub> Rezeptor geschädigte Zellen nicht unspezifisch anfärbte, zeigte sich darin, dass tote Zellen im Infarkt keine Färbung aufwiesen. Im Gegensatz hierzu und zu Zellen gesunden Gewebes zeigten Zellen der Penumbra eine intensive Immunreaktivität von Nukleus und Zellmembran. Auch für das Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Protein wurden die Veränderungen in der Expression in Core und Penumbra quantifiziert.



**Abbildung 19:** In je 2 Gehirnschnitten (Bregma +0,5mm oder -2,5mm) der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Immunhistochemie von sham operierten Mäusen oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach 45minütiger MCAO (n=5) wurden in je 4 definierten Regions of Interest (ROI), die Core oder Penumbra repräsentierten, die immunpositiven oder -negativen Neuronen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl immunpositiver (schwarz) und -negativer (grau) Neuronen pro Zählfeld des Cores (links) oder der Penumbra (rechts). Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet – sie sind dem Text zu entnehmen.

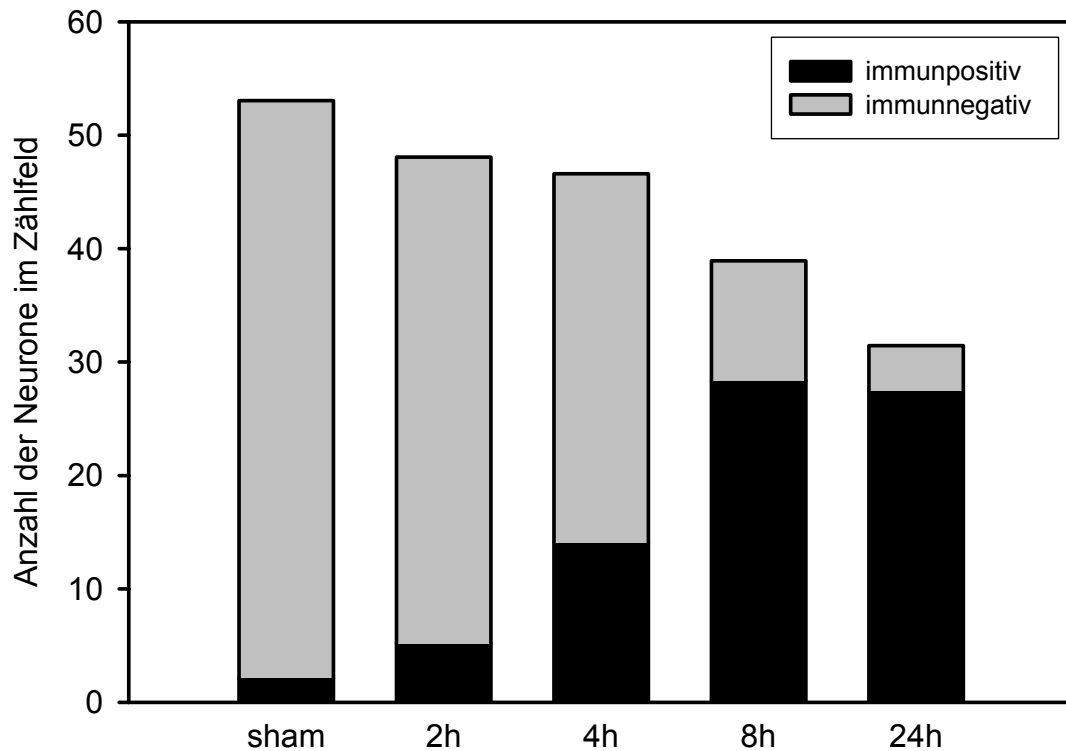
Insgesamt zeigte die Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Immunhistochemie in allen untersuchten Bereichen, also der Gesamtzahl an Neuronen, der Anzahl immunpositiver und -negativer Neuronen sowie dem Anteil immunpositiver Neuronen an der Gesamtzahl, ähnliche Entwicklungen über die Zeit wie die B<sub>1</sub> Rezeptor Immunhistochemie. Es fanden sich jedoch einige Unterschiede im Detail, die im Folgenden genauer dargelegt werden sollen.

Während die Auszählung in der B<sub>2</sub> Immunhistochemie im Core verglichen mit der B<sub>1</sub> Immunhistochemie einen gleichen Ausgangswert für die Gesamtzahl der Neuronen (57,3±12,1) ergab und sich die Entwicklung im frühen postischämischen Zeitraum mit 49,8±10,4 nach 2h, 45,4±14,7 nach 4h und 40,0±8,1\* (\*p<0,05 vs. sham) nach 8h sehr ähnlich darstellte, war die Gesamtzahl an Neuronen zum Zeitpunkt 24h mit 31,3±12,0\* signifikant (p=0,001 vs. B<sub>1</sub> 24h) höher als in der B<sub>1</sub> Immunhistochemie. Die Anzahl immunnegativer Neuronen war jedoch zu allen Zeitpunkten vergleichbar (sham: 55,5±12,1; 2h: 45,2±9,5; 4h: 33,7±18,8\*; 8h: 6,6±7,6\*; 24h: 0,4±1,3\*). Daher musste der beschriebene Unterschied in der Anzahl immunpositiver Neuronen begründet liegen. Diese hatte verglichen mit der B<sub>1</sub> Immunhistochemie einen signifikant (p<0,03 vs. B<sub>1</sub> sham) niedrigeren Ausgangswert (1,8±3,1) und mit 4,6±2,8 auch einen signifikant (p<0,001 vs. B<sub>1</sub> 2h) niedrigeren 2h-Wert. Der Wert von 11,8±9,3\* nach 4 Stunden war immer noch deutlich niedriger, nach 8 Stunden war die Anzahl immunpositiver Neuronen mit 33,5±9,3\* jedoch vergleichbar und nach 24 Stunden mit 31,3±12,0\* sogar signifikant (p=0,001 vs. B<sub>1</sub> 24h) höher. Betrachtet man nun den Anteil immunpositiver Neuronen an der Gesamtzahl Neuronen, so hatte dieser mit 3,1±5,5% hier einen signifikant (p<0,01 vs. B<sub>1</sub> sham) niedrigeren Ausgangswert und entwickelte sich initial (2h: 9,2±5,1%) auch signifikant (p<0,001 vs. B<sub>1</sub> 2h) langsamer. 4 Stunden nach Ischämie war der Anteil mit 30,7±26,0%\* dem Vergleichswert der B<sub>1</sub> Immunhistochemie bereits ähnlich und mit 84,1±18,2%\* und 98,9±3,3%\* nach 8 und 24 Stunden quasi gleich.

In der Penumbra zeigte sich in der Gesamtzahl an Neuronen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor Immunhistochemie. So nahm die Anzahl von 48,8±12,9 (sham) über 46,4±12,3 (2h), 47,8±17,7 (4h) und 37,9±14,2 (8h) auf 31,6±16,3\* (24h) ab. Auch die Abnahme der Anzahl immunnegativer Neuronen verhielt sich ähnlich. Ihre Zahl verminderte sich von 46,3±14,0 in den sham operierten Tieren auf 40,6±13,8 nach 2 Stunden, und 31,4±23,0\* nach 4 Stunden, 14,6±10,0\* nach 8 Stunden und 7,4±8,3\* nach 24 Stunden. Dieser Abnahme immunnegativer Neuronen stand eine kontinuierliche Zunahme immunpositiver gegenüber. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zur B<sub>1</sub> Immunhistochemie in der sham Gruppe (2,5±4,9; p<0,05 vs. B<sub>1</sub> sham) und 2 Stunden nach MCAO (5,8±5,6; p<0,03 vs. B<sub>1</sub> 2h). Zu den restlichen Zeitpunkten waren die Werte (4h: 16,4±15,6\*; 8h: 23,3±10,8\*; 24h: 24,2±10,8\*) nicht verschieden von denen der B<sub>1</sub> Immunhistochemie. So war also der Anteil immunpositiver Zellen an der Gesamtzellzahl initial signifikant (<sup>#</sup>p<0,5, <sup>§</sup>p<0,03) niedriger (5,6±11,5%<sup>#</sup> und 13,4±12,7%<sup>§</sup> in der sham

Gruppe bzw. 2 Stunden nach Ischämie), nahm dann aber über  $38,5 \pm 32,8\%^*$  nach 4 Stunden und  $63,0 \pm 20,4\%^*$  nach 8 Stunden auf bis zu  $79,6 \pm 19,1\%^*$  nach 24 Stunden zu.

Auch die Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Immunhistochemie soll noch ohne Differenzierung zwischen Core und Penumbra betrachtet werden. Für die Darstellung des Infarktes als Gesamtheit sind die Daten von Core und Penumbra zusammen gelegt worden.



**Abbildung 20:** Die in der letzten Abbildung für Core und Penumbra getrennt gezeigten Daten sind hier zur Darstellung des Gesamtinfarktes zusammen gelegt worden. Zu sehen sind die Mittelwerte der Anzahl Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor immunpositiver (schwarz) und -negativer (grau) Neuronen pro Zählfeld des Infarktes. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet – sie sind dem Text zu entnehmen.

Die Gesamtzahl an Neuronen pro Zählfeld nahm von 53,1 in sham operierten Tieren über 48,1 nach 2 Stunden, 46,6 nach 4 Stunden und 39,0 nach 8 Stunden auf 31,4 nach 24 Stunden ab. Auch die Anzahl immunnegativer Neuronen sank kontinuierlich (sham: 50,9; 2h: 42,9; 4h: 32,5; 8h: 10,6; 24h: 3,9). Die Zahl immunpositiver Neuronen stieg von einem Ausgangswert von 2,2 über 5,2 zum Zeitpunkt 2h und 14,1 zum Zeitpunkt 4h auf bis zu 28,4 nach 8 Stunden an, ehe sie nach 24 Stunden wieder leicht auf 27,5 abnahm. Dieser Entwicklung der absoluten Zahl immunpositiver Neuronen im Zählfeld entspricht ein mit der Zeit kontinuierlich wachsender prozentualer Anteil an der Gesamtneuronenzahl von ursprünglich 4,1% (sham) über 10,8% (2h), 30,3% (4h) und 72,8% (8h) auf bis zu 87,6%

(24h). Trotz des geringen Rückgangs der Anzahl immunpositiver Neuronen zum Zeitpunkt 24h war deren Anteil an der Gesamtzahl also weiter angestiegen.

### **3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Bradykinin-Produktion und Expression von Kinin Rezeptoren nach Ischämie**

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Komponenten des Kallikrein-Kinin Systems nach transientser fokaler zerebraler Ischämie im betroffenen Gehirn zunahmen. So stieg die Produktion von Bradykinin im Hirngewebe auf das über 3-fache an. Außerdem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in allen Neuronen nach Ischämie in einem von der Schwere der Schädigung, die wahrscheinlich in erster Linie durch ihre individuelle Vulnerabilität und den lokalen Grad der Hypoperfusion bestimmt wird, abhängigem zeitlichen und quantitativen Muster die Kinin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Rezeptoren hochreguliert werden. Die maximale Hochregulation der mRNA der Kinin Rezeptoren fand sich im Core des Infarktes 48 Stunden nach MCAO mit einem Anstieg der B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA auf das 5-fache und der B<sub>2</sub> Rezeptor mRNA auf das 23-fache. Die Maximalwerte in der Penumbra wurden früher, nämlich bereits 24 Stunden nach Ischämie, erreicht. Auch hier wurde der B<sub>2</sub> stärker als der B<sub>1</sub> Rezeptor hochreguliert (13-fach und 6-fach). Betrachtete man den Infarkt als Gesamtheit ohne Differenzierung in Core und Penumbra, so zeigte sich für beide Rezeptoren ein Maximum der Expression 24 Stunden nach Ischämie (B<sub>1</sub>: 5-fach; B<sub>2</sub>: 17-fach). Auf Proteinebene – analysiert durch Immunhistochemie – zeigte sich ein leicht anderes Bild. Hier wurde die stärkste Expression – bestimmt als die Anzahl immunpositiver Neuronen – sowohl des B<sub>1</sub> als auch des B<sub>2</sub> Rezeptors in Core und Penumbra jeweils zum Zeitpunkt 8h beobachtet. Auch in der Immunhistochemie zeigte sich eine stärkere Hochregulierung der Expression des B<sub>2</sub> (17-fach und 9-fach) als des B<sub>1</sub> Rezeptors (7-fach und 5-fach). Im Gesamtinfarkt – Core und Penumbra zusammen genommen – stieg die Anzahl B<sub>1</sub> Rezeptor immunpositiver Neuronen um das 6-fache, die B<sub>2</sub> Rezeptor immunpositiver um das 13-fache. Die beobachtete verstärkte Produktion von Bradykinin und die Hochregulation seines Rezeptors B<sub>2</sub> wie auch die des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors weisen darauf hin, dass das Kallikrein-Kinin System allgemein und Bradykinin und sein Rezeptor im Besonderen eine Rolle bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie spielen könnten.

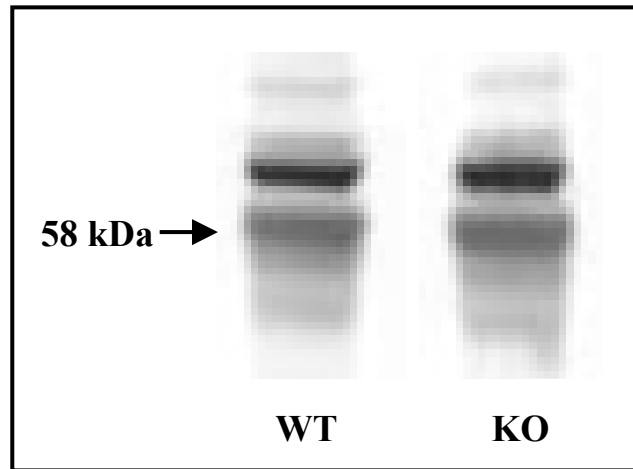
## **3.2 Charakterisierung von B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen und ihren Kontrollen C57/Bl6 hinsichtlich versuchsrelevanter Parameter**

Unterschiede zwischen verschiedenen Mäusestämmen oder sogar zwischen unterschiedlichen Kolonien des selben Stammes können zu Veränderungen der untersuchten Parameter führen. Es war uns aus technischen Gründen nicht möglich, für unsere Versuche mit B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen Geschwistertiere als Kontrollen zu verwenden. Stattdessen dienten uns C57Bl/6 Mäuse, auf die die B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse 8 Generationen zurück gekreuzt worden waren, als Kontrollen. Wenn man die Ergebnisse, die in unterschiedlichen Tierpopulationen erhoben wurden, direkt vergleichen will, muss versucht werden auszuschließen, dass ein intrinsischer Störfaktor in einer der zu vergleichenden Gruppen zu einem systematischen Fehler führt. Daher charakterisierten wir die B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse und ihre wildtyp Kontrollen hinsichtlich einiger Parameter, die in unserem Modell die Ergebnisse nach transientser fokaler zerebraler Ischämie beeinflussen können, und verglichen die Gruppen miteinander.

### **3.2.1 Bradykinin Konzentration in Blut und Gehirn**

In B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> und C57/Bl6 Mäusen (n=5) wurde die Konzentration von Bradykinin im Blut und in beiden Hemisphären des Gehirns mittels RIA bestimmt. Im gesunden Hirngewebe – beide Hemisphären zusammen genommen – der knockout Mäuse betrug die Bradykinin Konzentration  $2,2 \pm 1,1 \text{ fmol/g}$ , in dem der C57/Bl6 wildtyp Kontrollen  $3,1 \pm 1,6 \text{ fmol/g}$ . Im Blut maßen wir Konzentrationen von  $5,5 \pm 3,5 \text{ fmol/g}$  in den B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen und  $1,8 \pm 0,6 \text{ fmol/g}$  in den wildtyp Tieren. Dieser deutliche Unterschied einer dreifach höheren Blutkonzentration von Bradykinin in den knockout Mäusen war statistisch jedoch nicht signifikant.

### 3.2.2 Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors



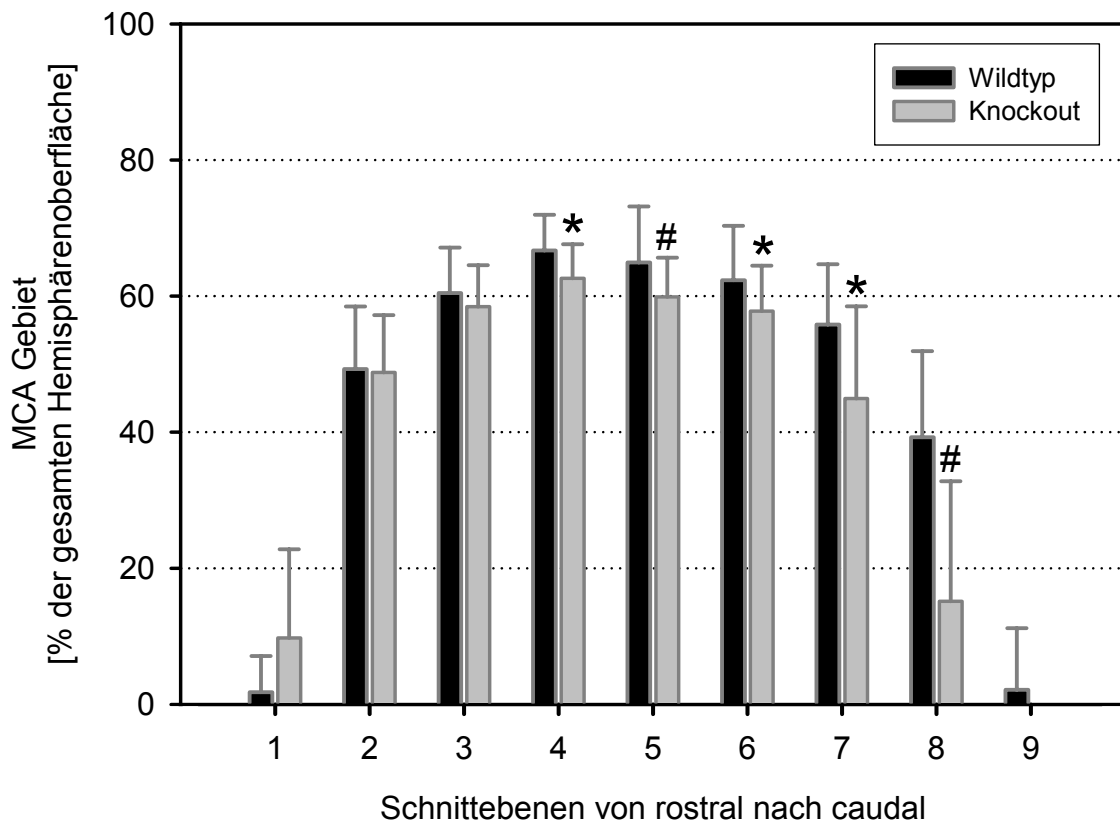
**Abbildung 21:** Die Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors wurde in Hirnlysaten von B<sub>2</sub><sup>+/+</sup> wildtyp (WT) und B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> knockout (KO) Mäusen im Western Blot untersucht. Der B<sub>1</sub> Rezeptor, ein 58 kDa Protein, wurde in den Gehirnen beider Gruppen ähnlich stark exprimiert. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin (hier nicht gezeigt).

Da das Fehlen des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors in den B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen zu einer veränderten Expression des B<sub>1</sub> Rezeptors – z.B. zur Kompensation des Fehlens des B<sub>2</sub> Rezeptors – geführt haben könnte, untersuchten wir in Hirnlysaten die Expression dieses Rezeptors, der ein 58kDa Protein ist, mit Western Blot. Wir konnten keinen Unterschied in der Stärke der 58kDa Banden zwischen knockout und wildtyp Mäusen sehen. Der B<sub>1</sub> Rezeptor wurde also in den Gehirnen beider Gruppen ähnlich stark exprimiert.

### 3.2.3 Gefäßanatomie

Ein weiterer sehr wichtiger potentieller Störfaktor ist die Gefäßanatomie. Da das Ausmaß des Infarktes und dessen Folgen unmittelbar von den vaskulären anatomischen Gegebenheiten abhängen, untersuchten wir die Größe des durch die A. cerebri media versorgten Kortex und die Ausbildung der A. communicans posterior, über die in unserem Modell während der Ischämiephase die Blutversorgung des Versorgungsgebiets der A. cerebri posterior sichergestellt wurde.

### 3.2.3.1 Größe des Versorgungsgebiets der Arteria cerebri media



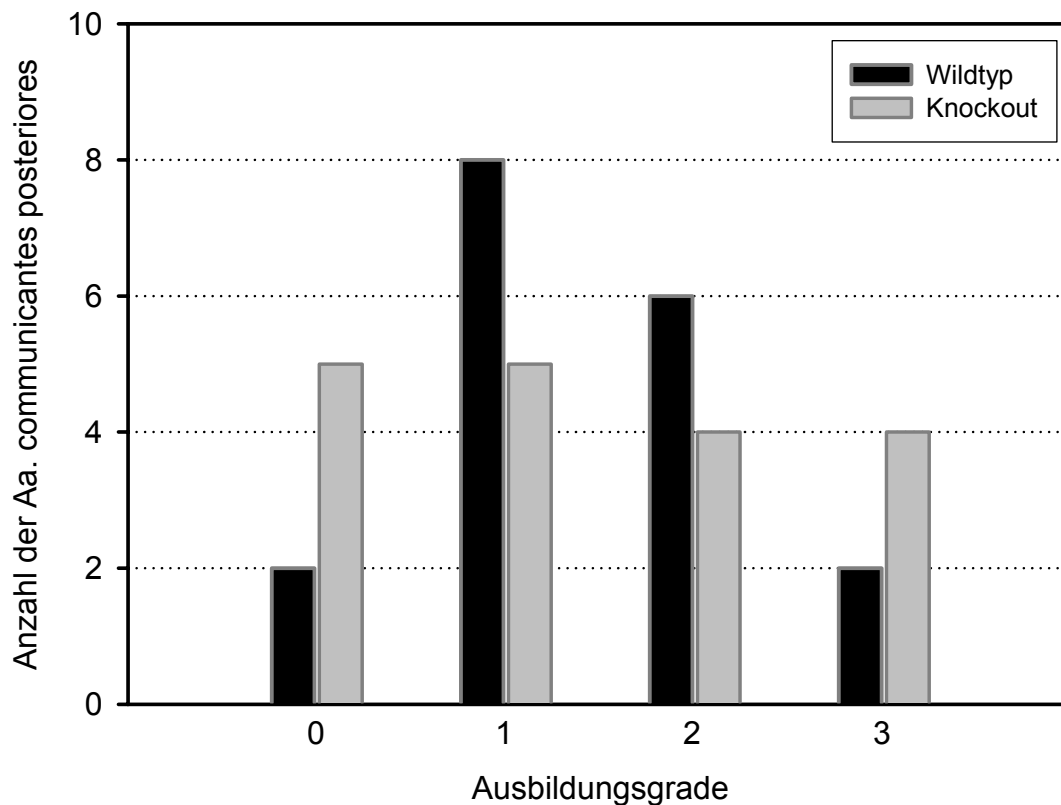
**Abbildung 22:** Nach Perfusion mit Tusche und Abfotografieren der Hirnoberfläche wurde am Computer in wildtyp und knockout Tieren ( $n=9$  pro Gruppe) der Anteil des Versorgungsgebiets der A. cerebri media (MCA) an der Hemisphärenoberfläche in 9 senkrecht zum Interhemisphärenspalt gelegten Ebenen bestimmt. Der Anteil der MCA an der Versorgung der vermessenen Hirnoberfläche war in der knockout Gruppe in den Schnittebenen 4 bis 8 signifikant kleiner als in der wildtyp Gruppe (MW $\pm$ SD; \* $p<0,05$  und # $p<0,01$ ).

Da die Infarktgröße unmittelbar von der Größe des Gebietes abhängt, das von dem verschlossenen Gefäß versorgt wird, bestimmten wir an mit Tusche perfundierten Gehirnen in 9 koronaren Schnittebenen den Anteil des von der A. cerebri media versorgten Kortex an der in der Aufsicht zu sehenden Hirnoberfläche.

Dieser Anteil war in den Ebenen 4 bis 8 in der knockout Gruppe signifikant kleiner als in der wildtyp Gruppe. Unter diesen signifikanten Unterschieden war mit einer Differenz von 4% der geringste der in Ebene 4 (wildtyp 67%, knockout 63%) und mit einer Differenz von 24% der größte der in Ebene 8 (wildtyp 39%, knockout 15%). Der durchschnittliche Anteil über alle Ebenen betrug in der wildtyp Gruppe 45 $\pm$ 5% und in der knockout Gruppe 40 $\pm$ 5%\* (MW $\pm$ SD; \* $p<0,05$ ). Die Differenz von 5% zwischen diesen beiden Werten ist statistisch signifikant, sodass man davon ausgehen muss, dass der von der A. cerebri media versorgte Anteil des Kortex bei den knockout Mäuse etwas kleiner ist als bei ihren wildtyp Kontrollen.

Da die Untersuchung lediglich im Zweidimensionalen stattfand, muss man, um abschätzen zu können, welche Auswirkung der beobachtete Unterschied zwischen den beiden Stämmen auf das Infarktvolumen haben könnte, eine mathematische Modellrechnung zu Hilfe nehmen, die diese zweidimensionalen Daten in dreidimensionale überträgt. Das Versorgungsgebiet der A. cerebri media, wenn man es in eine einfache geometrische Form bringen will, entspricht am ehesten einem Kugelsektor. Das Volumen des Kugelsektors errechnet sich als  $V = \frac{2}{3} r^2 \pi h$ . Da die Höhe h der Breite des MCA-Versorgungsgebiets entspricht, schlägt sich die Differenz von 5% in dieser Breite – was einer Verkleinerung in den knockout Mäusen verglichen mit den wildtyp Kontrollen (40% vs. 45%) um 11% entspricht ( $h_{\text{knockout}} = 0,89 * h_{\text{wildtyp}}$ ) – in einer Verkleinerung des Kugelsektorvolumens um ebenfalls 11% nieder. Somit ließe sich ein in der knockout Gruppe um ca. 10% kleineres Infarktvolumen mit dem beschriebenen Unterschied in der Größe des Versorgungsgebietes der A. cerebri media begründen und wäre nicht unbedingt auf die Deletion des B<sub>2</sub> Rezeptor Gens zurückzuführen.

### 3.2.3.2 Ausbildung der Arteria communicans posterior



**Abbildung 23:** Nach Perfusion mit Tusche und Abfotografieren der Hirnunterfläche wurde in wildtyp und knockout Tieren (n=9 pro Gruppe) die Ausbildung der Aa. communicantes posteriores mit 0



*(nicht ausgebildet) bis 3 (sehr stark ausgebildet) bewertet. Dargestellt ist die Verteilung der pro Gruppe je 18 beurteilten Aa. communicantes posteriores auf die unterschiedlichen Ausbildungsgrade.*

In dem verwendeten Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie verlegt der intraluminale Faden nicht nur den Abgang der A. cerebri media sondern auch den der A. cerebri posterior, die bei der Maus aus der A. carotis interna entspringt. Da es folglich von der Ausbildung der A. communicans posterior abhängt, ob zusätzlich zum Mediainfarkt auch das Versorgungsgebiet der A. cerebri posterior infarziert, analysierten wir die Ausbildung der A. communicans posterior an mit Tusche perfundierten Gehirnen. Dabei wurde die Plastizität der A. communicans posterior einem Ausbildungsgrad von 0 bis 3 zugeordnet.

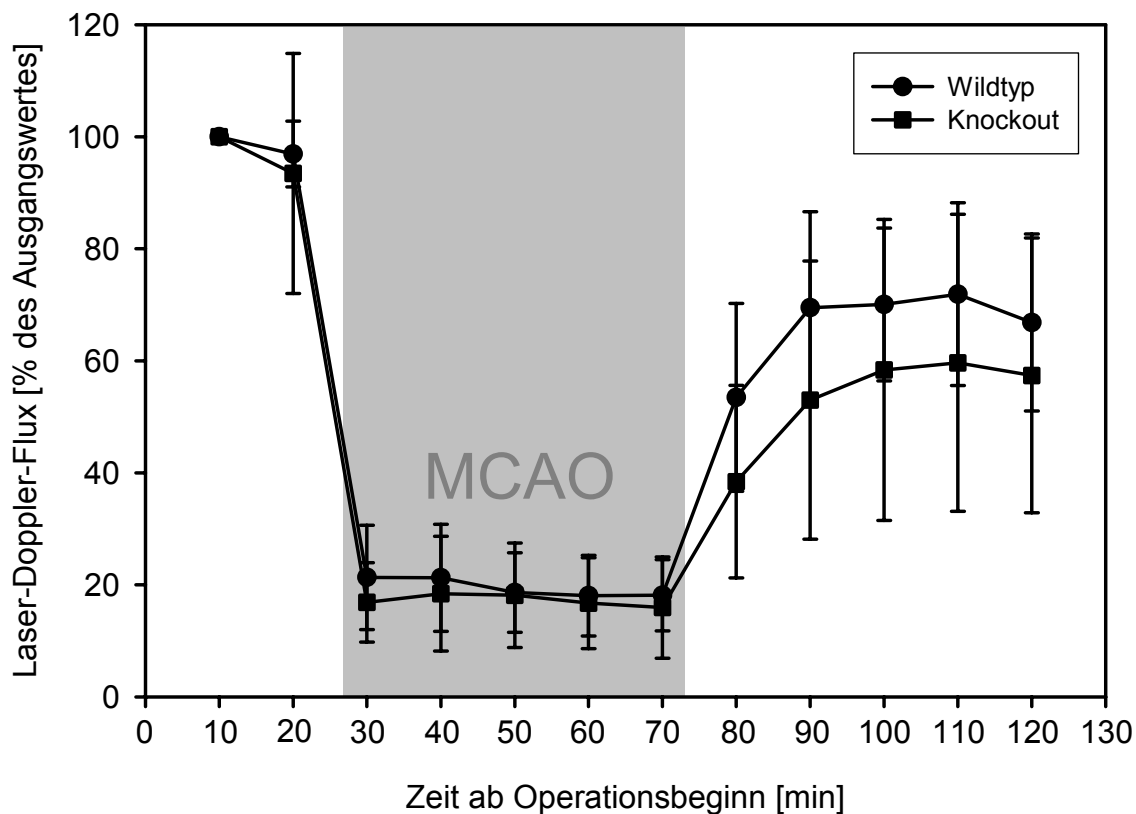
Der mittlere Ausbildungsgrad war in der wildtyp Gruppe  $1,44 \pm 0,86$ , in der knockout Gruppe  $1,39 \pm 1,15$  (MW $\pm$ SD) und somit in beiden Gruppen gleich. Wenn man die Ausbildungsgrade 0 und 1 als „hypoplastisch“ und die Grade 2 und 3 als „normal“ zusammenfasst, so waren in wildtyp wie knockout Mäusen 56% der Aa. communicantes posteriores hypoplastisch und 44% normal. Es zeigte sich also kein Unterschied in der Ausbildung der A. communicans posterior zwischen den beiden Gruppen, wenngleich die Variabilität bei den knockout Mäusen insgesamt etwas höher war.

### **3.2.4 Lokale Hirndurchblutung**

Nachdem wir die zerebrale Gefäßanatomie als quasi statischen Faktor der Hirndurchblutung analysiert hatten, untersuchten wir als nächstes ihre Dynamik in unserem Modell. Hierfür maßen wir die lokale Hirndurchblutung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media mittels Laser-Doppler Fluxmetrie vor, während und nach Ischämie.

Der Schweregrad der Ischämie im Zentrum des MCA-Versorgungsgebietes war in der wildtyp und der knockout Gruppe gleich. So betrug dort die lokale Hirndurchblutung in der Ischämiephase in wildtyp Mäusen im Mittel 19% und in knockout Mäusen 17% des Ausgangswertes.

Auch die Qualität der Reperfusion, also das Ausmaß der Wiederdurchblutung nach Beendigung der Gefäßokklusion, war in beiden Gruppen vergleichbar. Die regionale Hirndurchblutung erholte sich langsam aber kontinuierlich, erreichte ca. 35 Minuten nach Ischämie ihr Maximum und nahm anschließend wieder leicht ab. Dieses Maximum war in der wildtyp Gruppe mit 72% des Ausgangswertes etwas höher als in der knockout Gruppe mit 60%. Die Unterschiede in der Durchblutung waren jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.



**Abbildung 24:** Vor, während und nach Ischämie wurde die lokale Hirndurchblutung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media in wildtyp ( $n=5$ ) und knockout ( $n=4$  wegen einer fehlerhaften Aufzeichnung) Mäusen mit Laser-Doppler Fluxmetrie gemessen. Jeder Messzeitpunkt entspricht einem Messintervall von 4min Dauer. Dargestellt ist die Durchblutung in Prozent des Ausgangswertes ( $MW \pm SD$ ). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, weder in der Ischämie- (grau hinterlegt) noch in der Reperfusionphase.

### 3.2.5 Physiologische Parameter

Da auch einige physiologische Parameter die Ausbildung des Infarktes beeinflussen können, indem sie direkte Auswirkungen auf die lokale Hämodynamik haben, maßen wir in wildtyp und knockout Mäusen kontinuierlich den Blutdruck über einen Katheter in der A. carotis communis und entnahmen arterielle Blutproben vor, während und nach Ischämie, in denen wir die Blutgase sowie den pH und die Konzentration von Glukose und Laktat bestimmten.

Keine Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich im Blutdruck, sowie dem Sauerstoff- und dem Kohlendioxidpartialdruck. Der arterielle Mitteldruck bewegte sich um die 80mmHg und nahm mit der Zeit in beiden Gruppen leicht ab (WT  $-8,2\text{mmHg}$ ,  $B_2^{-/-}$   $-3,8\text{mmHg}$ ). Diese tendenzielle Abnahme des Blutdrucks wie auch die beobachtete leichte

Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks (WT -14,3mmHg, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> -22,2mmHg) und Zunahme des Kohlendioxidpartialdrucks (WT +8,9mmHg, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> +4,4mmHg) über die Zeit sind mit der andauernden Applikation des volatilen Anästhetikums Halothan, das zu Atem- und Kreislaufdepression führen kann, zu erklären.

Die knockout Mäuse hatten verglichen mit den wildtyp Mäusen vor, während wie auch nach Ischämie einen um ca. 50mg/dl höheren Blutzuckerspiegel. Dieser Unterschied war jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Auch die Laktatkonzentration war im Blut der knockout Mäuse höher – nach Ischämie sogar signifikant doppelt so hoch.

Der pH des Blutes war in der knockout Gruppe im Durchschnitt um 0,06 niedriger als in der wildtyp Gruppe. Der Unterschied war sowohl vor als auch nach Ischämie signifikant. Der pH fiel in beiden Versuchsstämmen über die Zeit in Narkose ab (WT -0,07, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> -0,05) und die Tiere entwickelten eine leichte kombiniert metabolisch-respiratorische Azidose.

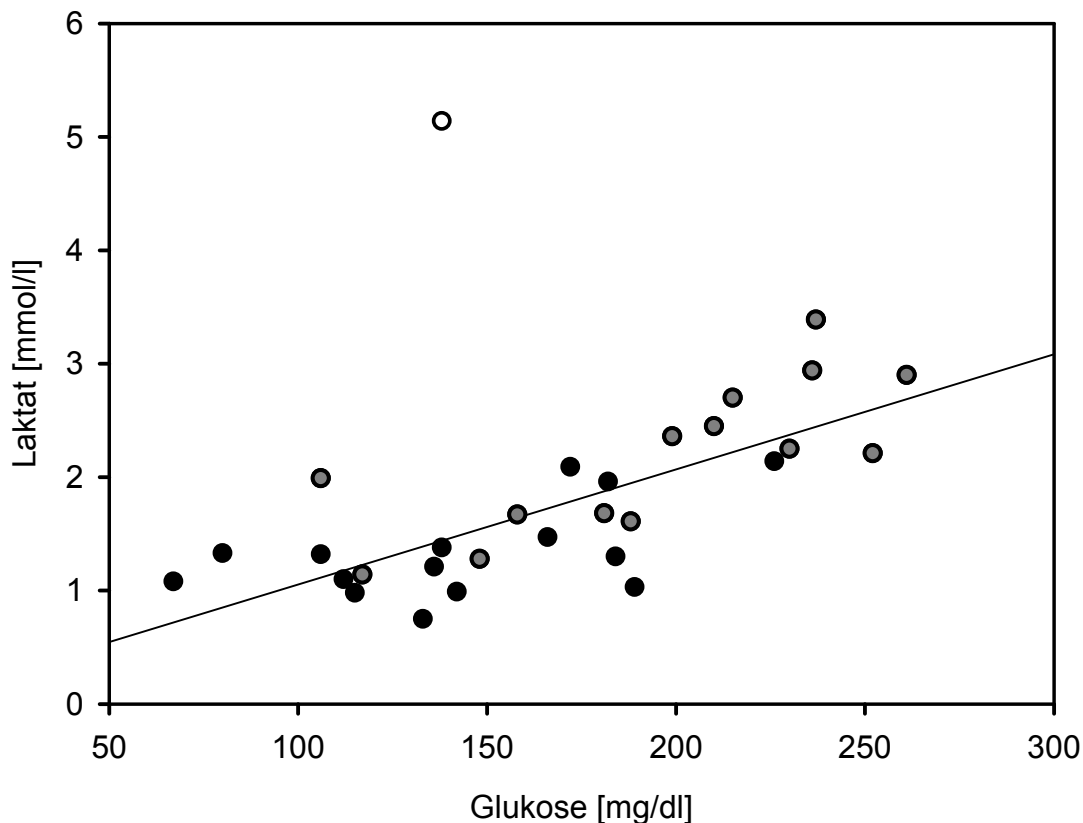
	vor Ischämie		während Ischämie		nach Ischämie	
	Wildtyp	Knockout	Wildtyp	Knockout	Wildtyp	Knockout
MAP [mmHg]	84.0±7.4	80.0±9.3	82.3±10.2	77.8±8.3	75.8±9.9	76.2±7.4
pH	7.36±0.05	7.28±0.05 **	7.30±0.04	7.26±0.03	7.29±0.04	7.23±0.01 *
PCO <sub>2</sub> [mmHg]	37.4±5.3	41.7±6.7	45.2±3.2	40.9±7.8	46.3±3.9	46.5±1.6
PO <sub>2</sub> [mmHg]	154.4±18.3	156.0±14.7	145.1±7.7	144.4±12.0	140.1±11.0	133.8±12.2
Glukose [mg/dl]	157±47	194±41	136±47	189±45	136±43	204±62
Laktat [mmol/l]	1,60±0,42	2,19±0,80	1,29±0,47	2,05±0,80	1,14±0,28	2,28±0,52 *

**Tabelle 3:** Die physiologischen Parameter MAP, pH, PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, Glukose und Laktat wurden in wildtyp und knockout Mäusen (n=5 pro Gruppe) vor, während und nach Ischämie in der A. carotis communis gemessen und sind hier als MW±SD dargestellt. Der pH war in der knockout verglichen mit der wildtyp Gruppe vor (\*\*p<0,05) und nach (\*p<0,01) Ischämie signifikant niedriger, die Laktatkonzentration nach Ischämie signifikant höher (\*p<0,01). Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Blutzuckerpiegel und der höheren Laktatkonzentration – und somit auch dem erniedrigten pH – bei den

knockout Mäusen besteht, korrelierten wir die untersuchten Parameter miteinander und stellten sie als lineare Regression dar.

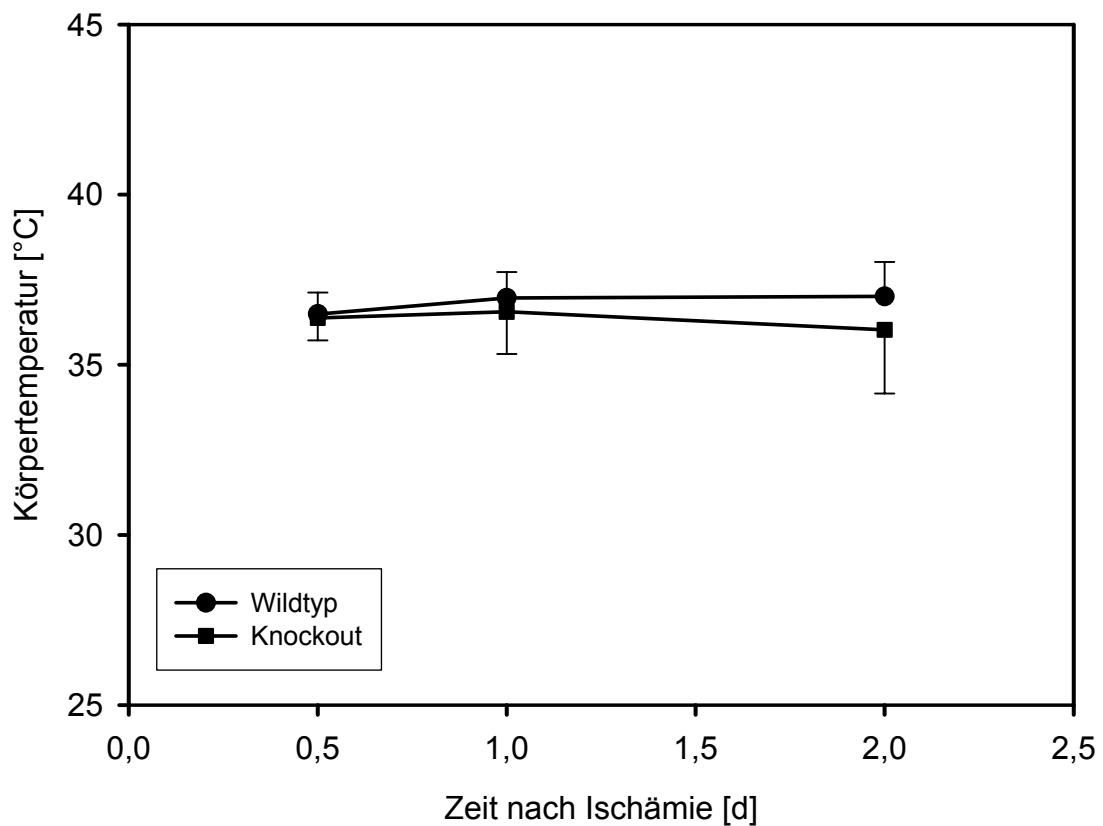
Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Glukose- und Laktatkonzentration, der sich mit der Regressionsgleichung  $[Laktat] = 0.0393 + (0,0101 \times [Glukose])$  ausdrücken lässt. Der Regressionskoeffizient war  $R=0,773$ , die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p<0,001$ . Die Korrelation von Glukose- und Laktatkonzentration ergab einen Korrelationskoeffizienten  $K=0,748$  mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,001$ .



**Abbildung 25:** Die Glukose- und Laktatkonzentration wurde im arteriellen Blut von wildtyp (schwarz) und knockout (grau) Mäusen ( $n=5$  pro Gruppe) vor, während und nach Ischämie bestimmt. Hier ist die Glukose- gegen die Laktatkonzentration der Einzelmessungen aufgetragen. Für die Erstellung der Regressionsgeraden wurde der Ausreißer (leer) nicht berücksichtigt. Aus der Glukosekonzentration ließ sich die Laktatkonzentration vorhersagen ( $R=0,773$ ;  $p<0,001$ ).

### 3.2.6 Körpertemperatur

Da die Temperatur einen wichtigen Einfluss auf die Ausbildung des sekundären Hirnschadens haben kann, bestimmten wir 12 Stunden sowie 1 und 2 Tage nach Ischämie die rektale Körpertemperatur von wildtyp und knockout Mäusen.



**Abbildung 26:** 12, 24 und 48 Stunden nach Ischämie wurde die Körpertemperatur von wildtyp ( $n=9$ , da ein Tier während der Messreihe verendete) und knockout ( $n=10$ ) Mäusen rektal gemessen, und ist hier als  $MW \pm SD$  dargestellt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Der Mittelwert lag zu jedem Messzeitpunkt in beiden Gruppen im physiologischen Bereich zwischen  $36,0^{\circ}\text{C}$  und  $37,0^{\circ}\text{C}$ . Nach den ersten 12 Stunden zeigte sich kein Unterschied zwischen der wildtyp und der knockout Gruppe ( $36,5 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  vs.  $36,4 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ ). Weitere 12 Stunden später fand sich ein leichter, aber nicht signifikanter Unterschied von  $0,4^{\circ}\text{C}$  ( $37,0 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  vs.  $36,6 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ ). Zum Messzeitpunkt 2d hatten die knockout Mäuse im Durchschnitt eine um  $1,0^{\circ}\text{C}$  niedrigere Körpertemperatur ( $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  vs.  $36,0 \pm 1,9^{\circ}\text{C}$ ) – dieser moderate Unterschied war jedoch nicht signifikant.

### **3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung von B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen und ihren Kontrollen C57/Bl6**

Um auszuschließen, dass andere Unterschiede zwischen den B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen und ihren wildtyp Kontrollen C57/Bl6 als das Fehlen des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für Differenzen in der Ausbildung des sekundären Hirnschadens nach transienter fokaler zerebraler Ischämie in unserer Studie verantwortlich sind, charakterisierten und verglichen wir die beiden Mäusestämme hinsichtlich einiger Parameter, die in unserem Modell potentielle Störgrößen darstellten.

Zunächst untersuchten wir quantitativ Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems im Gehirn von Mäusen beider Stämme, da eine kompensatorische Hochregulation nach Deletion des B<sub>2</sub> Rezeptor Gens möglich erschien. Wir konnten jedoch weder in der Konzentration von Bradykinin noch in der Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors im normalen zerebralen Gewebe einen Unterschied finden.

Als nächstes analysierten wir die zerebrovaskuläre Anatomie in beiden Stämmen, da Differenzen in der Gefäßversorgung natürlich unmittelbaren Einfluss auf die Infarktbildung hätten. Das Versorgungsgebiet der A. cerebri media, also das Gewebe, das in unserem Modell ischämisch geschädigt werden sollte, war bei den knockout Mäusen etwas kleiner als in ihren wildtyp Kontrollen. Dies könnte dazu führen, dass sich in diesen Tieren unabhängig von der Deletion des B<sub>2</sub> Rezeptors laut mathematischen Modells um ca. 10% kleinere Infarkte entwickeln. Die A. communicans posterior, deren Plastizität für die Perfusion der A. cerebri posterior während der Ischämiezeit verantwortlich ist, war in beiden Gruppen in gleichem Maße ausgebildet, sodass die caudale Ausdehnung des durch den Okklusionsfaden von der Blutversorgung abgeschnittenen Gewebes gleich sein sollte.

Nach dieser Betrachtung der statischen zerebralen Durchblutungsbedingungen untersuchten wir die dynamischen Durchblutungsbedingungen in unserem Modell in beiden Mäusestämmen, indem wir mit Laser-Doppler Fluxmetrie die lokale Hirndurchblutung im Zentrum des MCA-Versorgungsgebiets maßen. Weder in der Tiefe der Ischämie noch im Grad der Reperfusion unterschieden sich die beiden Gruppen.

Des weiteren maßen wir in beiden Stämmen den arteriellen Blutdruck, der über seinen Einfluss auf den zerebralen Perfusionsdruck die Infarktentstehung beeinflussen kann, sowie die arteriellen Blutgase (Einfluss auf zerebrale Perfusionsregulation und Oxygenierung), Glukose und Laktat. Bei arteriellem Mitteldruck und Blutgasen fanden sich keine Unterschiede. Die knockout Mäuse hatten jedoch einen tendenziell höheren Blutzuckerspiegel

und eine signifikant höhere Blutlaktatkonzentration, was zu einer Laktazidose führte. Ein neuroprotektiver Einfluss dieser systemischen Laktazidose ist jedoch äußerst unwahrscheinlich.

Da Hypothermie einen stark neuroprotektiven Effekt hat, maßen wir schließlich noch die Körpertemperatur der Mäuse beider Stämme bis 2 Tage nach Ischämie. Wir konnten keinen Unterschied in der Körpertemperatur finden.

All diese Ergebnisse zusammengenommen, sind wir der Ansicht, dass es sich bei den Mäusen des Stammes C57/Bl6 um valide Kontrolltiere für die B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse handelt. Es ist nicht damit zu rechnen, dass Untersuchungen über die Auswirkung des Fehlens des B<sub>2</sub> Rezeptors auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens in unserem Modell durch intrinsische Störgrößen, die sich aus Unterschieden zwischen den Stämmen ergeben, in erheblichem Maße beeinflusst werden.

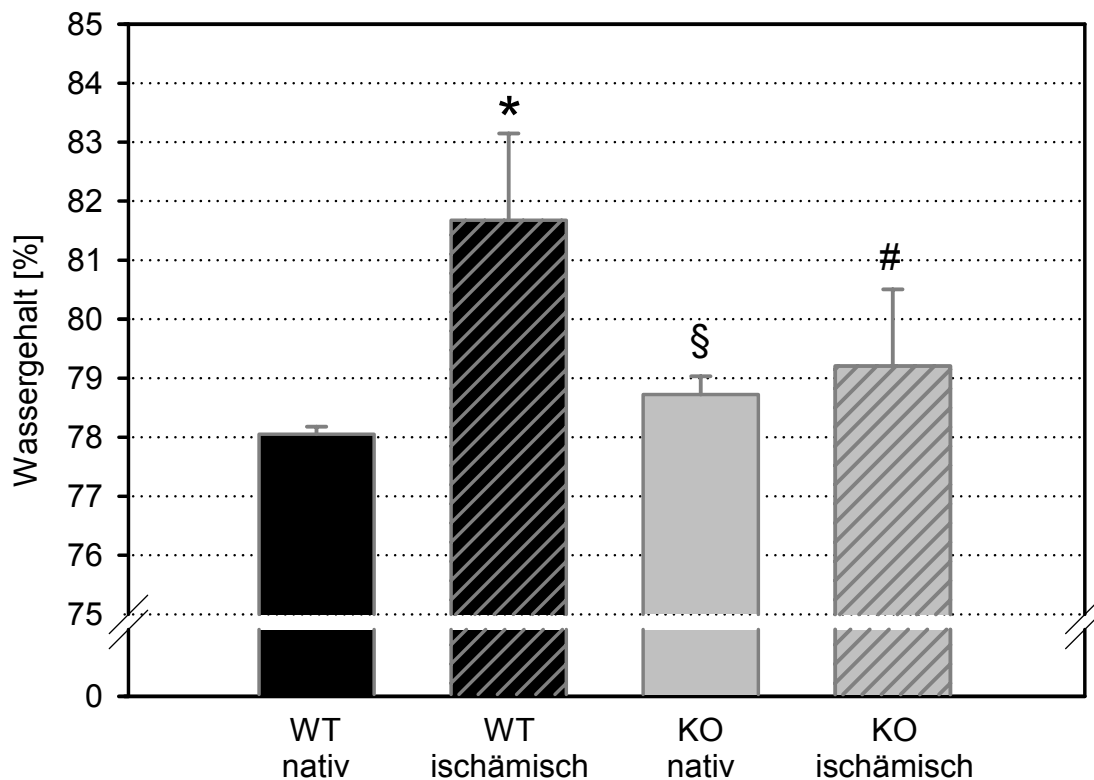
### **3.3 Bedeutung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Pathologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie**

Nachdem wir sichergestellt hatten, dass es sich bei den C57Bl/6 Mäusen um valide wildtyp Kontrollen für unsere B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse handelte, wir also die Versuchsergebnisse beider Stämme direkt einander gegenüber stellen konnten, untersuchten wir die Auswirkung des Fehlens des B<sub>2</sub> Rezeptors auf die Entwicklung des Hirnödems, des Infarktolumens, der motorischen Funktion, der Mortalität und des Körpergewichts nach 45minütiger Okklusion der A. cerebri media.

#### **3.3.1 Hirnödem**

Da eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität führen kann, ermittelten wir 24 Stunden nach Ischämie das Hirnödem durch gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehalts bzw. histomorphometrische Errechnung der Hemisphärenschwellung. Des weiteren versuchten wir, anhand unserer histomorphometrischen Daten, die örtliche Verteilung des Ödems zu bestimmen.

### 3.3.1.1 Hirnwassergehalt von ipsi- und kontralateraler Hemisphäre



**Abbildung 27:** Der Hirnwassergehalt wurde in wildtyp und knockout Mäusen unter normalen Bedingungen sowie 24h nach Ischämie (n=4 pro Gruppe) gravimetrisch ermittelt. Hier dargestellt ist der Wassergehalt der ipsilateralen Hemisphäre in  $MW \pm SD$ . Unter basalen Bedingungen hatten die knockout verglichen mit den wildtyp Mäusen einen signifikant (§ $p < 0,01$ ) um 0,6% höheren Wassergehalt. 24h nach Ischämie war der Hirnwassergehalt in der wildtyp Gruppe signifikant (\* $p < 0,01$ ) um 3,6%, in der knockout Gruppe um 0,5% angestiegen. Damit hatten die knockout Mäuse zum Zeitpunkt 24h nach Ischämie einen signifikant (# $p < 0,05$  vs. WT ischämisch) geringeren Hirnwassergehalt.

Da das Hirnödem einer Zunahme des Hirnvolumens entspricht, die in erster Linie durch eine Zunahme des Wassergehalts hervorgerufen wird, bestimmten wir unter Normalbedingungen und 24 Stunden nach Ischämie in der ischämischen wie der kontralateralen Hemisphäre von wildtyp und knockout Mäusen den Wassergehalt als die Differenz von Feucht- und Trockengewicht.

Während der basale Wassergehalt in den beiden Hemisphären der wildtyp Mäuse im Mittel  $78,1 \pm 0,1\%$  bzw.  $78,1 \pm 0,2\%$  betrug, war er in den knockout Mäusen mit  $78,7 \pm 0,3\%$  und  $78,6 \pm 0,1\%$  um signifikante 0,6% bzw. 0,5% höher.

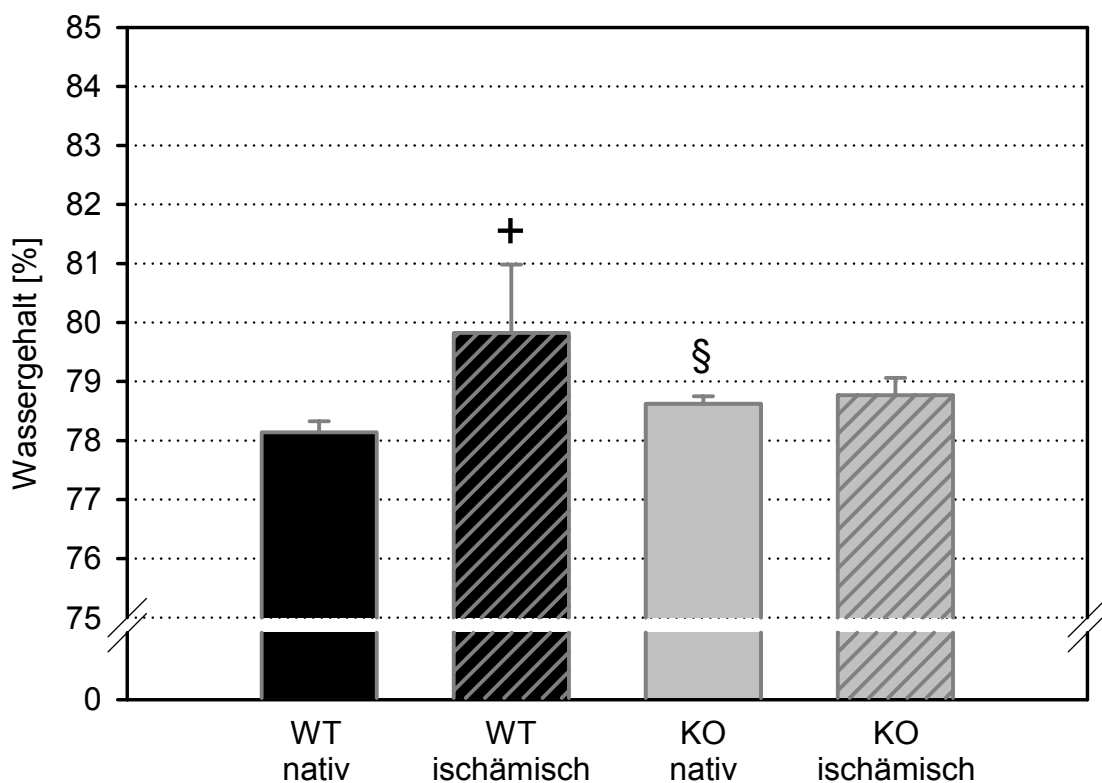
24 Stunden nach Ischämie war der Wassergehalt in der wildtyp Gruppe in der ischämischen, linken Hemisphäre auf  $81,7 \pm 1,5\%$  und in der kontralateralen, rechten Hemisphäre auf  $79,8 \pm 1,2\%$  angestiegen. Der Wassergehalt hatte somit um absolute 3,6 bzw.



1,7 Prozentpunkte zugenommen, was einer relativen Zunahme vom Ausgangswert um 4,6% bzw. 2,2% entspricht.

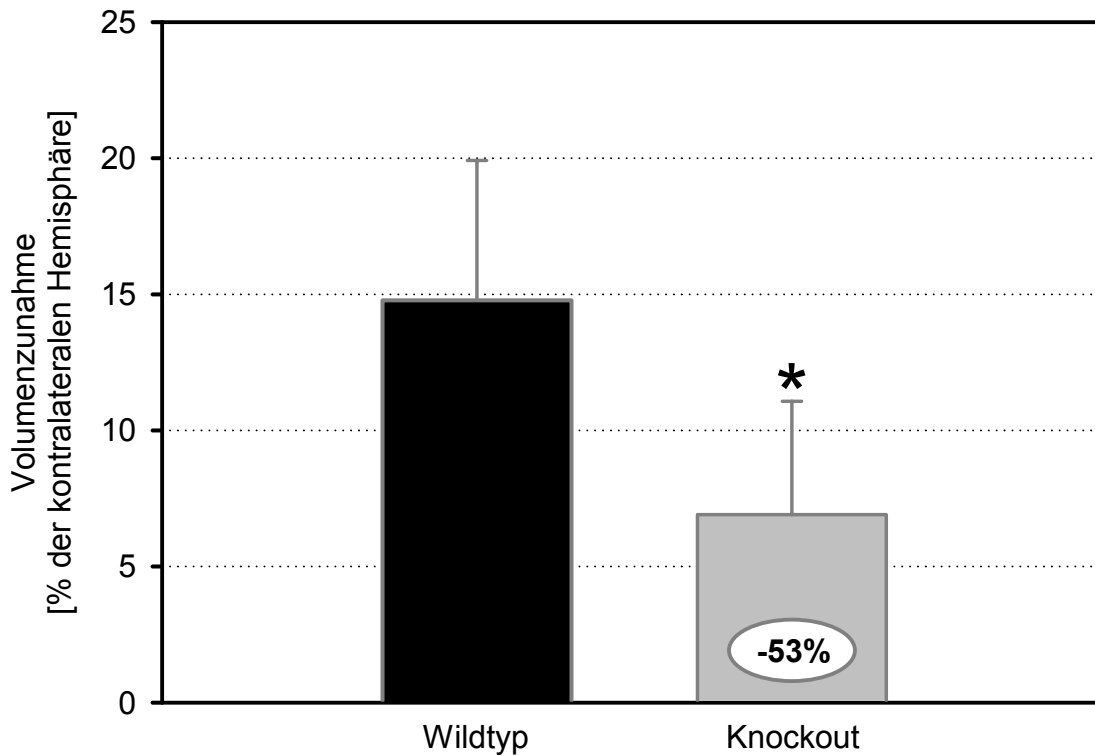
Zum selben Zeitpunkt nach Ischämie war der Wassergehalt in der knockout Gruppe nur auf  $79,2 \pm 1,3\%$  ipsilateral und  $78,8 \pm 0,3\%$  kontralateral angestiegen, was einem Zuwachs in absoluten Werten von 0,5 bzw. 0,2 Prozentpunkten entspricht. Relativ zum Ausgangswert nahm der Hirnwassergehalt somit um 0,6% bzw. 0,3% zu.

Es zeigte sich also, dass der Hirnwassergehalt bei einem höheren Ausgangswert in der knockout Gruppe in beiden Versuchsgruppen 24 Stunden nach Ischämie zugenommen hatte, wobei die Zunahme in der ipsilateralen Hemisphäre etwa doppelt so stark war wie in der kontralateralen Hemisphäre. Im Vergleich der beiden Gruppen sahen wir in den knockout Tieren in beiden Hemisphären eine signifikant ( $p < 0,03$ ) um 87% geringere Zunahme des Wassergehalts.



**Abbildung 28:** Der hier in  $MW \pm SD$  dargestellte Wassergehalt der kontralateralen Hemisphäre wurde in wildtyp und knockout Mäusen unter normalen Bedingungen sowie 24h nach Ischämie ( $n=4$  pro Gruppe) gravimetrisch ermittelt. Unter basalen Bedingungen hatten die Gehirne der knockout verglichen mit denen der wildtyp Mäuse einen signifikant ( $^{\$}p < 0,01$ ) um 0,5% höheren Wassergehalt. 24h nach Ischämie war der Hirnwassergehalt in der wildtyp Gruppe signifikant ( $^{+}p < 0,05$ ) um 1,7%, in der knockout Gruppe um 0,2% angestiegen. Der Unterschied im Hirnwassergehalt zwischen den beiden Gruppen war zum Zeitpunkt 24h nach Ischämie nicht signifikant.

### 3.3.1.2 Schwellung der ischämischen Hemisphäre



**Abbildung 29:** Die Hemisphärenschwellung wurde histomorphometrisch als die Differenz zwischen den Volumina der beiden Hemisphären 24h nach Ischämie ermittelt und ist hier als  $MW \pm SD$  von  $n=7$  Tieren pro Gruppe ausgedrückt in Prozent der kontralateralen Hemisphäre dargestellt. Die Zunahme des ipsilateralen Hemisphärenvolumens war in der knockout Gruppe signifikant ( $*p < 0,05$ ) um 53% geringer.

Da sich die Bildung eines Hirnödems nach Ischämie in einer Zunahme des Hirnvolumens äußert, ermittelten wir diese Schwellung der infarzierten Hemisphäre 24 Stunden nach Ischämie histomorphometrisch als Differenz der Volumina beider Hemisphären und drückten sie in Prozent der kontralateralen Hemisphäre aus.

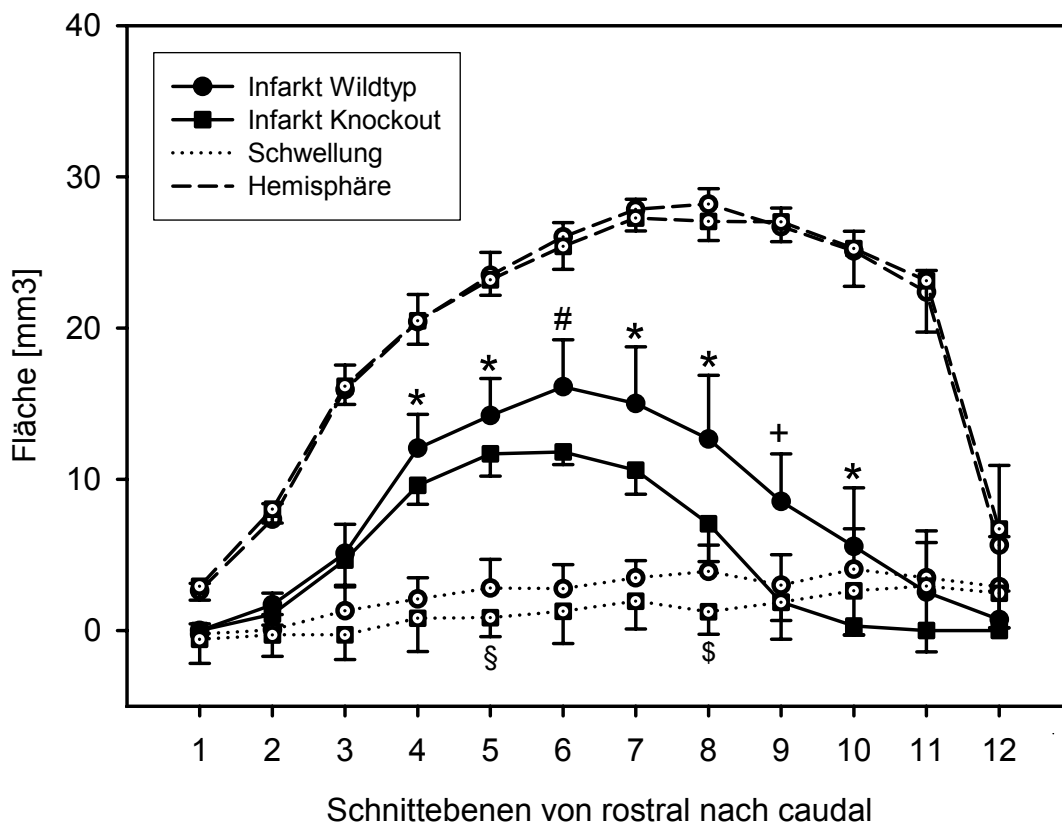
Während in der Kontrollgruppe die Hemisphärenschwellung 15% betrug, war sie in der knockout Gruppe mit 7% deutlich geringer ausgeprägt. Dieser Unterschied in der Hemisphärenschwellung von 8% entspricht einer Reduktion der Volumenzunahme in der knockout Gruppe um signifikante 53%.

### 3.3.1.3 Räumliche Verteilung von Infarkt und Schwellung innerhalb der Hemisphäre

Je größer der Infarkt, desto größer die Schwellung. Was auf den ersten Blick logisch erschien, ließ sich auch statistisch belegen. Hierfür korrelierten wir in beiden Gruppen

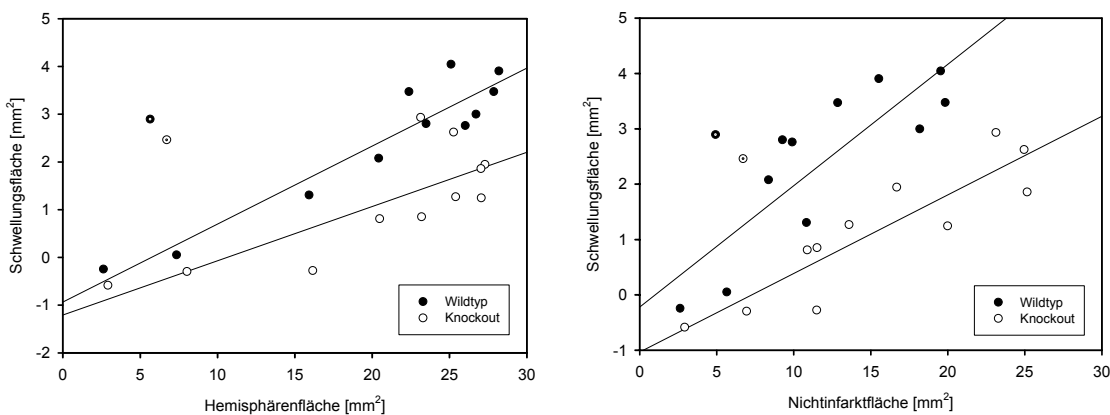
Infarkt- und Schwellungsvolumen miteinander. Der Korrelationskoeffizient betrug in der wildtyp Gruppe  $K=0,929$  mit  $p=0,000$  und in der knockout Gruppe  $K=0,786$  mit  $p=0,025$ . Die Beziehung zwischen Infarkt- und Schwellungsvolumen unterschied sich jedoch in den beiden Gruppen. In den wildtyp Tieren wurde sie durch die Regressionsfunktion  $Schwellungsvolumen = -2,152 + (0,344 \times Infarktvolumen)$  mit  $R=0,904$  und  $p=0,005$  beschrieben. In den knockout Tieren beschrieb die Funktion  $Schwellungsvolumen = -38,241 + (1,122 \times Infarktvolumen)$  mit  $R=0,748$  und  $p=0,053$  den Zusammenhang zwischen den Volumina.

Hieraus ließ sich indes nicht schließen, wie sich die Schwellung räumlich über die Hemisphäre verteilt. Um dies beurteilen zu können, wurden histomorphometrisch in 12 koronaren Schnittebenen jeweils die Gesamtfläche der infarzierten Hemisphäre, die Infarktfläche und die Schwellungsfläche als die Differenz von ipsi- und kontralateraler Hemisphärenfläche ermittelt.



**Abbildung 30:** Auf 12 Schnitten, die im Abstand von  $750\mu\text{m}$  von den Gehirnen von wildtyp und knockout Mäusen 24h nach Ischämie angefertigt worden waren, wurden die Flächen der Hemisphären sowie des Infarktes ausgemessen, und die Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre als die Differenz beider Hemisphärenflächen errechnet. Hier dargestellt sind die Flächen der ipsilateralen Hemisphäre, des Infarktes und der Schwellung als  $MW \pm SD$  von  $n=7$  Mäusen pro Gruppe. Die wildtyp Gruppe hatte signifikant ( $*p<0,05$ ;  $\#p<0,01$ ;  $^+p<0,001$ ) größere Infarkte auf den Schnittebenen 4-10 und eine signifikant ( $^{\S}p<0,05$ ;  $^{\S}p=0,01$ ) größere Schwellung in den Ebenen 5 und 8.

Während die Größe der Infarktfläche in der wildtyp wie der knockout Gruppe kontinuierlich bis zu ihrem Maximum in Schnittebene 6 zunahm und danach wieder abfiel, nahm die errechnete Schwellungsfläche auch über die Schnittebene 6 hinaus weiter zu, was zeigte, dass sich die Schwellung nicht auf das infarzierte Gewebe beschränkte. Es ließ sich ferner statistisch keine Korrelation zwischen den in Abbildung 30 dargestellten Mittelwerten der Infarkt- und der Schwellungsflächen in den 12 Schnittebenen herstellen (Daten nicht gezeigt), wobei Regression und Korrelation für beide Gruppen immer separat ermittelt und dargestellt wurden, da nicht auszuschließen war, dass das Fehlen des B<sub>2</sub> Rezeptors neben der Quantität der Schwellung auch deren Verteilung im Gewebe beeinflusst.



**Abbildung 31:** Die in Abbildung 30 dargestellten Mittelwerte der Schwellung auf den 12 Schnittebenen sind hier entweder gegen den jeweiligen Mittelwert der ipsilateralen Hemisphäre (linke Grafik) oder der nicht infarzierten Fläche der Hemisphäre (rechte Grafik) aufgetragen. Die Werte der 12. Schnittebene (mit Punkt innerhalb des Kreises) wurden bei der Erstellung der Regressionsgeraden nicht berücksichtigt. Die Regressionskoeffizienten in der linken Darstellung waren in der wildtyp Gruppe  $R=0,946$  und in der knockout Gruppe  $R=0,795$ , und in der rechten Darstellung in der wildtyp Gruppe  $R=0,846$  und in der knockout Gruppe  $R=0,895$ .

Hingegen fanden sich Korrelationen zwischen der Schwellungsfläche und der gesamten Hemisphärenfläche bzw. der nicht infarzierten Fläche.

Der Zusammenhang zwischen Schwellungs- und Hemisphärenfläche ist in Abbildung 31 links durch Regressionsgeraden dargestellt. Die zugehörigen Funktionen waren für die wildtyp Gruppe  $Schwellungsfläche = -0,935 + (0,163 \times Hemisphärenfläche)$  mit dem Regressionskoeffizienten  $R=0,946$  und der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p<0,001$  und für die knockout Gruppe  $Schwellungsfläche = -1,210 + (0,114 \times Hemisphärenfläche)$  mit  $R=0,795$  und  $p<0,01$ . In der wildtyp Gruppe betrug der Korrelationskoeffizient  $K=0,773$  mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,01$ , in der knockout Gruppe wurde  $K=0,691$  mit  $p<0,05$  ermittelt.

In Abbildung 31 rechts ist der Zusammenhang zwischen Schwellungs- und Nichtinfarktfläche dargestellt. Die Funktionen der Regressionsgeraden waren  $Schwellungsfläche = -0,218 + (0,219 \times Nichtinfarktfläche)$  mit  $R=0,846$  und  $p=0,001$  in der wildtyp und  $Schwellungsfläche = -1,033 + (0,142 \times Nichtinfarktfläche)$  mit  $R=0,895$  und  $p<0,001$  in der knockout Gruppe. Der Korrelationskoeffizient war in diesem Fall in der wildtyp Gruppe  $K=0,873$  mit  $p<0,01$  und in der knockout Gruppe  $K=0,891$  mit  $p<0,01$ .

Da keine Korrelation zwischen Schwellungs- und Infarktfläche bestand, war es unwahrscheinlich, dass in erster Linie das infarzierte Gewebe geschwollen war. Die gefundene Korrelation zwischen Schwellungs- und Hemisphärenfläche deutete darauf hin, dass die Schwellung eher über die ganze Hemisphäre verteilt war. Die stärkste Korrelation fanden wir jedoch zwischen Schwellungs- und Nichtinfarktfläche, was als Hinweis darauf gesehen werden konnte, dass sich die Schwellung nicht nur über die gesamte Hemisphäre verteilte, sondern sogar hauptsächlich im den Infarkt umgebenden gesunden Gewebe zu finden war.

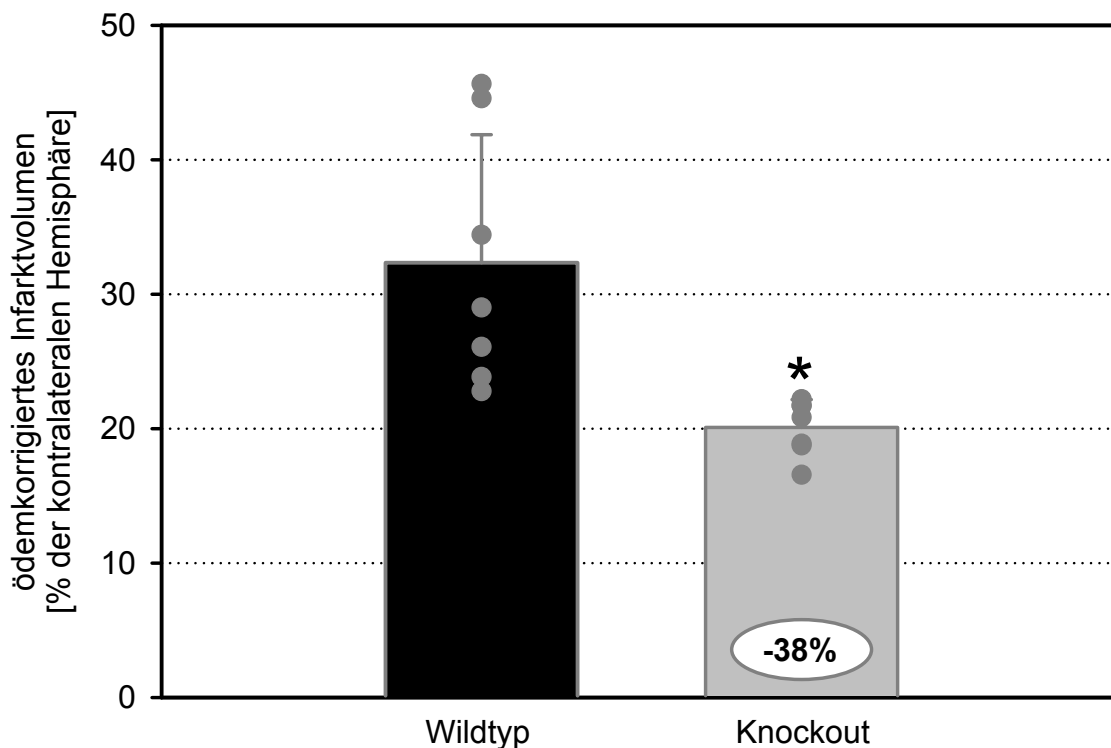
### 3.3.2 Infarktvolumen

Wie schon in Abbildung 30 zu sehen war, in der die Verteilung von Infarkt und Schwellung über die Hemisphäre dargestellt wurde, entwickelten die knockout Mäuse kleinere Infarkte als ihre wildtyp Kontrollen.

Während das ödemkorrigierte und auf die kontralaterale Hemisphäre bezogene Infarktvolumen in der wildtyp Gruppe  $32,3 \pm 9,5\%$  ausmachte, war es in der knockout Gruppe mit  $20,1 \pm 2,1\%$  um  $12,2\%$  geringer, was einer signifikanten ( $p<0,001$ ) Reduktion des Infarktvolumens durch Deletion des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors um  $38\%$  entsprach.

Da die durchgeführte Ödemkorrektur auf der Annahme basierte, dass sich die Schwellung in erster Linie im Infarkt befand, unsere bereits vorgestellten Korrelationsuntersuchungen aber eher darauf hinwiesen, dass sich die Schwellung über die gesamte Hemisphäre verteilte und vielleicht sogar mehr in dem nicht infarzierten Gewebe der Hemisphäre lokalisiert war, war die Richtigkeit der Anwendung dieser Korrektur zweifelhaft. Daher errechneten wir das Infarktvolumen auch ohne Ödemkorrektur als Anteil an der ipsilateralen Hemisphäre. In diesem Fall betrug es in den wildtyp Mäusen  $40,7 \pm 10,4\%$  und in den knockout Mäusen  $25,2 \pm 1,9\%$ . Auch in dieser Rechnung entsprach der Unterschied

zwischen den beiden Gruppen einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion des Infarkt Volumens um 38%.



**Abbildung 32:** Die histomorphometrisch ermittelten Infarktvolumina von wildtyp und knockout Mäusen ( $n=7$  pro Gruppe) 24h nach Ischämie sind als Punkte dargestellt, ihre  $MW \pm SD$  als Säulen. Ausgedrückt ist das ödemkorrigierte Infarktvolumen (siehe Material & Methoden) als Prozent der kontralateralen Hemisphäre. In der knockout Gruppe war das Infarktvolumen signifikant ( $*p < 0,001$ ) um 38% kleiner verglichen mit der wildtyp Gruppe.

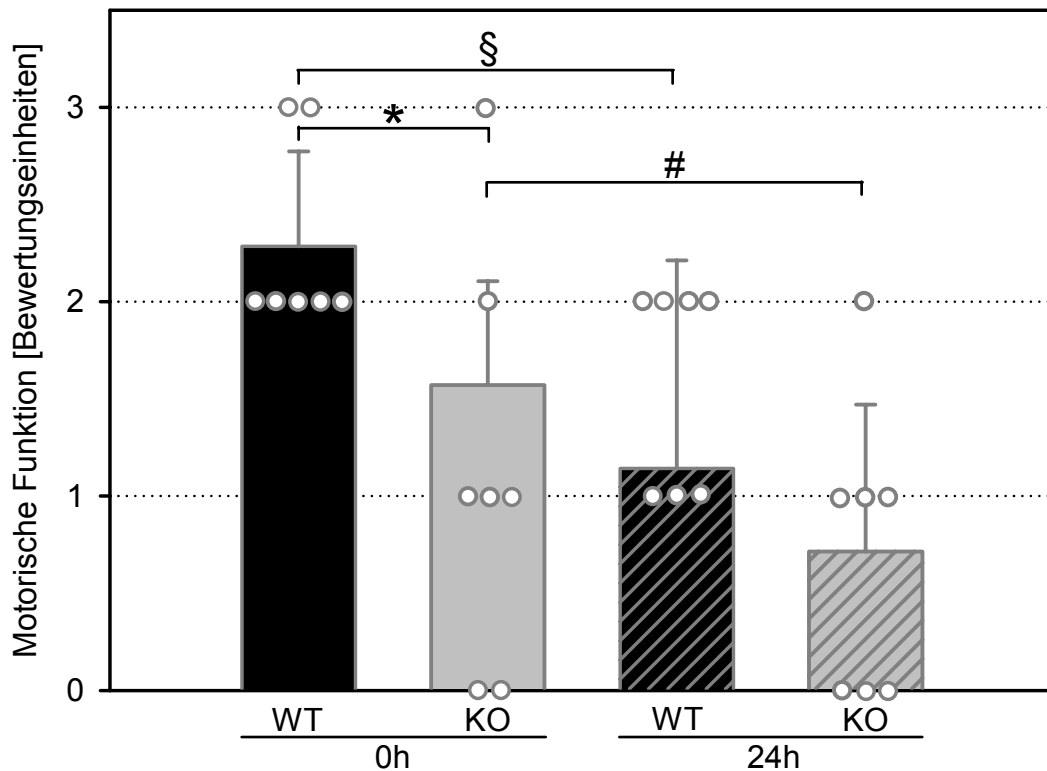
### 3.3.3 Motorische Funktion

Ob die gezeigten Unterschiede in Hirnödemen und Infarktgröße sich auch in der Neurologie widerspiegeln, untersuchten wir mit Hilfe eines Neuroscores, mit dem wir die motorische Funktion in wildtyp und knockout Mäusen zum Zeitpunkt der Reperfusion und 24 Stunden danach bewerteten. In unserer Bewertungsskala, die von 0 bis 4 reichte, wobei „4“ jedoch nie vergeben wurde, entsprach „0“ einer normalen motorischen Funktion, „1“ einem leichten, „2“ einem mittleren und „3“ einem schweren motorischen Defizit.

Während zum Zeitpunkt der Reperfusion 5/7 der wildtyp Mäuse ein mittleres und 2/7 ein schweres motorisches Defizit zeigten, hatte zum selben Zeitpunkt keine B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Maus ein schweres, 4/7 ein mittleres und 3/7 ein leichtes motorisches Defizit. Die

Mittelwerte betragen bei Reperfusion  $2,3 \pm 0,5$  in der wildtyp und  $1,6 \pm 0,5$  in der knockout Gruppe, der Unterschied von 30% zwischen den beiden Gruppen war signifikant ( $p < 0,03$ ).

Beide Gruppen verbesserten sich über die nächsten 24 Stunden signifikant, die wildtyp Gruppe um 52% auf  $1,1 \pm 1,1$  ( $p < 0,03$ ) und die knockout Gruppe um 56% auf  $0,7 \pm 0,8$  ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied von 36% zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie war jedoch nicht mehr signifikant.

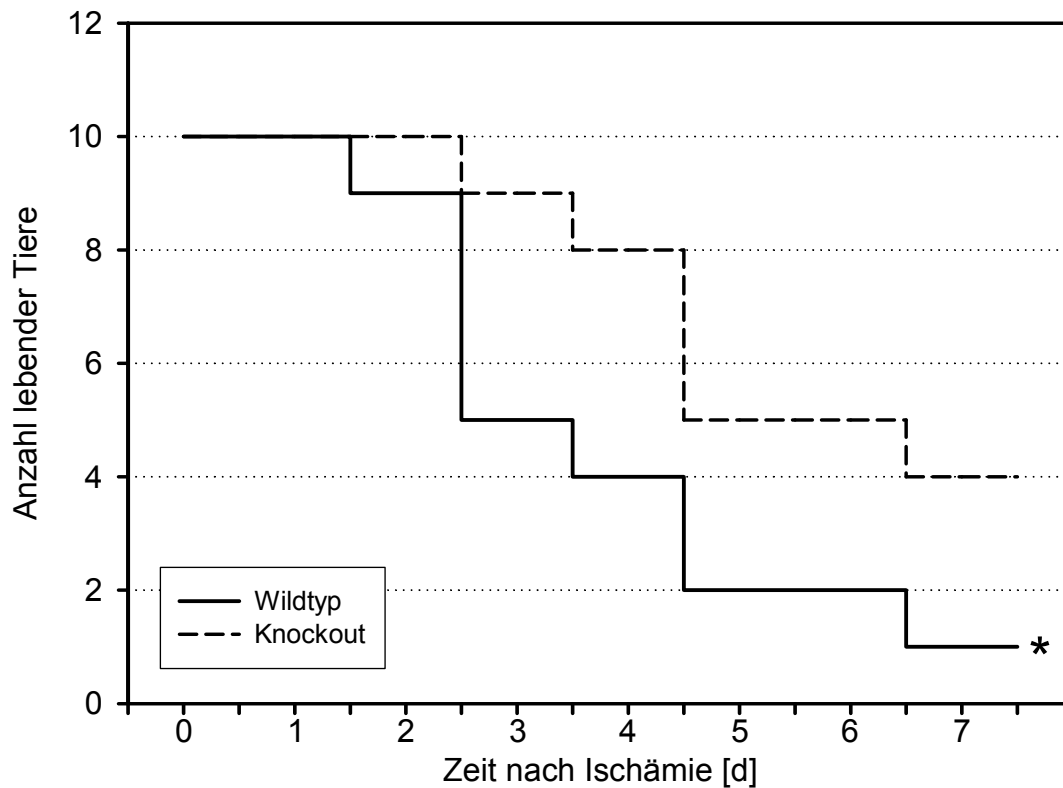


**Abbildung 33:** Die motorische Funktion wurde zum Zeitpunkt der Reperfusion (0h) und 24h später in wildtyp (WT) und knockout (KO) Mäusen ( $n=7$  pro Gruppe) mit 0 bis 4 Punkten bewertet, wobei 0 eine normale und 4 die schlechtest mögliche motorische Funktion darstellt. Gezeigt sind hier die Einzelwerte als Punkte, sowie deren  $MW \pm SD$ . Die knockout Gruppe hatte zum Zeitpunkt der Reperfusion eine signifikant ( $*p < 0,03$ ) bessere motorische Funktion als die wildtyp Gruppe. In beiden Gruppen verbesserte sich die motorische Funktion bis 24h nach Ischämie signifikant ( $§p < 0,03$  WT 24h vs. WT 0h;  $\#p < 0,05$  KO 24h vs. KO 0h). Zu diesem Zeitpunkt bestand jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen.

### 3.3.3 Langzeitüberleben

Da alle bisherigen Daten innerhalb von 24 Stunden nach Ischämie erhoben worden waren, nahmen wir noch die 7 Tage-Mortalität mit in unsere Untersuchungen auf. Wir wollten damit untersuchen, ob Mäuse von der Deletion des B<sub>2</sub> Rezeptors nur im akuten Stadium nach

transienter fokaler zerebraler Ischämie profitieren oder auch längerfristig ein besseres Auskommen aufweisen als ihre wildtyp Kontrollen.



**Abbildung 34:** Die Überlebenszeit von wildtyp und knockout Mäusen ( $n=10$  pro Gruppe) wurde untersucht. Hier dargestellt ist die Anzahl der noch lebenden Tiere vom Tag der Operation bis zu einer Woche nach Ischämie. Während am Tag 3 nur noch die Hälfte der wildtyp Mäuse lebte, überlebte die Hälfte der knockout Mäuse mindestens 6 Tage. Insgesamt war die Überlebenszeit in der knockout Gruppe signifikant ( $*p<0,05$ ) länger.

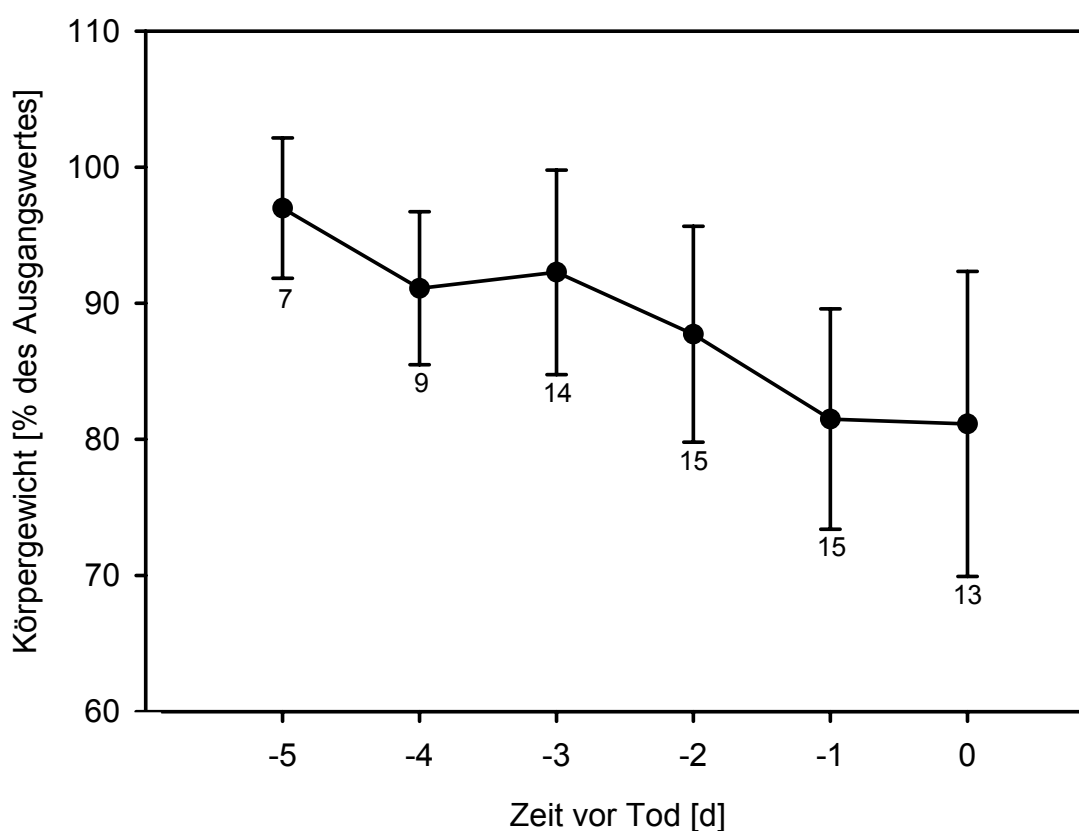
Während der Exitus bei der Hälfte der wildtyp Mäuse innerhalb der ersten drei Tage nach Ischämie eintrat, starb in dieser Zeit nur eine einzige knockout Maus. Die Hälfte der knockout Mäuse war auch sechs Tage nach Ischämie noch am Leben. Die größte Abnahme lebender Tiere sahen wir in der wildtyp Gruppe am 3. Tag und in der knockout Gruppe am 5. Tag post operationem. Nach einer Woche lebten von je 10 Tieren pro Gruppe in der Kontrollgruppe nur noch eines, in der knockout Gruppe noch vier.

Aber auch die knockout Mäuse starben nach der Ischämie, jedoch langsamer als ihre Kontrollen, sodass sie insgesamt eine signifikant ( $p<0,05$ ) längere Überlebenszeit hatten.



### 3.3.5 Körpergewicht

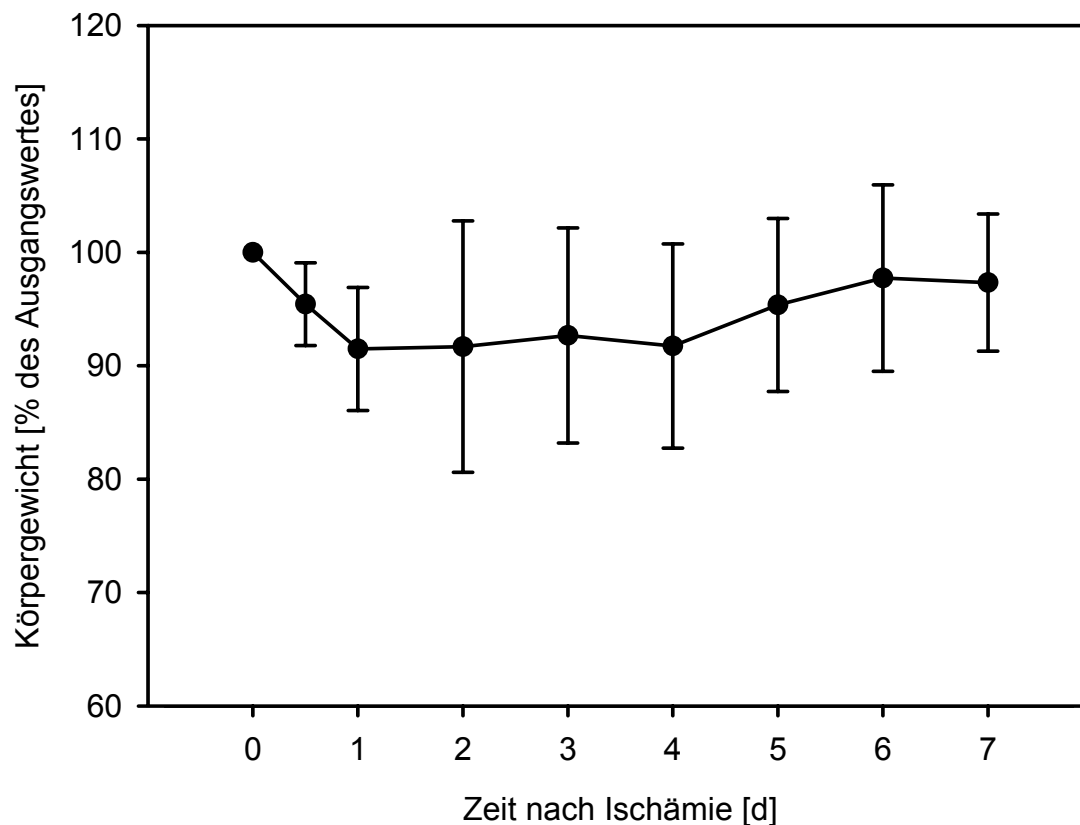
Da unter Umständen auch die Entwicklung des Körpergewichts der Mäuse nach Ischämie als ein Indikator für den Allgemeinzustand einen Hinweis auf das Ausmaß der zerebralen Schädigung geben könnte, maßen wir täglich bei allen lebenden Tieren, an denen wir die Mortalität nach transientser fokaler zerebraler Ischämie ermittelten, das Körpergewicht. Für diese Analyse unterschieden wir nicht zwischen wildtyp und knockout Mäusen sondern post hoc zwischen den Tieren, die in unserem Beobachtungszeitraum von sieben Tagen verendet waren (Abbildung 35), und jenen, die ihn überlebt hatten (Abbildung 36).



**Abbildung 35:** In der in Abbildung 34 dargestellten Versuchsgruppe, in der das Überleben untersucht wurde, war jeden Tag das Körpergewicht der Tiere bestimmt worden. Hier gezeigt ist das Körpergewicht der Mäuse ( $n=15$ ), die im Beobachtungszeitraum verendet waren, zwischen Ischämie und Tod (Zeitpunkt 0). Dargestellt sind die Daten als  $MW \pm SD$  der Einzelwerte (die Anzahl der Einzelwerte ist bei jedem Mittelwert verzeichnet), ausgedrückt in Prozent des Ausgangsgewichts, das vor der Operation bestimmt worden war.

Das Körpergewicht der Mäuse, die während des Beobachtungszeitraumes verendet waren, nahm von durchschnittlich  $97 \pm 5\%$  ihres Ausgangsgewichts fünf Tage vor ihrem Tod über  $91 \pm 6\%$  (Tag -4),  $92 \pm 8\%$  (Tag -3),  $88 \pm 8\%$  (Tag -2) und  $82 \pm 8\%$  (Tag -1) auf  $78 \pm 9\%$  an ihrem Tode (Tag 0) ab. Ihr Todesgewicht unterschied sich signifikant von den

Körpergewichten an den Tagen -5 ( $p < 0,001$ ), -4 ( $p = 0,001$ ), -3 ( $p < 0,001$ ) und ( $p = 0,005$ ). Bereits einen Tag vor ihrem Tod (Tag -1) hatte ihr Gewicht signifikant gegenüber Tag -5 ( $p < 0,001$ ), Tag -4 ( $p = 0,020$ ) und Tag -3 ( $p = 0,004$ ) abgenommen. An Tag -2 war ihr Körpergewicht nur signifikant niedriger als an Tag -5 ( $p = 0,008$ ). Man kann also sagen, dass die Mäuse nach transientser fokaler zerebraler Ischämie über die Zeit zunehmend um insgesamt ca. 20% signifikant an Körpergewicht verloren, bevor sie verendeten, sodass das Körpergewicht folglich als Indikator für das Allgemeinbefinden gewertet werden könnte.



**Abbildung 36:** In der in Abbildung 34 dargestellten Versuchsgruppe, in der das Überleben untersucht wurde, war jeden Tag das Körpergewicht der Tiere bestimmt worden. Hier gezeigt ist das Körpergewicht der Mäuse ( $n=5$ ), die den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen nach Ischämie (Tag 0 bis 7) überlebt hatten. Dargestellt sind die Daten als  $MW \pm SD$  der Einzelwerte, ausgedrückt in Prozent des Ausgangsgewichts, das vor der Operation bestimmt worden war. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Körpergewichte zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Für das Körpergewicht als Indikator für das Allgemeinbefinden sprechen auch die in Abbildung 36 dargestellten Ergebnisse. Das Körpergewicht der Tiere, die den Beobachtungszeitraum überlebt hatten, fiel während des ersten Tages nach Ischämie über  $95 \pm 4\%$  ihres Ausgangsgewichts nach 12 Stunden auf  $92 \pm 5\%$  ab. Auf diesem Niveau stabilisierte es sich für die nächsten drei Tage (Tag 2:  $92 \pm 11\%$ ; Tag 3:  $93 \pm 9\%$ ; Tag 4:

92±9%). Anschließend erholte es sich wieder deutlich (Tag 5: 95±8%; Tag 6: 98±8%; Tag 7: 97±6%). Die Mäuse, die die transiente fokale zerebrale Ischämie mindestens sieben Tage überlebten, verloren in den ersten 24 Stunden ca. 10% ihres Körpergewichts. Nachdem sie sich über drei Tage auf diesem Niveau stabilisiert hatten, erholten sie sich weiter gut, und ihr Körpergewicht erreichte am 6. Tag nach Ischämie wieder fast Ausgangswerte.

Im Vergleich der beiden Gruppen sahen wir in den ersten drei Tagen nach Ischämie überhaupt keinen Unterschied im Körpergewicht von wildtyp und knockout Mäusen, danach hatten die wildtyp Tiere im Durchschnitt um 6% höheres Körpergewicht als die knockout Tiere, was jedoch nicht signifikant war (Daten nicht gezeigt). Dies ist dadurch zu erklären, dass in der wildtyp Gruppe bei den schwer kranken Tieren, die im Rahmen ihres schlechten Allgemeinzustandes wahrscheinlich weniger Nahrung und Flüssigkeit zu sich nahmen und dadurch ein tendenziell niedrigeres Körpergewicht hatten, der Exitus bereits eingetreten war, während die schwer kranken Tieren der knockout Gruppe noch lebten. So kehrte sich der Trend von durchschnittlich sinkenden zu steigenden Körpergewichten in beiden Gruppen auch jeweils an dem Tag um, als die Hälfte der Tiere – also die, die von der Ischämie besonders schwer gezeichnet waren – gestorben war. Dies entsprach in der wildtyp Gruppe dem 3. Tag, in der knockout Gruppe dem 5. Tag.

### **3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bedeutung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Pathologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie**

Dass der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Hirnödems nach transienter fokaler Zerebraler Ischämie spielt, zeigte sich in unserer Studie mit Mäusen (B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>), die diesen Rezeptor nicht exprimierten. Sie entwickelten – gravimetrisch bestimmt – im Vergleich mit ihren wildtyp Kontrollen ein signifikant um 87% geringeres Hirnödem 24 Stunden nach Ischämie. Dieses Ödem führte zu einer Schwellung des Gehirns. Die histomorphometrisch ermittelte Schwellung der infarzierten Hemisphäre fiel in den B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen signifikant um 53% geringer aus als in den Kontrolltieren und war nicht auf den Infarkt beschränkt sondern über die gesamte Hemisphäre verteilt. Zum selben Zeitpunkt war das aus histomorphometrischen Daten errechnete Infarktvolumen in den B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Tieren signifikant um 38% geringer als in den Kontrollen. Ob diese pathologischen Gewebsveränderungen auch von funktioneller Bedeutung waren, ermittelten wir für die

Akutphase mit einem Test der motorischen Funktion und für die chronische Phase durch Bestimmung der Überlebenszeit der Tiere. Die  $B_2^{-/-}$  Mäuse zeigten verglichen mit den wildtyp Mäusen zum Zeitpunkt der Reperfusion eine signifikant um ein Drittel bessere motorische Funktion. Die Funktion verbesserte sich in beiden Gruppen über die nächsten 24 Stunden signifikant und war auch danach in der  $B_2^{-/-}$  Gruppe um ein Drittel besser. Auch überlebten die Tiere in der  $B_2^{-/-}$  Gruppe signifikant länger als in der Kontrollgruppe. Zuletzt untersuchten wir noch die Entwicklung des Körpergewichts nach Ischämie, wobei wir statistisch jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen fanden. Allerdings erwies sich das Körpergewicht als ein zuverlässiger Indikator für das Allgemeinbefinden der Tiere.

Es zeigte sich also, dass Mäuse mit Deletion des Gens für den Kinin  $B_2$  Rezeptor signifikant vor den Folgen einer transienten fokalen zerebralen Ischämie geschützt waren, der Kinin  $B_2$  Rezeptor folglich eine wichtige Rolle in der Pathologie der zerebralen Ischämie zu spielen scheint.

# 4 Diskussion

## 4.1 Experimentelles Modell

### 4.1.1 Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie

Beim Schlaganfall handelt es sich um einen höchst variablen klinischen Zustand. Ort, Grund, Schwere und Reversibilität des Syndroms sowie vorexistente systemische Erkrankungen können zur Variabilität der Auswirkungen beitragen und erschweren die Interpretation der Entwicklung des Krankheitsprozesses. Die hohe Anzahl unkontrollierbarer Variablen erschwert die statistische Beurteilung therapeutischer oder pathophysiologischer Untersuchungen zu dieser Krankheit, was dazu führt, dass extrem große Studiengruppen nötig sind. Viele dieser Variablen können eliminiert werden, indem mit Tiermodellen gearbeitet wird. Klare Vorteile sind: 1) die Verwendbarkeit eines für die Versuche etablierten Tierstammes ohne Nebenerkrankungen und mit einheitlicher zerebrovaskulärer Anatomie, 2) die Kontrolle über Schwere und Dauer der Ischämie und 3) die optimale Handhabung von Gewebe zur biochemischen Analyse oder quantitativen Histopathologie. Dies erlaubt eine einfache Analyse und Beurteilung der Pathogenese der Ischämie und des Ausmaßes der Gewebsinfarzierung. Es wird berichtet, dass die A. cerebri media (MCA) das beim Schlaganfall am häufigsten betroffene Gefäß ist, wobei meist eine Embolie ursächlich ist (Karpiak et al., 1989; Mhairi, I, 1992). Beim Schlaganfall des Menschen scheint ein Persistieren der embolischen Okklusion eher die Ausnahme als die Regel zu sein. Fokale Ischämie mit sekundärer Reperfusion macht das Tiermodell zwar komplexer, beinhaltet aber auch den durch die Wiederdurchblutung des ischämischen Gewebes bedingten Schaden und spiegelt damit genauer die Situation wider, die in der Mehrzahl der embolischen Schlaganfälle vorliegt.

Da wir die Rolle des Kallikrein-Kinin Systems für die Pathophysiologie des Schlaganfalls untersuchen wollten, suchten wir ein Modell, das bei hoher Reproduzierbarkeit dem Schlaganfall am nächsten kommt. Somit war offensichtlich, dass es sich um ein Modell der fokalen, nicht der globalen Ischämie (Pulsinelli und Brierley, 1979) handeln musste. Die verbreitetsten fokalen Ischämie-Modelle sind das Elektrokoagulations-, Photothrombose-,

Thromboembolie-, Faden-, Clip- oder Häkchenmodell (Ginsberg und Busto, 1989; Hossmann, 1998; Mhairi, I, 1992). Da ein Modell der transienten Ischämie mit Reperfusion die klinische Situation beim Schlaganfall besser wiedergibt als ein Modell der permanenten Ischämie, schieden das Photothrombose- und das Elektrokoagulationsmodell aus. In ihnen wird nach Applikation eines thrombogenen Agens mit einem Laser eine kortikale Thrombose induziert oder das zu verschließende Gefäß mit Strom thermisch verödet, was zu einer nicht reversiblen Ischämie führt (Watson et al., 1985). Von den verbliebenen vier Modellen hatte das Thromboembolienmodell, bei dem ein extrakorporal in einem Katheter hergestellter, autologer Thrombus ins Gehirn geschwemmt wird, den klaren Nachteil, dass Ort der Embolisation, Schwere der Hypoperfusion und Grad der spontanen Lyse extrem variabel sind. Ischämie und Reperfusion sind also weder direkt kontrollierbar, noch standardisiert oder reproduzierbar, die Varianz der Infarkt volumina ist folglich sehr groß. Schwieriger war die Entscheidung zwischen Häkchen-, Clip- und Fadenmodell. Beim Häkchenmodell wird nach Kraniotomie und Eröffnen der Dura das zu okkludierende Gefäß mit einem Häkchen aufgenommen und so weit von der Hirnoberfläche abgehoben, bis es durch Abknicken verschließt. Durch Wegnehmen der Spannung und Entfernen des Häkchens wird das Gefäß reperfundiert. Vorteile dieses Modells sind eine direkte Ischämiekontrolle durch sichtbaren Stop des Blutflusses sowie eine einfache gut kontrollierbare Reperfusion. Einen klaren Nachteil stellt das Eröffnen des Neurokraniums und der Dura mater dar, was zu Verletzungen von Gehirn und Gefäßen mit subduralen Blutungen, zu Störung der Liquorzirkulation, Veränderung von intrakraniellm Druck und Hämodynamik, lokaler Hypothermie, Austrocknung und Aktivierung inflammatorischer Zellen führen kann. Auf das Clipmodell soll hier nicht genauer eingegangen werden, da es weitestgehend dem Häkchenmodell entspricht. Der einzige Unterschied besteht darin, dass in ihm nach Kraniotomie die A. cerebri media nicht durch Abheben mit einem Häkchen sondern durch Setzen eines Mikroclips verschlossen wird (Tamura et al., 1981a). Das Fadenmodell (Longa et al., 1989; Nagasawa und Kogure, 1989), bei dem ein speziell hergestellter atraumatischer Faden über die A. carotis interna vorgeschoben wird und den Abgang der A. cerebri media verlegt, hat den entscheidenden Vorteil, dass das Neurokranium nicht eröffnet wird, die äußeren Einflüsse auf das Gehirn also sehr gering sind. Nachteile dieses Modells sind ein möglicher endothelialer Schaden in der A. carotis interna und das Fehlen einer direkten Ischämie- und Reperfusionkontrolle. Letzteres lässt sich durch Messung der regionalen Hirndurchblutung mit Laser-Doppler Fluxmetrie sehr einfach ausgleichen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass ein potentieller Endothelschaden durchaus relevant ist, da er pathologische

Prozesse in der Gefäßwand in Gang setzen, die Reagibilität des Gefäßes und die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke verändern oder als Emboliequelle weiter distal gelegene Gefäße verschließen könnte. Nach Abwägung dieser Argumente entschieden wir uns für das Fadenmodell. Unserer Ansicht nach ist die Möglichkeit einer gezielten Okklusion und Reperfusion ohne Kraniotomie ein derart entscheidender Vorteil gegenüber dem Häkchen- oder Clipmodell, dass sie den Mehraufwand der Laser-Doppler Messung und die Gefahr eines Endothelschadens rechtfertigt.

Um eine gute Standardisierung des Modells mit hoher Reproduzierbarkeit der ischämischen Schädigung zu gewährleisten, führten wir eine Reihe von Vorversuchen durch. Ziel war es, sehr zügig ohne Auftreten von Komplikationen die Tiere zu operieren und ähnlich große Infarkte zu erreichen. Die Infarktvolumina ermittelten wir histomorphometrisch in 24 Stunden nach Ischämie entnommenen Gehirnen, die in 2mm dicke Scheiben geschnitten und mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), das durch die Anfärbung lebenden Gewebes zu einer Infarktdemarkierung führt, gefärbt worden waren. In der ersten Versuchsgruppe mit 10 Tieren betrug der MW $\pm$ SD der Infarktvolumina lediglich 23,3 $\pm$ 10,7% der Hemisphäre, was auf eine insuffiziente Okklusion durch zu kleine Fäden hindeutete. In der zweiten Versuchsgruppe mit 10 Mäusen legten wir besonderen Wert auf die Verwendung maximal dicker Okklusionsfäden und erreichten mit einem Infarktvolumen von 35,1 $\pm$ 18,5% ein diesbezüglich zufriedenstellendes Ergebnis. Die Standardabweichung war mit über 50% jedoch noch deutlich zu groß. Nachdem wir in der dritten Versuchsgruppe mit 10 Tieren durch weitere Optimierung des operativen Prozesses ein Infarktvolumen von 36,3 $\pm$ 13,6% erreicht hatten, überprüften wir als nächstes die Therapierbarkeit des von uns induzierten Infarktes. Hierzu applizierten wir den Mäusen (n=9) den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor Antagonisten Akatinol Memantine® (Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Frankfurt am Main, Deutschland) 30min vor Ischämie intraperitoneal in einer Dosis von 20mg/kg Körpergewicht. Die neuroprotektive Wirkung dieses NMDA Rezeptor Antagonisten war für die Ischämie mehrfach gezeigt worden (Block und Schwarz, 1996; Dogan et al., 1999; Gorgulu et al., 2000; Stieg et al., 1999). Das Infarktvolumen der mit Akatinol Memantine® behandelten Mäuse war mit 17,7 $\pm$ 13,3% der Hemisphäre signifikant (p<0,05) um 44% geringer als das der mit dem Vehikel NaCl behandelten Kontrolle (31,8 $\pm$ 14,1% des Hemisphärenvolumens). Als somit Sicherheit dahingehend bestand, dass der von uns induzierte Hirnschaden therapeutisch beeinflussbar war, entschlossen wir uns zum Beginn der eigentlichen Versuche.

Das von uns gewählte Modell der intraluminalen Fadenokklusion der A. cerebri media ist bereits von einigen Arbeitsgruppen an Ratten wie Mäusen für permanente Ischämie (Huang et al., 1994; Zarow et al., 1997), bei der der Okklusionsfaden im Gefäß verbleibt, und für transiente Ischämie (Hara et al., 1996; Plesnila et al., 2001b; Zausinger et al., 2002) verwendet worden. Das chirurgische Prozedere zur Induktion der Ischämie übernahmen wir mit leichten Modifikationen von den anderen Arbeitsgruppen. Ganz entscheidend für das Experiment ist ein guter Verschluss der A. cerebri media (MCA). Zu große Fäden können nicht weit genug vorgeschoben werden, um den Abgang der MCA zu verlegen, zu kleine Fäden führen zu einer inkompletten Obstruktion des Gefäßlumens. In einer Arbeit von Hata et al. wurden Körpergewicht der Maus und Dicke des für eine suffiziente Okklusion nötigen Fadens zueinander in Beziehung gesetzt. Wir bestimmten nicht die Dicken unserer mit Silikon ummantelten Fäden, um anhand des Körpergewichts den passenden zu ermitteln, sondern wählten unter dem Mikroskop aus einer Menge leicht unterschiedlich dicker Okklusionsfäden durch Größenvergleich mit der exponierten A. carotis interna einen aus. Diese Methode erschien uns am zuverlässigsten, da unserer Erfahrung nach auch innerhalb einer Gewichtsklasse die Gefäßkaliber nicht unerheblich variieren. So konnten wir auch in keinem Fall eine spontane Reperfusion mit unserer Laser-Doppler Fluxmetrie beobachten, mit der wir die Hirndurchblutung nach Induktion der Ischämie für circa fünf Minuten maßen. Wenn es sich statt um eine echte Okklusion um einen durch die Manipulation am Gefäß verursachten vorübergehenden Vasospasmus gehandelt hätte, so wäre nach kurzer Zeit mit Nachlassen des Spasmus ein spontaner Anstieg der Hirndurchblutung zu erwarten gewesen. Einen solchen sahen wir jedoch in keinem einzigen Fall – weder während dieser Beobachtungszeit von fünf Minuten nach Ischämieinduktion noch in den langen Beobachtungszeiten der 20 Versuche zur Charakterisierung der beiden Mäusestämme, in denen wir die Hirndurchblutung während der gesamten Ischämiephase maßen und aufzeichneten. Wir gehen also davon aus, dass es uns gelungen ist, die MCA zuverlässig mit Hilfe des intraluminalen Fadens zu okkludieren.

Garcia et al. zeigten, dass im Fadenmodell an der Ratte das Ausmaß des neurologischen Defizits und der neuronalen Nekrose unmittelbar von der Dauer der Ischämie abhängig ist (Garcia et al., 1995). Tiere mit einer Ischämiezeit von 30 Minuten hatten leichte motorische Defizite und erholten sich innerhalb einer Woche komplett. Tiere mit 60 Minuten Ischämie hatten anfangs schwere Defizite, verbesserten sich deutlich, erreichten aber nicht mehr den Ausgangswert. Tiere mit permanenter Ischämie zeigten die schwersten Ausfälle und blieben auf diesem niedrigen Niveau. Die Anzahl toter Neurone verdoppelte sich mit Verlängerung der Ischämiezeit von 30 auf 60 Minuten und versechsfachte sich bei



permanenter Ischämie. Eine ähnliche Beobachtung machten Memezawa et al., die eine Entwicklung von einer selektiven neuronalen Nekrose im Caudoputamen bei 15 Minuten Ischämie über eine Pannekrose im Caudoputamen mit selektiver neuronaler Nekrose im Neocortex nach 30minütiger Ischämie bis hin zu einer Pannekrose in Caudoputamen und Neocortex nach einer Ischämiezeit von 60 Minuten beobachteten (Memezawa et al., 1992). Diese Pannekrose nahm mit längerer Ischämiezeit weiter zu, bis sie bei 3h Ischämie ihr Maximum erreichte.

Dem liegt folgendes Konzept zugrunde. Bei Verschluss der A. cerebri media (MCA) wird deren Versorgungsgebiet nicht mehr vom Zentrum ausgehend in die Peripherie hin durchblutet, sondern von der Peripherie, die über Anastomosen mit den Versorgungsgebieten von Aa. cerebri anterior und cerebri posterior verbunden ist, ausgehend in Richtung Zentrum. Dies kann keine suffiziente Durchblutung des gesamten MCA Versorgungsgebiets gewährleisten, sodass die Durchblutung vom Randbereich zum Kern hin abnimmt. Es existieren nun einige Schwellenwerte der Hirndurchblutung, die mit der Aufrechterhaltung bestimmter Funktionen verknüpft sind (Astrup et al., 1981; Heiss, 1983; Hossmann, 1994): Inhibition der Protein Synthese ab 55ml/100g/min, Stimulation der anaeroben Glykolyse ab 35ml/100g/min, Ausschüttung von Neurotransmittern und Beginn der Störung des Energie Metabolismus ab 20ml/100g/min, anoxische Depolarisation ab 15ml/100g/min. Der limitierende Faktor scheint jedoch nicht so sehr die Durchblutung per se sondern die von ihr abhängige Sauerstoffversorgung zu sein. Die Penumbra wurde früher als der Bereich zwischen funktioneller (15-20ml/100g/min) und struktureller (10-15ml/100g/min) Integrität definiert. Zellen in der Penumbra erfüllen also nicht mehr ihre Funktion (elektrische Aktivität), erhalten aber noch ihr Membranpotential und damit ihre Struktur aufrecht (Heiss und Rosner, 1983; Symon et al., 1977). Der Core ist der Bereich, der durch einen so großen Verlust an ATP gekennzeichnet ist, dass er auch sein Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten kann, also unter der Strukturerhaltungsgrenze liegt (Astrup et al., 1977). Die genannten Schwellenwerte gelten nur für kurze Ischämiezeiten. Mit länger andauernder Ischämie steigen sie (Back et al., 1994; Kohno et al., 1995). Auf diese Weise expandiert der Core immer weiter in die Penumbra, bis diese nach ein paar Stunden Ischämie völlig verschwunden ist. Es wird vermutet, dass diese intrainischämisch begrenzte Überlebensfähigkeit der Penumbra maßgeblich durch Periinfarktdepolarisationen bestimmt wird, die zu wiederholten Episoden von Gewebshypoxie führen, da der durch sie erhöhte Metabolismus nicht an eine adäquat erhöhte kollaterale Blutversorgung geknüpft ist (Nedergaard, 1988). Die morphologische Integrität der einzelnen Zelle scheint also in erster

Line von Dauer und Tiefe der Ischämie sowie von ihrer selektiven Vulnerabilität abhängig zu sein (Heiss und Rosner, 1983).

Es ist jedoch offensichtlich, dass Energiestatus und Ionenhomeostase nicht per se die Faktoren sein können, die einen irreversiblen Schaden anzeigen, da sie sich beide auch nach längeren Perioden normothermer Ischämie komplett erholen können, obwohl die Funktion nicht wiederkehrt. Auch reagieren elektrische Aktivität, Energiemetabolismus und Ionenhomeostase quasi sofort auf eine entsprechend verminderte Sauerstoffversorgung, während für die Entwicklung des Infarktes der Zeitfaktor eine wichtige Rolle spielt. Daher wird heutzutage unter Core zumeist der Bereich des intraischämisch irreversibel geschädigten Gewebes verstanden, während als Penumbra das Gewebe bezeichnet wird, dessen Schädigung potentiell reversibel ist. Während im Core die Zellen primär letal geschädigt sind, entscheiden in der Penumbra sekundäre Mechanismen wie Glutamatexzitotoxizität, oxidativer Stress, Periinfarktdepolarisation, Azidose, Störung der  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostase, Inflammation oder Apoptose über deren Schicksal. Diese postischämische Ausdehnung des Infarktes über den Core hinaus in die Penumbra nennt man sekundären Hirnschaden. Von Heiss et al. wurde dieser sekundäre Zelltod in Schlaganfallpatienten mittels PET (Positronen Emissions Tomographie) beobachtet (Heiss et al., 1992). In der Grenzzone des Infarktes nahmen trotz Anstiegs der Durchblutung die  $\text{CMRO}_2$  (cerebral metabolic rate of oxygen consumption), die  $\text{CMRgluc}$  (cerebral metabolic rate of glucose consumption) und die OEF (oxygen extraction fraction) ab. Interessanter Weise hatten auch Regionen der Grenzzone mit initial höherer Durchblutung langfristig keine bessere Prognose. Der sekundäre Hirnschaden beschreibt den Teil des Schadens, der einer Therapie zugänglich ist und somit theoretisch vermindert werden kann. In einer Studie wie unserer, die diesen Schaden erforschen will, muss das Modell also darauf ausgelegt sein eine möglichst große Penumbra zu schaffen, in der sich dieser Schaden entwickeln kann. Während bei sehr kurzen Ischämiezeiten, wie oben für die Ratte beschrieben, der Schaden extrem gering ist, geht bei langen Zeiten die Penumbra zu Gunsten des Cores verloren. Eine Ischämiezeit von 45 Minuten – also mittlerer Dauer – scheint im Fadenmodell an der Maus unseren Zwecken dienlich zu sein, wie wir bereits in einer anderen Studie zeigen konnten (Plesnila et al., 2004).

## 4.1.2 Versuchstiere und ihre Charakterisierung

Auch wenn früher v.a. größere Tiere (Hasen, Katzen, Hunde, Primaten) für Studien der zerebralen Ischämie verwendet wurden, so sind Nagetiere ebenso gut geeignet und in mancher Hinsicht sogar vorteilhaft: 1) geringere Kosten für das Tier, 2) geringere Kosten für Untersuchungen (größeres Tier bedeutet mehr zu untersuchendes Gewebe), 3) durch Inzucht hohe Homogenität innerhalb eines Stamms, 4) große Ähnlichkeit von zerebrovaskulärer Anatomie und Physiologie zu der höherer Spezies, 5) bessere Eignung kleiner Gehirne für Fixationsverfahren, v.a. Gefrieren und 6) größere Akzeptanz aus ökologischer wie ethischer Sicht. Wir haben für die vorliegenden Versuche Mäuse verwendet, die sich allgemein für zerebrale Ischämieversuche und insbesondere für unser Modell neben Ratten etabliert haben. Da C57/Bl6 Mäuse den genetischen Hintergrund der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse, mit denen wir in einem Teil unserer Studie arbeiteten, darstellen, wählten wir diesen Stamm für unsere Experimente. Mäuse sind zwar deutlich kleiner als Ratten, was das chirurgische Arbeiten schwieriger gestaltet und dadurch etwas mehr Übung erfordert, haben aber den Vorteil, dass sie billiger in der Anschaffung und Haltung sind. Auch gib es durch ein größeres Angebot an Reagentien, wie z.B. Primern und Antikörpern, mehr molekularbiologische Arbeitsmöglichkeiten mit Mäuse- als mit Rattengewebe. Das bekannte Genom erlaubt außerdem die Schaffung sogenannter knockout Mäuse. Insbesondere die Option, mit solchen Mäusen zu arbeiten, war für unsere Studie entscheidend.

Unser Hauptziel war es, die Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie genauer zu beleuchten. Hierfür wollten wir mit B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen arbeiten, also Mäusen, die nach Deletion des Gens des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors diesen nicht exprimieren. Die Technik des Eliminierens eines bestimmten Gens wird immer öfter als eine Methode verwendet, um die Bedeutung des Proteins, für das dieses Gen kodiert, für die Entwicklung des Organismus, für Physiologie und Pathophysiologie zu erforschen oder um einen Phänotyp, der einer bestimmten menschlichen Erkrankung ähnelt, zu kreieren und an ihm neue Pharmaka zu entwickeln und zu testen. Bisher war die Bedeutung des B<sub>2</sub> Rezeptors für die Pathophysiologie/-biochemie der zerebralen Ischämie nur mit Hilfe von B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten wie B-9430, CP-0597 oder LF 16-0687Ms untersucht worden (Ding-Zhou et al., 2003; Lehmberg et al., 2000; Relton et al., 1997; Zausinger et al., 2002). Die Arbeit mit Antagonisten hat jedoch gegenüber dem völligen Fehlen des Rezeptors nach Deletion seines Gens entscheidende Nachteile. So sind Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Antagonisten, die sich von Spezies zu Spezies

unterscheiden und oft für das Versuchstier, in dem der Antagonist Anwendung findet, nicht ausreichend erforscht sind, entscheidend für seine Wirksamkeit. V.a. Unterschiede in Affinität, Selektivität und residualem Agonismus können ein Problem darstellen. Und gerade bei Versuchen im Zentralnervensystem, in dem der Stoffaustausch mit dem restlichen Körper einer starken Kontrolle durch die Blut-Hirn Schranke unterliegt, ist es fraglich, ob der systemisch applizierte Antagonist überhaupt zur rechten Zeit in der richtigen Menge am gewünschten Ort ist. Da es sich bei den verwendeten Antagonisten ausschließlich um kompetitive Inhibitoren handelt, kann auch eine Restfunktion nicht ausgeschlossen werden. Darüberhinaus gibt es keine Wirkung ohne Nebenwirkungen. Diese Nebenwirkungen zu erkennen und ihren Einfluss auf die untersuchten Größen zu erkennen, gestaltet sich teilweise sehr schwierig.

Daher sahen wir es als eine notwendige Ergänzung zu den bereits existierenden pharmakologischen Studien, die starke Hinweise auf eine bedeutende Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens und insbesondere des Hirnödems nach zerebraler Ischämie geliefert hatten, diese Bedeutung des B<sub>2</sub> Rezeptors mit Hilfe von B<sub>2</sub> Rezeptor defizienten Mäusen zu verifizieren und noch genauer zu untersuchen. Für die Herstellung solcher Mäuse, denen das Gen für ein bestimmtes Protein fehlt, hat es sich etabliert, das Gen in einer embryonalen Stammzelle (ES) des Mäusestammes SV 129 auszuknocken, und diese ES Zelle dann in eine Blastozyste des Mäusestammes C57/Bl6 zu injizieren. Für diesen Prozeß werden ES Zellen von SV 129 Mäusen verwendet, da nur diese in Kultur wachsen. Die daraus resultierende Chimäre kann dann mit jedem beliebigen Mäusestamm gekreuzt werden, wobei aber die Stämme SV 129, C57/Bl6 oder Black Swiss am häufigsten benutzt werden (Doetschman, 1999). Auf die Techniken zur Herstellung von knockout Tieren soll hier nicht weiter eingegangen werden. Wir verweisen stattdessen auf einige Reviews zu diesem Thema (Arbeit und Hirose, 1999; Melton, 1994; Shastry, 1995). Auch die von uns verwendeten Tiere waren auf diese Weise hergestellt worden. Borkowski et al. von den Merck Research Laboratories hatten 1995 in ES Zellen des Mäusestammes L129/SvEv das Gen des B<sub>2</sub> Rezeptors durch homologe Rekombination gezielt zerstört und das Fehlen der gesamten den B<sub>2</sub> Rezeptor kodierenden Sequenz genetisch, biochemisch und pharmakologisch bewiesen (Borkowski et al., 1995; Borkowski und Hess, 1995). Sie hatten die knockout Mäuse auf den Stamm C57/Bl6 zurück gekreuzt und fruchtbare, normal große Nachkommen ohne sichtbaren Phänotyp erhalten.

Diese Technik birgt jedoch auch einige Gefahren. So ist es sehr wichtig, bei der Interpretation des Phänotyps zu bedenken, dass es zu adaptiven Antworten auf die genetische

Modifikation kommen kann. Der beobachtete Phänotyp ist in jedem transgenen Experiment eine Funktion sowohl der geplanten genetischen Modifikation als auch sekundärer Antworten des Organismus auf diese Störung. Modifizierende Gene können durch genetische Redundanz innerhalb einer Proteinfamilie, was bedeutet, dass ein sehr ähnliches Gen noch an einer anderen Stelle des Genoms existiert, den Phänotyp von knockout Tieren beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit der Kompensation des Verlustes eines Gens ist die funktionelle Redundanz. In diesem Fall wird eine bestimmte Funktion von mehreren verschiedenen, aber funktionell ähnlichen Proteinen aufrechterhalten, sodass der Verlust eines Proteins – zumindest teilweise – durch die anderen kompensiert wird. Außerdem ist der Phänotyp, der ja nicht immer offensichtlich ist, unter Umständen stark vom genetischen Hintergrund abhängig (Doetschman, 1999; Williams und Wagner, 2000). So zeigen 129/Sv Mäuse zum Beispiel ein gespaltenes Corpus callosum und schneiden in Erinnerungstests schlecht ab, während C57/Bl6 Mäuse schlechtere Ergebnisse in passiven Vermeidungstests liefern (Montagutelli, 2000). Und ein Beispiel aus unserem Forschungsbereich, dem Kallikrein-Kinin System, wäre, dass Mäuse des Stammes SJL/J sehr sensibel auf topisch appliziertes Bradykinin mit einer Erhöhung der Permeabilität pialer Venolen reagieren, während BALB/c Mäuse diesbezüglich völlig unempfindlich sind (Yong und Linthicum, 1996).

Dies zeigt, wie ausserordentlich wichtig es ist, die richtigen Kontrollen in Experimenten mit knockout Tieren zu verwenden und zu versuchen mögliche Veränderungen im Phänotyp, die für die geplanten Untersuchungen von Bedeutung wären, zu entdecken. Als wir ein Brutpaar homozygoter B<sub>2</sub> Rezeptor knockout (B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) Mäuse von den Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME, USA) erhielten, waren die Tiere acht Generationen auf den Stamm C57/Bl6 zurückgekreuzt worden. Da eine Rückkreuzung über acht Generationen zu einem über 99% homologen genetischen Hintergrund führt, nahmen wir Mäuse des Stammes C57/Bl6, die wir von Charles River Deutschland (Sulzfeld, Deutschland) erwarben, als Kontrollen. Die in unserer Tierhaltung gezüchteten B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse waren lebensfähig, fruchtbar und ohne sichtbaren besonderen Phänotyp. Um die allgemeinen Probleme des Arbeitens mit knockout Tieren wissend, entschieden wir uns, die B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse und ihre wildtyp Kontrollen hinsichtlich einiger Faktoren, die unsere Untersuchungen beeinflussen könnten, genauer zu charakterisieren. Außerdem hatte eine Arbeitsgruppe, die mit den gleichen Tieren gearbeitet und Unterschiede zwischen eigenen und fremden Ergebnissen festgestellt hatte, Spekulationen über eine unbekannte Mutation im genetischen Hintergrund entweder des Stamms der Merck Research Laboratories oder einer der beiden Kolonien, die später von den beteiligten Arbeitsgruppen aufgebaut worden waren, angestellt (Madeddu et al., 1999), was

eine Charakterisierung umso notwendiger erscheinen ließ. So verglichen wir in den beiden Stämmen die Bradykinin Konzentration in Blut und Gehirn, die Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors im Gehirn, die Größe des Versorgungsgebiets der A. cerebri media (MCA) und die Ausbildung der A. communicans posterior (PcomA), lokale Hirndurchblutung im MCA-Gebiet, Blutdruck, Blutgase, Glukose und Laktat vor, während und nach Ischämie und die Körpertemperatur.

Zunächst untersuchten wir, ob es als Kompensation für den Verlust des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors zu Veränderungen in der Konzentration von Bradykinin oder in der Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors gekommen war. Es ist allgemein bekannt, dass viele Rezeptoren herunter reguliert werden, wenn sie stark durch ihre Agonisten stimuliert werden. So wäre auch denkbar, dass es einen Regelkreis gibt, in dem die Stimulation des Rezeptors im Sinne eines Feedbacks die Produktion des Agonisten durch Regulation der Expression des diesen bildenden Systems steuert. In unserem Fall könnte eine Stimulation des B<sub>2</sub> Rezeptors die Expression von Bestandteilen des die Kinine bildenden Systems supprimieren, ergo ein kompletter Wegfall der B<sub>2</sub> Rezeptor Stimulation durch Deletion seines Gens zu einer vermehrten Produktion von Kininen führen. Da es sich beim Kallikrein-Kinin System jedoch um ein System handelt, das eine sehr akute Antwort auf pathologische Reize gibt, die an der Bildung von Kininen beteiligten Proteine also immer in ausreichender Menge vorliegen müssen, ist ein solcher Mechanismus eher unwahrscheinlich. Wir konnten keine Veränderung der Produktion von Bradykinin feststellen. Die von uns in den Gehirnen und dem Blut von wildtyp und knockout Mäusen gemessenen Bradykininkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant.

Ein weiterer möglicher Kompensationsmechanismus wäre der von Hellal et al. geäußerte Verdacht, dass in B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen als Adaption an den Rezeptorverlust der normalerweise auf extrem niedrigem Niveau exprimierte B<sub>1</sub> Rezeptor im Zentralnervensystem verstärkt konstitutiv exprimiert werden könnte (Hellal et al., 2003). Seabrook et al. hatten jedoch bereits 1997 in B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen der gleichen Herkunft durch Quantifizierung der B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA gezeigt, dass es zu keiner Verstärkung der Transkription gekommen war (Seabrook et al., 1997). Da eine Hochregulation des B<sub>1</sub> Rezeptors jedoch auch auf Ebene der Translation hätte stattfinden können, verglichen wir die Expression des Proteins des Rezeptors. Wir fanden keinen Unterschied zwischen wildtyp und knockout Mäusen. Es scheint also zu keiner kompensatorischen Hochregulation des B<sub>1</sub> Rezeptors gekommen zu sein.

Auf eine Überprüfung der Deletion des B<sub>2</sub> Rezeptor Gens verzichteten wir, da der Verlust dieses Rezeptors schon von mehreren Arbeitsgruppen in Mäusen der gleichen Herkunft der von uns verwendeten Tiere untersucht und dokumentiert worden ist. Borkowski et al. beschrieben die Deletion der gesamten den B<sub>2</sub> Rezeptor kodierenden Sequenz und die Eliminierung der Bradykinin Wirkung an der glatten Muskulatur von Ilium und Uterus sowie am Ganglion cervicale superius (Borkowski et al., 1995; Borkowski und Hess, 1995). Seabrook et al. zeigten die Abwesenheit von B<sub>2</sub> Rezeptoren in Neuronen sympathischer und sensorischer Ganglien (Seabrook et al., 1997). Das Fehlen von B<sub>2</sub> Rezeptoren wurde durch andere Gruppen bestätigt, die in den knockout Mäusen ein Ausbleiben des Abfalls des Blutdrucks nach systemischer Applikation von Bradykinin beschrieben (Alfie et al., 1997; Madeddu et al., 1997).

Als nächstes galt unsere Aufmerksamkeit der zerebrovaskulären Anatomie. Da wir in unserem Schlaganfallmodell die A. cerebri media (MCA) an ihrem Abgang aus der A. carotis interna okkludierten und somit einen Infarkt im Versorgungsgebiet der MCA induzierten, war die Größe des Infarkts unmittelbar von der Größe dieses MCA Versorgungsgebietes abhängig. Maeda et al. hatten in einer Arbeit mit Angiotensinogen knockout Mäusen auf die Möglichkeit von Veränderungen in der zerebrovaskulären Architektur hingewiesen (Maeda et al., 1999). In Anlehnung an diese Arbeit haben wir den Anteil des von der MCA versorgten Gebietes an der Hirnoberfläche bestimmt. Wir sahen einen vor allem caudal etwas kleineren Anteil. Wenn man vom ungünstigsten Fall ausgeht, dass die Aufteilung der Blutversorgung des Hirnparenchyms zwischen den Aa. cerebri media, cerebri anterior und cerebri posterior im Inneren des Gehirns in ähnlicher Weise zwischen den Stämmen variiert wie auf der Hirnoberfläche, so könnte das Gewebe, das von der MCA versorgt wird, in den B<sub>2</sub> knockout Mäusen um maximal 10% geringer sein als in wildtyp Mäusen. Auch wenn wir folglich nicht völlig ausschließen können, dass der beobachtete Unterschied in der vaskulären Architektur unsere Ergebnisse teilweise beeinflusst, steht dennoch außer Frage, dass der deutliche Unterschied im Infarktvolumen von 38% nicht ausschließlich durch die unterschiedliche Blutversorgung sondern durch die Deletion des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors bedingt ist.

Eine weitere wichtige zerebrovaskuläre Einflussgröße ist die Ausbildung der A. communicans posterior. Der Circulus arteriosus Willisii der Maus unterscheidet sich von dem des Menschen. In der Maus hat die A. cerebri posterior (PCA) ihren Ursprung nicht in der A. basilaris sondern in der A. carotis interna. Wenn in unserem Ischämiemodell der Okklusionsfaden zum Abgang der MCA vorgeschoben wird, so verlegt er nicht nur den Ursprung dieses Gefäßes sondern auch den der PCA. Nun würde nicht nur ein Infarkt im

MCA sondern auch im PCA Gebiet entstehen, wäre die PCA nicht über die A. communicans posterior (PcomA) – cave: auch hier Unterschied zur Anatomie des Menschen – mit der A. cerebelli superior (SCA), die aus A. basilaris entspringt, verbunden. Die PCA wird also, obwohl sie bei der Maus eigentlich zum vorderen Kreislauf gehört, im Falle der Okklusion über die PcomA aus dem hinteren Kreislauf mit Blut versorgt. Ob dieser Kollateralkreislauf eine suffiziente Blutversorgung gewährleisten kann, hängt von der Ausbildung der PcomA ab. In Mäusen mit keiner oder nur gering ausgebildeter PcomA würde also nicht nur das Versorgungsgebiet der MCA sondern auch das der PCA infarzieren. So zeigten Barone et al., dass Infarkt volumen und 24h-Mortalität nach permanenter MCA Okklusion in verschiedenen Mäusestämmen (BDF, CFW, BALB/c) von der Ausbildung der Anastomose zwischen PCA und SCA, also der PcomA, abhängen (Barone et al., 1993). Murakami et al. griffen diese Erkenntnis auf und entwarfen im Rahmen der Etablierung eines Modells der globalen Ischämie der Maus ein Schema zur Evaluation der Plastizität der PcomA (Murakami et al., 1998). Da dies genauso in unserem Modell von erheblicher Relevanz ist, bestimmten auch wir die Ausbildung der PcomA in B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen und ihren Kontrollen wie von Murakami et al. beschrieben, konnten jedoch keinen Unterschied finden.

Nach Untersuchung der zerebrovaskulären Anatomie als quasi statischem Faktor der Hirndurchblutung war als nächstes die Dynamik der Durchblutungsbedingungen Ziel unseres Interesses. Die Dynamik der Hirndurchblutung vor, während und nach Ischämie unterschied sich – soweit wir es beobachten konnten – in den beiden Gruppen nicht. Mit der Laser-Doppler Fluxmetrie konnten wir jedoch nur die lokale Durchblutung direkt unter der Sonde, also im Zentrum (Core) des Infarktes bestimmen. Dort war die Durchblutung während der Ischämiephase in knockout und wildtyp Mäusen in gleichem Maße, d.h. um über 80%, vermindert – vergleichbare Werte berichten Tamura et al. (Tamura et al., 1981b) – und erholte sich in der Reperfusionphase ähnlich. Die Durchblutung erreichte ihren alten Wert jedoch nicht wieder, sondern nahm nach Erreichen eines Maximums von 60-70% des Ausgangswertes 35 Minuten nach Ischämie sogar wieder leicht ab. Ähnliche Beobachtungen einer postischämischen Hypoperfusion, für die eine vor der CO<sub>2</sub> Reaktivität wiederkehrende Autoregulation verantwortlich gemacht wird, waren auch schon von anderen gemacht worden (Hossmann, 1997). Als eine weitere mögliche Erklärung wird seit langem das sogenannte „no-reflow“-Phänomen diskutiert. 1968 hatten Ames et al. erstmals Füllungsdefekte in zerebralen Gefäßen nach postischämischer Tuscheperfusion beschrieben (Ames, III et al., 1968). Theilen et al. vertraten nach Versuchen mit unterschiedlichen Ischämie modellen die Ansicht, dass es sich um kein generelles sondern um ein von den Methoden der



Ischämieinduktion abhängiges Phänomen handle (Theilen et al., 1993; Theilen et al., 1994). Als mögliche Ursachen für sein Auftreten wurden in der Literatur Fibringerinnsel, Leukozyten- und Plättchenaggregation und die Schwellung von perivaskulären Zellen, Astrozytenendfüßchen oder Endothelzellen diskutiert (Fischer et al., 1977; Kempfski und Behmanesh, 1997). De la Torre et al. kamen dagegen bei eigenen Versuchen zu dem Schluss, dass es sich bei dem beschriebenen Phänomen eher um ein methodisches post-mortem Artefakt handeln müsse (de la Torre et al., 1992). Unsere Arbeitsgruppe konnte mit Intravitalmikroskopie keine Perfusionsdefizite auf mikrovaskulärer Ebene beobachten (Kataoka et al., 2004). Abschließend geklärt sind Existenz, Ursache und Bedeutung dieses Phänomens bisher allerdings nicht. Auch wenn aus unseren Messungen, die sich auf den Infarkt kern beschränken, sich keine direkten Schlüsse auf die Durchblutungssituation im Randbereich (Penumbra) des Infarktes ziehen lassen, gehen wir davon aus, dass in beiden Stämmen die Durchblutungsverhältnisse in Core und Penumbra des Infarktes über die Zeit von Ischämie und Reperfusion die gleichen Veränderungen erfahren. Es gibt in der Literatur keinerlei Hinweise, die darauf hindeuten, dass es bei gleichen Verhältnissen im Core selektiv in der Penumbra zu Unterschieden in der Durchblutung kommen könnte.

Obwohl keine Unterschiede in den Durchblutungsverhältnissen zu beobachten waren, untersuchten wir einige chemische und physikalische Faktoren, die die Blutversorgung des zerebralen Gewebes beeinflussen können (Van Aken, 1976). Diese Faktoren haben nicht nur Einfluss auf die Ischämie sondern auch auf die Reperfusion. Im ischämischen Gebiet haben die Widerstandsgefäße ihre Reagibilität auf  $PCO_2$ - und pH-Änderungen verloren – der Einfluss von  $PO_2$  ist gegenüber dem von  $PCO_2$  und pH zu vernachlässigen. Die Gefäße des den Infarkt umgebenden gesunden Gewebes sprechen auf solche Änderungen noch an, was zu einem intrazerebralen „Steal“-Phänomen führen kann. Die Restdurchblutung während Ischämie und das Ausmaß der Wiederdurchblutung zu Beginn der Reperfusion im Infarktgebiet werden also durch pH und  $PCO_2$  beeinflusst. Bei hohem  $PCO_2$  bzw. niedrigem pH wird im Sinne eines „Steal“-Phänomens das Blut durch Dilatation der Gefäße im den Infarkt umgebenden Gewebe von diesem beansprucht, sodass dem Infarktgebiet weniger zur Verfügung steht. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Hirndurchblutung (CBF) ganz entscheidend vom Durchmesser der Gefäße (Radius = r) abhängt – nach dem Ohm'schen Gesetz ist  $CBF = \text{Perfusionsdruck } (\Delta P) / \text{Gefäßwiderstand } (R)$  und nach dem Hagen Poiseuille Gesetz  $R = (8 \eta l) / (r^4 \pi)$ . Nähme also der Gefäßdurchmesser im Periinfarktgebiet durch Dilatation um nur 10% zu, so würde die Durchblutung dieses Gebietes um fast 50% zunehmen. Während sich zwischen knockout und wildtyp Mäusen kein Unterschied im  $PCO_2$

zeigte, war der pH bei den  $B_2^{-/-}$  Tieren im Durchschnitt um 0,06 niedriger. Am größten war der Unterschied vor Ischämie. Ob dieser verminderte pH in den knockout Mäusen physiologisch ist, ließ sich nicht ermitteln, da wir Blutproben nur von narkotisierten Tieren gewinnen konnten, und somit nicht auszuschließen ist, dass der Unterschied in einem ungleichen Ansprechen auf die Narkose begründet liegt. Legt man der Beobachtung einen niedrigeren physiologischen Blut pH in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen zugrunde, so zeigt sich in beiden Gruppen ein leichter Abfall über die Zeit, der sich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheidet. Geht man jedoch von einem gleichen physiologischen Blut pH aus, so muss man in den knockout Tieren eine stärkere Vasodilatation infolge des etwas niedrigeren pHs annehmen. Für die Zeit vor Ischämie ist dies bedeutungslos, da alle Gefäße reagibel und dem gleichem Stimulus ausgesetzt sind. Während Ischämie fand sich keine signifikante Differenz im pH der beiden Gruppen. Ein Einfluss wäre also höchstens in der Zeit nach Ischämie zu erwarten. Hier könnte es in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen in etwas stärkerem Maße zu dem beschriebenen „Steal“-Phänomen kommen. Dies könnte unter Umständen die beobachtete leicht geringere Reperfusion in dieser Gruppe erklären. Wenn das „Steal“ Phänomen überhaupt von pathophysiologischer Bedeutung ist, was unseres Wissens nicht endgültig geklärt ist, so würde dies in unserer Studie am ehesten zu einer Vergrößerung der Infarkte der  $B_2^{-/-}$  Mäuse führen, was wiederum eine Unterschätzung des neuroprotektiven Einflusses der Deletion des  $B_2$  Rezeptors bedingen würde. Daher bewerteten wir den leichten Unterschied im Blut pH der beiden Mäusestämme als nicht relevant für die durchgeführten Versuche.

Eine weitere wichtige Einflussgröße ist der arterielle Blutdruck. Unter normalen Bedingungen haben zerebrale Gefäße die Fähigkeit zur Autoregulation, welche beim Menschen in einem Bereich des arteriellen Blutdrucks von 60-80 bis 150-200mmHg eine konstante Durchblutung des Gehirns erlaubt (Van Aken, 1976). Da die Autoregulation aber im ischämischen Gewebe aufgehoben ist und nach Reperfusion auch nur langsam wiederkehrt, übertragen sich in unserem Modell Unterschiede im Blutdruck nach dem Ohm'schen Gesetz direkt auf die Durchblutung im gefährdeten Hirnareal. So hängt während der Ischämie die Höhe der Restdurchblutung des MCA Gebietes über Kollateralen zur ACA oder PCA direkt vom Blutdruck ab. Auch steigt die Reperfusion nach Entfernen des Okklusionsfadens mit dem Blutdruck und gewährleistet über eine Erhöhung des zerebralen Perfusionsdrucks, der sich aus der Differenz von arteriellem Blutdruck und intrakraniell Druck ergibt, eine bessere Versorgung des gefährdeten Bereichs mit Substraten. Jedoch bringt ein höherer Blutdruck neben Vorteilen auch Nachteile. Er erhöht die Gefahr von Hämorrhagien im Infarkt und fördert die Bildung des Hirnödems über eine Erhöhung des

transmuralen Drucks. Diese vielen potentiellen Einflüsse des mittleren arteriellen Blutdrucks auf die Pathophysiologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie zeigen, dass es sehr wichtig ist zu klären, ob Unterschiede im Blutdruck zwischen  $B_2^{-/-}$  Mäusen und ihren Kontrollen vorliegen. Die Bedeutung der Deletion des Kinin  $B_2$  Rezeptor Gens für das kardiovaskuläre System und den systemischen Blutdruck ist von verschiedenen Labors an anästhesierten wie nicht anästhesierten Mäusen beobachtet worden. Die meisten Arbeitsgruppen, die den Blutdruck in  $B_2^{-/-}$  Mäusen untersucht haben, fanden in diesen Mäusen, wenn sie unter normaler Diät gehalten wurden, keine Veränderung des Blutdrucks (Alfie et al., 1996; Alfie et al., 1997; Hellal et al., 2003; Milia et al., 2001; Trabold et al., 2002). Unter salzreicher Diät entwickelten sie hingegen einen höheren Blutdruck als ihre wildtyp Kontrollen (Alfie et al., 1996; Alfie et al., 1997; Cervenka et al., 1999). In zwei Labors entwickelten die Tiere jedoch auch unter normaler Diät eine moderate arterielle Hypertonie, allerdings erst ab einem Alter von ca. 2 Monaten, während die anderen eine solche Entwicklung nicht beobachten konnten (Cervenka et al., 1999; Emanuelli et al., 1999; Madeddu et al., 1997; Madeddu et al., 1999). Diese Diskrepanzen können zumindest teilweise durch Unterschiede im genetischen Hintergrund der  $B_2^{-/-}$  Mäuse, der 129Sv/J, 129SvEv oder C57/BL6 war, erklärt werden. Es wäre aber auch denkbar, dass sie ihre Ursache darin haben, dass in den Studien der beiden Labors, die eine arterielle Hypertension beschreiben, keine Geschwistertiere als Kontrollen verwendet wurden sondern Mäuse eines anderen Stammes, der zum genetischen Hintergrund der  $B_2^{-/-}$  Mäuse passte. Es ist bekannt, dass es unter solchen Bedingungen zu einer genetischen Verschiebung zwischen Mutanten und Kontrollen kommen kann, die eine genaue Bestimmung des Effektes der Mutation auf den Phänotyp verhindern kann. Aufgrund unserer eigenen Untersuchungen, bei denen wir in Narkose keinen unterschiedlichen Blutdruck in den  $B_2^{-/-}$  und C57/BL6 Mäusen messen konnten, und der Tatsache, dass die von uns für Versuche verwendeten Tiere deutlich jünger als 2 Monate waren, gehen wir von einem normotensiven Phänotyp unserer  $B_2^{-/-}$  Mäuse auch in nicht narkotisiertem Zustand aus.

Es gibt aber auch einige Faktoren, die nicht über die Beeinflussung der Durchblutung sondern direkt auf die Infarktentstehung Einfluss nehmen. So ist der Hauptgrund für die ischämische Schädigung die mit der Hypoperfusion verbundene Hypoxie. Der arterielle  $PO_2$  der Rest- oder Wiederdurchblutung ist mitbestimmend für das Ausmaß der Hypoxie des Hirngewebes und somit auch für die ischämische Schädigung. In den von uns durchgeführten Blutgasmessungen war der  $PO_2$  des arteriellen Blutes in beiden Mäusestämmen gleich, sodass

eine auf einem unterschiedlichen Sauerstoffpartialdruck des Blutes basierende Ungleichheit in der Sauerstoffversorgung des geschädigten Gewebes ausgeschlossen werden kann.

Auch Glukose und Laktat können einen Einfluss auf die Infarktentstehung haben. Siemkowicz et Hansen zeigten, dass hyperglykämie Ratten nach 10minütiger globaler Ischämie Krampfanfälle bekamen und innerhalb weniger Stunden verstarben, und ein hypoglykämischer Zustand zu deutlichen neurologischen Defiziten führte, wenngleich die Tiere meist überlebten (Siemkowicz und Hansen, 1978). Ratten mit einer normalen Blutglukosekonzentration erholten sich hingegen fast vollständig von der Ischämie. Die Hyperglykämie scheint über eine Erhöhung der Laktatkonzentration die Azidose im Gehirn zu verstärken, v.a. wohl während der Reperfusion (Chopp et al., 1988). Die – nicht signifikant – höhere Blutglukosekonzentration unserer  $B_2^{-/-}$  Mäuse korrelierte mit einer höheren Blutlaktatkonzentration, welche in der Reperusionsphase sogar signifikant höher war als in den C57/Bl6 Mäusen. Dieser Unterschied, der wahrscheinlich auch für den niedrigeren Blut pH in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen verantwortlich ist, könnte über eine Verstärkung der Azidose im Infarktgebiet einen zusätzlich schädigenden Effekt auf das ischämische Hirngewebe haben. Dies lässt vermuten, dass wir den neuroprotektiven Effekt der  $B_2$  Rezeptor Deletion eher noch unterschätzen.

Ein extrem potenter Faktor der Neuroprotektion, der auch klinisch eingesetzt wird, ist die Hypothermie. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass sowohl intraoperative (Karibe et al., 1994a; Karibe et al., 1994b; Minamisawa et al., 1990) als auch postoperative (Busto et al., 1989; Connolly, Jr. et al., 1996; Zhang et al., 1993) Hypothermie einen stark neuroprotektiven Effekt bei zerebraler Ischämie hat. Mit Hypothermie behandelte Tiere entwickelten ein geringeres Hirnödem und kleinere Infarkte. Als Ursache dieser Protektion wurde von den Autoren neben Veränderungen der Hirndurchblutung, des Energiemetabolismus oder der Menge freier Fettsäuren v.a. eine verminderte Freisetzung von Neurotransmittern verantwortlich gemacht. Da die Tiere nicht in der Lage sind, ihre Körpertemperatur während Narkose selbst zu regulieren, wurde ihre Körpertemperatur in dieser Zeit rektal gemessen und mit einer Heizmatte auf  $37\pm 0,1^\circ\text{C}$  gehalten. Für die Zeit zwischen den Narkosen zur Induktion und zur Beendigung der Ischämie sowie für die erste Stunde der Reperfusion wurden sie in einen auf  $32^\circ\text{C}$  geheizten Inkubator gegeben, um sich zu erholen und die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wiederzuerlangen. Auf diese Weise wurden Unterschiede in der Körpertemperatur während der akuten Phase des Versuchs ausgeschlossen. Was passiert, wenn man darauf nicht achtet, zeigten Connolly et al. an C57/Bl6 Mäuse, die nach transientser MCA Okklusion nicht im Inkubator gewärmt und

dadurch hypotherm wurden. Diese hatten ein um 77% kleineres Infarktvolumen (Connolly, Jr. et al., 1996). Obwohl Hellal et al. bereits berichtet hatten, dass die  $B_2^{-/-}$  Mäuse normotherm sind (Hellal et al., 2003), maßen wir, um Unterschiede in der Körpertemperatur der beiden Mäusestämme in der chronischen Phase auszuschließen, die rektale Temperatur der Mäuse 12, 24 und 48 Stunden nach Ischämie. Da sich bei diesen Messungen keine Differenzen in der chronischen Phase zeigten und durch unseren Versuchsaufbau die Körpertemperatur in der akuten Phase künstlich aufrecht erhalten wird, kann man davon ausgehen, dass die Resultate der transienten fokalen zerebralen Ischämie nicht durch Unterschiede in der Körpertemperatur beeinflusst wurden.

Als Kernstück unserer Studie war die Untersuchung der Rolle des Kinin  $B_2$  Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie mit Hilfe von  $B_2^{-/-}$  Mäusen geplant. Da es uns aus technischen Gründen nicht möglich war als Kontrollen Geschwistertiere dieser knockout Mäuse zu verwenden, mussten wir auf normale wildtyp Mäuse des Stammes C57/Bl6, der den genetischen Hintergrund der  $B_2^{-/-}$  Mäuse darstellt, zurückgreifen. Es war denkbar, dass sich diese beiden Stämme in mehr als nur der Deletion des Gens für den Kinin  $B_2$  Rezeptor unterscheiden, weshalb wir sie hinsichtlich einiger Faktoren, die einen Einfluss auf unsere Versuche hätten haben können, charakterisieren und vergleichen mussten. In unserer ausführlichen Charakterisierung fanden wir kaum Unterschiede. Die  $B_2^{-/-}$  Mäuse hatten ein etwas kleineres MCA Versorgungsgebiet, was für einen geringfügig kleineren zerebralen Schaden in diesen Mäusen nach transienter MCA Okklusion mitverantwortlich sein könnte. Der einzige weitere Unterschied, den wir beobachteten, war eine leichte Laktazidose der  $B_2^{-/-}$  Mäuse, die die ischämische Schädigung des Gehirns verstärkt haben könnte. Unter Umständen unterschätzen wir also sogar den Einfluss des Kinin  $B_2$  Rezeptors auf die Entstehung des ischämischen Hirnschadens. Da sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen gezeigt haben, sind wir der Ansicht, dass es sich bei den C57/Bl6 Mäusen um valide Kontrollen für unsere Ischämieversuche handelt.

### 4.1.3 Anästhesie

Da alle Narkotika im ZNS wirken, muss davon ausgegangen werden, dass sie dort auch Einflüsse ausüben, die für die Folgen einer transienten fokalen zerebralen Ischämie relevant sind. Gegenüber Injektionsnarkotika haben volatile Narkotika den großen Vorteil, dass sie durch schnelles An- und Abfluten sehr gut steuerbar sind, was bei sehr kurzen OP-Zeiten, wie sie in der vorliegenden Arbeit auftraten, sehr nützlich ist. Wir entschieden uns für eine Narkose mit dem volatilen Narkotikum Halothan, weil es relativ preiswert ist und in der tierexperimentellen Forschung – auch in der Ischämieforschung – weite Verbreitung findet. Trotzdem war es uns ein besonderes Anliegen, die Narkosezeiten durch zügiges Operieren und Aufwachen lassen der Tiere während der Ischämie so kurz wie möglich zu halten. Für kurze Narkosezeiten war es nötig, die Mäuse spontan atmen zu lassen, statt sie zu intubieren und kontrolliert zu beatmen. Spontanatmung hat jedoch den Nachteil, dass auch eine nur leichte Überdosierung von Halothan zur Atemdepression führt. Daher war es äußerst wichtig, in Vorversuchen ein Narkoseprotokoll zu etablieren, das eine ausreichende Narkosetiefe und Analgesie sicher stellte, ohne zu einer relevanten Depression von Atmung und Kreislauf zu führen. Unser Narkoseprotokoll entwickelten und optimierten wir an 8 Tieren, an denen während einer einstündigen Narkose regelmäßige Blutdruckmessungen und vier Blutgasanalysen durchgeführt wurden. Volatile Narkotika im Allgemeinen und Halothan im Besonderen können aber einige für Ischämieversuche relevante Wirkungen auf das ZNS haben.

Bereits mehrere tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass in Halothannarkose der arterielle Blutdruck (Brussel et al., 1991; Warner et al., 1993) und die CMRO<sub>2</sub> (cerebral metabolic rate of oxygen consumption) (Brussel et al., 1991; Harp et al., 1976) linear mit steigender Halothankonzentration abnehmen. Während niedrige Konzentrationen zu einer Reduktion der Hirndurchblutung führten, resultierten höhere Konzentrationen in einer Erhöhung der Durchblutung (Brussel et al., 1991; Harp et al., 1976; Smith et al., 1973). Die diesem zugrunde liegende Vasodilatation bewiesen Koenig et al. in intravitalmikroskopischen Untersuchungen an Ratten, wobei sie eine stärkere Dilatation der Arteriolen als der Venolen sahen (Koenig et al., 1993). Die Vasodilatation zeigte sich in einer Aufhebung der Autoregulation – die Durchblutung schwankte mit dem arteriellem Blutdruck (Brussel et al., 1991). Dies konnten wir auch in unseren eigenen Experimenten feststellen. Wir beobachteten synchrone Schwankungen des arteriellen Blutdrucks und der zerebralen Durchblutung. Während sich eine Verminderung des arteriellen Blutdrucks durch eine entsprechende

Abnahme des zerebralen Perfusionsdrucks per se nachteilig auswirken könnte, könnten eine verminderte Sauerstoffnachfrage ( $CMRO_2$ ) und eine Steigerung der Durchblutung durch Vasodilatation bei der Ischämie von Vorteil sein. Die generelle Aufhebung der Autoregulation könnte aber auch den im ischämischen Gewebe durch Hypoxie und Azidose bedingten Ausfall der Autoregulation und die damit verbundene relative Umverteilung der Blutversorgung zugunsten dieses Gewebes nivellieren. Dass die Auswirkungen einer Halothannarkose wirklich neuroprotektiv sind und sich in einer Verkleinerung des Infarktes widerspiegeln, zeigten verschiedene Arbeitsgruppen (Nellgard et al., 2000; Saito et al., 1997; Warner et al., 1993). Nicht nur für die Ischämie sondern auch für das Trauma ist ein neuroprotektiver Effekt gezeigt worden (Salzman et al., 1993). Trotz dieses deutlichen Effekts sind volatile Anästhetika bei weitem nicht die protektivsten. Das Barbiturat Methohexital z.B. schützt noch sehr viel besser, obwohl die Hirndurchblutung viel geringer und die  $CMRO_2$  gleich ist wie bei Halothan (Warner et al., 1991). Es können also nicht nur die genannten Mechanismen für die neuroprotektive Wirkung verantwortlich sein. So scheint Halothan des weiteren die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat zu hemmen (Miao et al., 1995), dessen Rezeptor zu inhibieren (Narimatsu et al., 1996) und die Affinität des GABA Rezeptors zu erhöhen (Harris et al., 1994). Während Glutamat die neuronale Schädigung der Ischämie verstärkt, wirkt der inhibitorische Neurotransmitter GABA ( $\gamma$ -Amino-Buttersäure) protektiv (Madden, 1994) – Halothan schützt also die Neuronen durch Verminderung ihrer Erregbarkeit. Ferner wird vermutet, dass Halothan durch eine Verminderung der Eisenaufnahme der Zelle die Bildung freier Radikale reduziert, und somit der durch oxidativen Stress und mitochondriale Depolarisation verursachten Schädigung entgegen wirkt (Kudo et al., 2001). Es wäre jedoch auch eine direkte stabilisierende Wirkung von Halothan auf das mitochondriale Membranpotential denkbar.

Auf die Bedeutung der Neuroprotektion durch Halothan per se und ihre möglichen Mechanismen soll hier nicht genauer eingegangen werden. Für uns ist entscheidend, dass es keine Hinweise darauf gibt, dass die Narkose mit Halothan mit dem Kallikrein-Kinin System allgemein oder dem Kinin  $B_2$  Rezeptor im Besonderen interferiert. Daher gehen wir davon aus, dass der bekannte Einfluss von Halothan auf die Entwicklung des sekundären Hirnschadens in  $B_2^{-/-}$  wie wildtyp C57/Bl6 Mäusen in gleichem Maße zum tragen kommt, der Vergleich der Daten beider Gruppen also nicht durch die Narkose verfälscht wird.

## 4.2 Das Kallikrein-Kinin System im Zentralnervensystem

Bevor man die Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie untersuchen will, ist es wichtig zu wissen, ob dieses System überhaupt mit all seinen Bestandteilen im Zentralnervensystem präsent ist. Der Nachweis sämtlicher Bestandteile ist allerdings nicht notwendig, da viele von ihnen sowohl in einer inaktiven Vorform als auch der aktivierten Form bestehen. So lässt sich aus dem Nachweis von tissue und plasma Kallikrein (Cerf und Raidoo, 2000; Chao et al., 1983; Kizuki et al., 1994; Mahabeer et al., 2000; Raidoo et al., 1996b; Scicli et al., 1984) auf die Existenz des gesamten die Kinine bildenden Systems, also Prä-Kallikreinen und die diese aktivierenden Enzymen (Prä-Kallikreinasen), schließen. Ebenso verhält es sich mit den Kininen und ihren Vorstufen, den Kininogenen. Da das Vorkommen von Kininen im Gehirn von vielen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Correa et al., 1979; Kariya et al., 1982b; Kariya et al., 1985; Perry und Snyder, 1984; Shi et al., 1998; Xu et al., 1991; Yamauchi et al., 1985), müssen auch Kininogene vorhanden sein. Damit die Kinine aber überhaupt einen Einfluss auf das ZNS ausüben können, bedarf es der Kinin Rezeptoren. Der konstitutiv exprimierte Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor wurde in Gehirnen von Menschen (De Sousa et al., 2002; Mahabeer et al., 2000; Raidoo et al., 1996a; Raidoo und Bhoola, 1997) sowie verschiedenen Tieren nachgewiesen (Chen et al., 2000; Fujiwara et al., 1988; Fujiwara et al., 1989; Murone et al., 1996; Murone et al., 1997; Ongali et al., 2003; Privitera et al., 1992; Privitera et al., 2003; Shi et al., 1999). Über diesen Rezeptor wirken hauptsächlich das Nonapeptid Bradykinin (Aminosäuresequenz Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) und das Dekapeptid Kallidin (Aminosäuresequenz Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Am Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor, der im Gehirn kaum konstitutiv sondern erst nach Stimulation exprimiert wird (Mahabeer et al., 2000; Marceau et al., 1998; Raidoo und Bhoola, 1997; Regoli und Barabe, 1980), wirken in erster Linie die Peptide des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin. Diese werden durch Abspaltung des C-terminalen Arginin durch die Kininase I gebildet und sind somit Degradationsprodukte von Bradykinin und Kallidin. Auch dieses Bradykinin inaktivierende System, dessen Produkte bis auf die beiden genannten B<sub>1</sub> Rezeptor Agonisten inaktiv sind, ist im ZNS nachgewiesen worden (Kariya et al., 1981b; Orawski und Simmons, 1989). Für die Degradation in der zerebralen Mikrozirkulation scheinen vor allem das Angiotensin Converting Enzyme (ACE; Kininase II) (Alexiou et al., 2005; Correa et al., 1986; Correa et al., 1990) und Metalloendopeptidasen EC 3.4.24.15 und EC 3.4.24.16



(Norman et al., 2003) wichtig zu sein. Auf den gesamten Körper bezogen scheint die Inaktivierung in der zerebralen Mikrozirkulation nicht von Bedeutung zu sein. Bradykinin wird vor allem durch ACE am oder nahe des Endothels von Blutgefäßen der Lunge oder NEP (Neutrale Endopeptidase) in der Niere hydrolysiert und schnell aus der Zirkulation eliminiert (Norman et al., 2003; Ryan et al., 1968).

#### **4.2.1 Bedeutung des Kallikrein-Kinin Systems im Zentralnervensystem**

Bei den Kininen handelt es sich um Entzündungsmediatoren, deren Bildung im Gewebe zu den klassischen Entzündungszeichen Rubor, Calor, Tumor und Dolor führt (Couture et al., 2001; Lee et al., 2002).

Neben dieser pathophysiologischen Bedeutung im Rahmen entzündlicher Prozesse scheint dem Kallikrein-Kinin System auch eine physiologische Bedeutung im Zentralnervensystem zuzukommen. Ein deutlicher Hinweis darauf ist z.B. das Vorhandensein sämtlicher Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems im ZNS. Der fehlende Phänotyp von B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen lässt jedoch vermuten, dass diese Funktion von anderen Systemen kompensiert wird. Welche genaue physiologische Funktion das Kallikrein-Kinin System im Gehirn hat, ist bisher allerdings nicht geklärt.

Wie in der Einleitung bereits etwas genauer dargelegt, scheint das System v.a. in der zentralen sympathoneuronalen Blutdruckregulation eine Rolle zu spielen (Brooks et al., 1986; Caligiorno et al., 1996; Graeff et al., 1969; Hoffman und Schmid, 1978; Lindsey et al., 1997; Madeddu et al., 1996; Qadri et al., 1999). Eine Erhöhung des Sympthotonus führt dabei wohl nicht nur zu einer Erhöhung des Blutdrucks sondern auch zu Hyperventilation und einer exzitatorischen Verhaltensänderung, die bei Kaninchen von erhöhter Wachsamkeit, Fluchtreaktion und Vokalisationen, bei der Ratte von Unruhe und Zittern geprägt ist (Graeff et al., 1969; Kariya et al., 1981a; Kariya et al., 1982a; Kariya und Yamauchi, 1981). Des weiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Wahrnehmung und Verarbeitung von Schmerz (Couto et al., 1998; Levy und Zochodne, 2000; Ribeiro et al., 1971; Rupniak et al., 1997; Steranka et al., 1988), der Thermoregulation (Almeida e Silva TC und Pela, 1978) und der Ausschüttung von Gonadotropin Releasing Hormon (Shi et al., 1998; Shi et al., 1999).

Diese möglichen physiologischen Bedeutungen seien aber nur am Rande erwähnt. Für uns steht die pathophysiologische Bedeutung im Vordergrund. Eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin System wurde bisher in so unterschiedlichen neurologischen Krankheitsbildern wie der zerebralen Ischämie, dem Schädel-Hirn Trauma, der Meningitis oder auch der Epilepsie gefunden. Unterberg et al. zeigten 1986 bei der Kälteläsion am Kaninchen, einem Modell des Schädel-Hirn Traumas, dass eine Hemmung des Enzyms Kallikrein durch Apotinin oder Soybean Tripsin Inhibitor – und damit der Bildung der Kinine – zu einer Verminderung des Hirnödems führte (Unterberg et al., 1986). Dass Apotinin und Soybean Tripsin Inhibitor das Hirnödem auch bei der zerebralen Ischämie vermindern, bewiesen Kamiya et al. (Kamiya et al., 1993). Diese Untersuchungen legen zwar eine Beteiligung von Kininen an der Pathophysiologie nahe, über welchen Kinin Rezeptor diese jedoch Einfluss auf die Ödementstehung ausüben, bleibt unklar. Dass hierfür eine Aktivierung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors verantwortlich ist, zeigt eine ganze Reihe von Untersuchungen mit B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten. Während durch eine Hemmung von B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Rezeptoren mit dem B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten B 9430 bei der globalen Ischämie des Gerbils keine Verminderung des Schadens zu erreichen war (Lehmborg et al., 2000), führte eine alleinige Hemmung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors mit den selektiven Antagonisten CP 0597 oder LF 16-0687Ms bei der transienten MCA-Okklusion an der Ratte zu einer Reduktion von Infarkt volumen und Hirnödem um jeweils etwa die Hälfte (Relton et al., 1997; Zausinger et al., 2002). Bei der Maus fiel die Protektion durch LF 16-0687Ms mit einer Verminderung von Infarkt volumen und Hirnödem um circa ein Drittel etwas geringer aus (Ding-Zhou et al., 2003). Einen vergleichbaren Schutz zeigten B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten auch in verschiedenen Modellen des Schädel-Hirn Traumas. In der Kälteläsion an der Ratte führte die Applikation des B<sub>1</sub> Rezeptor Antagonisten B 9858 zu keinem Schutz, während die B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten Hoe 140 und LF 16-0687Ms Läsionsvolumen und Ödem signifikant verminderten (Gorlach et al., 2001; Plesnila et al., 2001a). Diese Protektion durch LF 16-0687Ms wurde von mehreren Arbeitsgruppen in anderen Modellen des Schädel-Hirn Traumas, dem Controlled Cortical Impact an der Ratte (Kaplanski et al., 2002; Kaplanski et al., 2003; Stover et al., 2000) sowie dem Closed Head Trauma an Ratte und Maus (Hellal et al., 2003; Pruneau et al., 1999), bestätigt. Auch beim Rückenmarkstrauma konnte die Störung der Blut-Rückenmark Schranke durch den B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten B 9430 vermindert werden (Pan et al., 2001). Sogar für die Pneumokokkenmeningitis konnte eine pathophysiologische Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems aufgedeckt werden. In einer Arbeit von Lorenzl et al. bewirkte der B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten Hoe 140 bei der

Pneumokokkenmeningitis der Ratte eine Abschwächung des pathologischen Anstiegs von Hirndurchblutung, intrakraniellm Druck und Hirnwassergehalt (Lorenzl et al., 1996).

Dass das Kallikrein-Kinin System nicht nur unter tierexperimentellen Bedingungen bei zerebralen Pathologien von Relevanz ist, zeigen verschiedene klinische Studien. Kasuya et al. berichteten, dass in Patienten mit Subarachnoidalblutung (SAB) die Konzentration an Bradykinin im Liquor am Tag des Geschehens  $122,7 \pm 22,7 \text{ pg/ml}$  (Kontrolle  $8,0 \pm 3,3 \text{ pg/ml}$ ) betrug und nach drei Tagen wieder auf  $17,1 \pm 3,0 \text{ pg/ml}$  abfiel (Kasuya et al., 1988). Auch im Plasma war die Bradykinin Konzentration erhöht. Dafür ist wahrscheinlich eine starke Aktivierung des Gerinnungssystems im Subarachnoidalraum nach SAB verantwortlich. Doch nicht nur bei der SAB sondern auch – und für uns viel wichtiger – bei der zerebralen Ischämie kommt es zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems. Makevnina et al. beobachteten in Patienten, die sich einer Carotis Angioplastie unterziehen mussten, eine solche Aktivierung während der zerebralen Ischämie und der postischämischen Reperfusion (Makevnina et al., 1994). Interessant ist, dass eine negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems und dem Grad der neurologischen Verbesserung zu bestehen scheint. Während es in Patienten mit einer Verbesserung des neurologischen Status nur zu einer Aktivierung des Gewebs-Kallikrein-Kinin Systems kam, zeigten Patienten ohne neurologische Verbesserung oder gar mit vorübergehender Verschlechterung eine Aktivierung von Gewebs- und Plasma-Kallikrein-Kinin System. Wagner et al. fanden im Plasma von Patienten mit Media-Territorialinfarkt eine Erhöhung des Kinins Kallidin (Lysylbradykinin) (Wagner et al., 2002). Eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems beim Schlaganfall des Menschen kann, obwohl bisher nicht direkt nachgewiesen, als sehr wahrscheinlich gelten. Unseres Wissens gibt es jedoch noch keine klinische Studie, die die therapeutischen Möglichkeiten einer Hemmung dieses Systems untersucht hat. Für das Schädel-Hirn Trauma gibt es solche Studien. Narotam et al. zeigten einen deutlichen protektiven Effekt des B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten CP-0127 (Narotam et al., 1998). Patienten, die diesen Antagonisten erhielten, mussten sich nur in 1/11 statt 7/9 Fällen einer Operation unterziehen. Ihr Zustand verschlechterte sich nicht so stark (GCS  $-0,6$  vs.  $-4,0$ ), und der intrakranielle Druck stieg nicht so weit an ( $+9,5 \text{ mmHg}$  vs.  $+21,9 \text{ mmHg}$ ). Diese Unterschiede wären ohne die durchgeführten Kraniotomien, die v.a. in der Kontrollgruppe nötig waren, noch deutlich größer. Die von Marmarou et al. 1999 veröffentlichten Ergebnisse der prospektiven, randomisierten, doppelt verblindeten klinischen Phase II Studie für CP-0127 beim Schädel-Hirn Trauma zeigten positive Trends für den intrakraniellen Druck, das Therapy Intensity Level, den Glasgow Outcome Score und die neuropsychologischen

Resultate (Marmarou et al., 1999). Desweiteren betrug die 28-Tage Mortalität der mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten behandelten Patienten nur 20% statt 27%. Diese übereinstimmenden positiven Trends sind ein weiterer starker Hinweis darauf, dass Bradykinin Antagonisten eine neuroprotektive Rolle beim schweren Schädel-Hirn Trauma spielen könnten. Die Studie musste aus technischen Gründen jedoch leider abgebrochen werden, sodass es bisher kein abschließendes Urteil zur Wirksamkeit von B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten nach Schädel-Hirn Trauma gibt.

#### **4.2.2 Mögliche Wege der Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie**

Völlig unklar ist bisher noch, wie es bei der zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems kommt und über welche Mechanismen sich dieses an der Schädigung des Gehirns beteiligt. Dass die Bildung der Kinine aus einer Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Kininogenen und dem Endothel resultieren könnte, halten Maier-Hauff et al. für möglich (Maier-Hauff et al., 1984). Auch könnte eine erhöhte Neigung zur Plättchenaggregation verbunden mit einer pH Verschiebung zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems während Ischämie führen. Ist die Aktivierung erst einmal in Gang gesetzt, so scheint es mehrere Möglichkeiten der Aufrechterhaltung und sogar Verstärkung zu geben. Maier-Hauff et al. spekulierten, dass nach einer initialen Störung der Blut-Hirn Schranke durch z.B. eben genannte intravasale Aktivierung mit der Ödemflüssigkeit Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems ins Gehirnparenchym gelangen und dort das fein austarierte Gleichgewicht aus Aktivierung und Hemmung zusammenbrechen lassen könnten (Maier-Hauff et al., 1984). Die vermehrt gebildeten Kinine könnten zu einer weiteren Permeabilitätserhöhung führen und auf diese Weise einen Circulus vitiosus in Gang setzen. Camargo et Graeff haben gezeigt, dass Kininasen ihre optimale Enzymaktivität bei einem pH von 7,3-7,6 entfalten und bei einem pH unter 5,5 oder über 8,0 inaktiv sind (Camargo und Graeff, 1969). Aus dieser Erkenntnis ließe sich schließen, dass die durch Ischämie bedingte Azidose zu einer Verminderung der Inaktivierung der Kinine und dadurch einer höheren Kininkonzentration im Gewebe führt. Ein anderer selbstverstärkender Mechanismus könnte darin bestehen, dass Kallikrein ein sehr potenter Aktivator des Faktors XII der Blutgerinnung zu Faktor XIIa ist. Der Faktor XIIa wiederum aktiviert Präkallikrein zu dem proteolytisch

aktiven Enzym Kallikrein, welches für die Bildung der Kinine verantwortlich ist (Zausinger, 2003). Auch wenn all diese Spekulationen zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems plausibel klingen, ist bisher jedoch noch für keine der genannten Möglichkeiten deren Einfluss auf das neuropathologische Geschehen bewiesen worden.

Eine ebenso bedeutende Frage wie die Aktivierung selbst ist, wie das Kallikrein-Kinin System nach seiner Aktivierung am neuropathologischen Prozess beteiligt ist und über welche Mechanismen es zu einer Schädigung des Gewebes beiträgt. Um diese Frage klären zu können bzw. um Möglichkeiten der schädigenden Einflussnahme auf das Geschehen aufzudecken, ist es zunächst nötig, die intrazelluläre Signaltransduktion zu beschreiben. Während dieser Signaltransduktion kommt es intrazellulär zu Vorgängen, die die Zelle theoretisch schädigen könnten. Da die Signaltransduktion beider Kinin Rezeptoren gleich oder zumindest extrem ähnlich zu verlaufen scheint, soll sie hier am Beispiel des konstitutiv exprimierten und besser erforschten B<sub>2</sub> Rezeptors dargelegt werden. Nach Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems wird Bradykinin gebildet, das Hauptagonist am Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor ist. Dieser Rezeptor ist aus Gewebe der von uns verwendeten C57/Bl6 Mäuse (Allogho et al., 1995) und anderer Tiere (Eggerickx et al., 1992; Hess et al., 1992; Hess et al., 1994; Pesquero et al., 1996a; Raidoo und Bhoola, 1998; Regoli et al., 1996) isoliert und pharmakologisch ausführlich charakterisiert worden. Dabei zeigte sich, dass es zwischen den Spezies teilweise deutliche Unterschiede in der Selektivität, Affinität und partiell agonistischen Wirkung von B<sub>2</sub> Rezeptor Agonisten bzw. Antagonisten gibt. Diese Differenzen beruhen wohl nicht zuletzt auf Unterschieden in der kodierenden Sequenz des B<sub>2</sub> Rezeptor Gens und daraus folgenden Unterschieden in der Aminosäuresequenz. So war die genomische Sequenz des von Hess et al. charakterisierten B<sub>2</sub> Rezeptors der Maus zu 92% identisch mit der der Ratte, zu 84% mit der des Menschen und zu 99% mit der des von McIntyre et al. (Ref. 404) charakterisierten Maus Rezeptors (Hess et al., 1994; McIntyre et al., 1993). Die genomische B<sub>2</sub> Rezeptor Sequenz des Menschen unterschied sich von der der Ratte sogar um 19% (Eggerickx et al., 1992; Hess et al., 1992). Dieser B<sub>2</sub> Rezeptor des Menschen bestand aus 364 Aminosäuren, die sieben transmembrane Segmente bildeten, und hatte ein Molekulargewicht von ca. 41kDa.

Der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor ist an ein G-Protein gekoppelt, das die Phospholipase C (PLC) aktiviert (Hess et al., 1994; Higashida et al., 1986; Lambert et al., 1986). Eine Zusammenlagerung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors mit einem AT1 Rezeptor zu einem stabilen Heterodimer verstärkt die Aktivierung der G-Proteine (Abdalla et al., 2000). Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wobei Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)

(Homayoun und Harik, 1991; Jackson et al., 1987; Martin und Michaelis, 1988; Roscher et al., 1990) und Diacylglycerin entsteht (Gammon et al., 1989).

Das IP<sub>3</sub> führt zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum (Easton und Abbott, 2002; Jackson et al., 1987; Morgan-Boyd et al., 1987; Reiser und Hamprecht, 1985). Diese Erhöhung des freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup> scheint aber nicht nur durch die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum bedingt zu sein. Nach initialer Depolarisation der Zelle durch dieses intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> werden wohl spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle geöffnet, über die extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> einströmt und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration weiter erhöht wird (Gammon et al., 1989; Gimpl et al., 1992; Schilling et al., 1989). Ferner scheint über einen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanal K<sup>+</sup> aus der Zelle zu strömen (Noda et al., 2003). Außerdem stimuliert Ca<sup>2+</sup> die NO Synthase, welche aus L-Arginin NO herstellt (Blatter et al., 1995; Grolach und Wahl, 1996; Palmer et al., 1988). Das Substrat L-Arginin wird teilweise durch die Degradation von Bradykinin und Kallidin zu des-Arg-Bradykinin bzw. des-Arg-Kallidin durch die Kininase I zur Verfügung gestellt und seine Aufnahme in die Zelle ist direkt an die NO Produktion gekoppelt (Bogle et al., 1991). NO wiederum aktiviert die Guanylatcyclase, die aus GTP cGMP herstellt (Murad, 1996; Reiser et al., 1984; Schini et al., 1990).

Ein von Bareis et al. diskutierter alternativer Weg des Anstiegs der Konzentration von freiem intrazellulären Ca<sup>2+</sup> ist ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der auf einer Erhöhung der Membranfluidität basiert (Bareis et al., 1983). Diese Erhöhung der Membranfluidität wird nach Ansicht der Autoren durch Methylierung von Membranproteinen nach Aktivierung der Methyltransferase durch Bradykinin induziert. Da Ca<sup>2+</sup> neben der beschriebenen Stimulation der NO Synthase auch zu einer Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> führt, könnten auch auf diese Weise zwei wichtige Wege der Signaltransduktion reguliert werden.

Das durch die PLC hergestellte Diacylglycerin wird unter Abspaltung von Arachidonsäure durch die Diacylglycerinlipase, die durch die hohe intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration stimuliert wird (Francel, 1992), zu Monoacylglycerin umgewandelt, welches unter erneuter Abspaltung von Arachidonsäure zu Glycerin abgebaut wird (Farooqui et al., 1990). Die hierbei anfallende Arachidonsäure wird entweder von der Lipoxygenase zu Leukotrienen (Piomelli et al., 1987) oder von der Cyclooxygenase zu Prostaglandinen (Burch und Axelrod, 1987; Luckhoff et al., 1988) verarbeitet. Die gebildeten Prostaglandine aktivieren über einen Prostaglandin Rezeptor die Adenylatcyclase, die aus ATP cAMP herstellt (Bareis et al., 1983). Das cAMP scheint im Sinne eines negativen Feedbacks die Aktivität des B<sub>2</sub> Rezeptors zu hemmen (Francel et al., 1987).

Das Diacylglycerin wird aber nicht nur in mehreren Schritten degradiert, wobei aktive Metabolite entstehen, sondern es aktiviert auch direkt die Proteinkinase C (PKC) (Nishizuka, 1984). Hier wird ein weiterer negativer Feedback-Mechanismus vermutet. Die PKC scheint den Rezeptorkomplex zu phosphorylieren und dadurch zu inhibieren (Burch und Axelrod, 1987; Lambert et al., 1986). Die wichtigste Funktion von PKC ist jedoch die Aktivierung des Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), der als Transkriptionsfaktor die Expression von Interleukinen, Matrix-Metalloproteinasen, des B<sub>1</sub> Rezeptors und anderen Proteinen hochreguliert (Hsieh et al., 2004; Schanstra et al., 1998; Schwaninger et al., 1999).

Neben der Phospholipase C kann das G-Protein auch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktivieren, was ebenfalls zu einer Freisetzung von Arachidonsäure führt (Burch und Axelrod, 1987; Hess et al., 1994). Die Arachidonsäuren werden frei, indem die PLA<sub>2</sub> Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol spaltet, wobei Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylinositol entstehen.

Nachdem die Signaltransduktion nun ausführlich dargestellt wurde, soll im Folgenden darauf eingegangen werden, auf welchen Ebenen sie unter den Bedingungen der zerebralen Ischämie potentiell schädigend wirken kann. Einige der Schritte in der Signaltransduktion verbrauchen direkt oder indirekt Energie, was in einer Zelle, deren Energiemetabolismus durch Hypoxie gestört ist, negative Auswirkungen hat. Beispielsweise ist die Wiederherstellung des Membranpotentials nach Depolarisation durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom sehr energieaufwendig (Berridge und Irvine, 1984). Es steht aber unter ischämischen Bedingungen nicht nur weniger Energie für diesen Prozess zur Verfügung, sondern die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die für Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung des Potentials von extremer Wichtigkeit ist, wird durch Arachidonsäure, die nach Bradykinin Stimulation in hohem Maße freigesetzt wird, inhibiert (Chan et al., 1983b; Chan und Fishman, 1984). Ein anderes Beispiel ist die Herstellung von Leukotrienen und Prostaglandinen. Für diesen Prozess werden die Energieträger NADH und NADPH durch die Lip- oder Cyclooxygenase zu NAD bzw. NADP reduziert – es wird also Energie verbraucht.

Bei dieser Redoxreaktion entstehen Superoxid Radikale (Holland et al., 1990; Kontos et al., 1985; Kukreja et al., 1986). Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) beeinflussen die Entstehung eines Hirnödems, indem sie zu starker Arteriodilatation (Rosenblum, 1983; Wei et al., 1985) und Permeabilitätserhöhung führen. Die Permeabilitätserhöhung scheint durch Endothelschäden verursacht zu werden (Wei et al., 1985) und spiegelt sich in einer Abnahme des transmuralen elektrischen Widerstandes wider (Olesen, 1987a; Olesen, 1987b). Die Extravasation von Plasma durch Erhöhung der Permeabilität wird durch die durch

Arteriodilatation bedingte Erhöhung des transendothelialen Druckgradienten noch weiter verstärkt. Da die Produktion von ROS fast am Ende der Signaltransduktion steht, müsste eine Stimulation dieses Pfades auf unterschiedlichen Ebenen – z.B. durch Applikation von Bradykinin oder Arachidonsäure – einen ähnlichen Effekt haben. In der Tat beobachteten Kontos et al. in intravitalmikroskopischen Untersuchungen im kranialen Fenster der Katze, dass eine Superfusion mit Arachidonsäure zu Arteriodilatation, vermindertem Ansprechen auf Hypokapnie und vielen endothelialen Läsionen führt, wofür nicht die Arachidonsäure selbst sondern die in ihrem Metabolismus entstehenden ROS verantwortlich zu sein scheinen (Kontos et al., 1980). Diesen Befund einer von ROS abhängigen Arteriodilatation und Permeabilitätserhöhung bestätigten mehrere Arbeitsgruppen (Black und Hoff, 1985; Kontos et al., 1984; Niwa et al., 2001; Unterberg et al., 1987; Wei et al., 1986). Auch für die Applikation von Bradykinin wird in zahlreichen Arbeiten von einer Arteriodilatation und von einer Erhöhung der Permeabilität berichtet (Butt, 1995; Unterberg und Baethmann, 1984; Wahl et al., 1983; Whalley et al., 1983; Whalley und Wahl, 1983; Yong und Linthicum, 1996), welche in manchen Fällen auch experimentell auf eine gesteigerte Produktion von ROS zurückgeführt werden können (Kontos et al., 1984; Lacza et al., 2002; Sarker et al., 2000; Whalley et al., 1987). In zwei Arbeiten wurde neben der Arteriodilatation auch eine Venokonstriktion beobachtet (Schurer et al., 1989; Unterberg et al., 1984), was durch eine zusätzliche Steigerung des transendothelialen Drucks die Ödembildung weiter fördert. Eine mögliche klinische Anwendung von Bradykinin, die sich diese Erhöhung der Permeabilität zunutze macht, wäre die gezielte Applikation, um die lokale Verfügbarkeit von Zytostatika durch Störung der Blut-Tumor Schranke bei Hirntumoren zu erhöhen (Hashizume und Black, 2002; Liu et al., 2001; Sugita et al., 1998). Für einen Überblick über die Wirkung von Mediatoren wie Bradykinin auf die Blut-Hirn Schranke siehe die Übersichtsarbeiten Wahl et al. oder Mayhan (Mayhan, 2001; Wahl et al., 1993).

Parfenova et al. zeigten bei Schweinen, dass sich mit zunehmendem Alter die Vasodilatation in der zerebralen Mikrozirkulation von den Prostaglandinen zum NO hin verschiebt, indem die Aktivität der PLA<sub>2</sub> ab- und die Aktivität der endothelialen NO Synthase (eNOS) zunimmt (Parfenova et al., 2000). Welche endothelialen Mediatoren durch Bradykinin freigesetzt werden, scheint aber nicht nur vom Alter sondern auch von der Tierart und der Lokalisation der Gefäße abzuhängen (Wahl et al., 1996). Dass Bradykinin außer über die Stimulation der Bildung von ROS und Prostaglandin I<sub>2</sub> vor allem über eine Aktivierung der eNOS – weniger der induzierbaren (iNOS) oder neuronalen (nNOS) NO Synthase – zur Vasodilatation führt, beschrieben neben Parfenova et al. auch einige anderer Arbeitgruppen



(Busse et al., 1993; Chao et al., 1983; Onoue et al., 1994). Dies scheint allerdings nur die großen zerebralen Gefäße zu betreffen. Der Effekt wird dabei direkt durch NO und nicht durch das aus NO und Superoxid sich bildende Peroxynitrit vermittelt (Kontos, 2001). In den kleineren pialen Gefäßen scheint NO dagegen keine solche Rolle zu spielen. Hier wird die Vasodilatation eher über ROS vermittelt (Gorlach und Wahl, 1996). Ob die durch Bradykinin gesteigerte NO Produktion sich bei der zerebralen Ischämie nun positiv oder negativ auswirkt, kann nicht endgültig beantwortet werden. Allgemein wird der eNOS eher ein protektiver Effekt durch Verbesserung der Hirndurchblutung zugeschrieben, während iNOS und nNOS als schädlich gelten (Hara et al., 1996; Huang et al., 1994; Iadecola, 1997). Allerdings gibt es einige Hinweise darauf, dass NO zu einer Permeabilitätserhöhung in postkapillären Venolen führt (Feletou et al., 1996; Mayhan, 1992), was pathophysiologisch für einen Nachteil auch der eNOS Aktivierung spräche. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass NO die Aktivität der Cyclooxygenase 2 erhöht (Nogawa et al., 1997; Nogawa et al., 1998).

Die Mediatoren üben jedoch nicht nur einen Einfluss auf Vasomotion und Permeabilität aus, sondern auch auf die Leukozytenmigration ins Hirnparenchym (Hallenbeck, 1996). Bevor die Leukozyten im Parenchym akkumulieren können, müssen sie eine intravasale Margination, eine Adhäsion ans Endothel und eine Transmigration durch die Gefäßwand durchlaufen. Bradykinin oder einer der in der Signaltransduktion gebildeten Stoffe scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Whittle et al. beobachteten eine chemotaktische Wirkung von interstitiell appliziertem Bradykinin auf Granulozyten (Whittle et al., 1992). Dass dies bei der zerebralen Ischämie von Bedeutung ist, zeigten Lehmborg et al., die in einer intravitalmikroskopischen Studie bei der globalen Ischämie des Gerbils eine Reduktion der Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten durch B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> oder B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten fanden (Lehmborg et al., 2003). Nicht nur für Bradykinin sondern auch für die topische Applikation von Arachidonsäure wurden Adhäsion und Transmigration von Leukozyten berichtet, die zu einer deutlichen Akkumulation nach 24 Stunden führten (Kontos et al., 1985; Unterberg et al., 1987). Dies könnte darauf hinweisen, dass Bradykinin über die Freisetzung von Arachidonsäure oder eines ihrer Derivate zur Leukozytenakkumulation führt. Dabei könnte z.B. das Leukotrien B<sub>4</sub> von Bedeutung sein, von dem eine starke Wirkung auf die Adhäsion von Leukozyten v.a. in postkapillären Venolen berichtet wurde (Dahlen et al., 1981). Ob die Leukozyten wirklich zur Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie beitragen, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch einige Hinweise auf eine Beteiligung an der Pathogenese der zerebralen Ischämie. Durch Steckenbleiben in Gefäßen, Freisetzen vasokonstriktiver Substanzen oder Verursachung von Thrombosen

können sie die Durchblutung vermindern oder direkt durch Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Mediatoren oder ROS die Blut-Hirn Schranke oder das Hirnparenchym schädigen (del Zoppo et al., 1991; Garcia et al., 1994; Kochanek und Hallenbeck, 1992).

Es ist allgemein anerkannt, dass die Glia im Zentralnervensystem mehrere Aufgaben erfüllt, zu denen die Aufnahme der exzitatorischen Aminosäuren Aspartat und Glutamat gehört, die von Neuronen in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Unter pathologischen Bedingungen scheinen diese Zellen ihrer Aufgabe als dynamischer Regulator der extrazellulären Konzentration von exzitatorischen Aminosäuren nicht mehr nachkommen zu können, was zu einer extrazellulär zu hohen Konzentration mit Überstimulation der Neurone führt. Bradykinin verursacht durch eine über den B<sub>2</sub> Rezeptor vermittelte Erhöhung des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> die Freisetzung von Aspartat und Glutamat aus Schwannzellen (Parpura et al., 1995) und Astrozyten (Jeftinija et al., 1996; Jeftinija et al., 1997), was zur Glutamatergischen Neurotoxizität beiträgt. Diese Freisetzung von Neurotransmittern wird nicht unspezifisch durch z.B. Zellschwellung herbei geführt, sondern ist ein spezifischer Ca<sup>2+</sup> abhängiger vesikulärer Mechanismus ähnlich dem von Neuronen. Ob auch Neurone direkt durch Stimulation mit Bradykinin Glutamat freisetzen, ist zweifelhaft. Wahrscheinlich ist für die Ausschüttung von Glutamat aus Neuronen eher eine Erregung durch das von der Glia freigesetzte Glutamat verantwortlich (Parpura et al., 1994; Rydh-Rinder et al., 2001). Es wird aber nicht nur insgesamt vermehrt Glutamat freigesetzt sondern auch vermindert aufgenommen. Arachidonsäure, die durch Bradykinin in hohem Maße frei wird, vermindert die Aufnahme von GABA und Glutamat (Chan et al., 1983b; Chan und Fishman, 1984). Es sind also eine ganze Reihe von Möglichkeiten denkbar, über die Bradykinin das Hirnparenchym schädigen könnte.

#### **4.2.3 Bradykinin und die Kinin Rezeptoren nach transienter fokaler zerebraler Ischämie**

Dass sämtliche Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems im Gehirn zu finden sind, es bei der zerebralen Ischämie aktiviert wird und über nicht endgültig geklärte Mechanismen an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Ischämie beteiligt ist, wurde bereits ausführlich dargestellt. Nach unserem Wissen ist bisher nur bekannt, dass es bei der zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems kommt. Wie das Aktivitätsniveau sich postischämisch im zeitliche Verlauf entwickelt, ist jedoch unbekannt.

Diese zeitliche Entwicklung zu kennen, wäre für pathophysiologische wie therapeutische Überlegungen von großer Bedeutung. Da es sich beim Kallikrein-Kinin System um ein System handelt, das seinen Einfluss über Rezeptoren vermittelt, untersuchten wir den zeitlichen Verlauf der Expression der Kinin Rezeptoren B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> nach transientser fokaler zerebraler Ischämie. Die Stärke des Einflusses auf die Zelle ist jedoch nicht nur von der Rezeptordichte abhängig sondern auch von der Verfügbarkeit der Agonisten dieser Rezeptoren. Dass der schädliche Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems in erster Linie über den Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor vermittelt wird, gilt als sehr wahrscheinlich. Folglich ist es wichtig, auch die Verfügbarkeit des Hauptagonisten dieses Rezeptors, des Bradykinins, zu kennen. Wir bestimmten auch den zeitlichen Verlauf der postschämischen Produktion von Bradykinin nach transientser fokaler zerebraler Ischämie.

Die Quantifizierung von Bradykinin ist v.a. wegen seiner extrem kurzen Halbwertszeit von  $T_{1/2} < 30\text{s}$  (Kariya et al., 1982b), seiner sehr geringen Konzentration und dem Vorhandensein zahlreicher Vorläuferpeptide und Abbauprodukte, die hoch spezifische Nachweismethoden verlangen, eine große technische Herausforderung. Es gibt jedoch einige Arbeiten, die versuchten, die Konzentration von Bradykinin im Gehirn zu messen. Leider war es den meisten aus technischen Gründen nicht möglich, spezifisch Bradykinin zu quantifizieren. Sie bestimmten allgemein Bradykinin ähnliche Substanzen, also verschiedene Kinine und womöglich auch noch andere Peptide, die in ihrer Struktur Bradykinin ähneln. So kamen Yamauchi et al. im Rattenhirn auf eine Konzentration von  $139 \pm 79\text{fmol}$  Bradykinin Äquivalente (BK Äq) pro Gramm Hirngewebe (Yamauchi et al., 1985). Ähnliche Werte maßen Perry et al.. In der Ratte bestimmten sie eine Konzentration von  $610 \pm 50\text{fmol}$  BK Äq/g, im Meerschweinchen  $210\text{fmol}$  BK Äq/g (nur ein Tier) (Perry und Snyder, 1984). Kariya et al. kamen im Rattenhirn auf deutlich höhere Werte von  $5 \pm 1\text{pmol}$  BK Äq/g (Kariya et al., 1982b). Diese doch recht großen Differenzen sind wahrscheinlich auf methodische Unterschiede zurück zu führen. Es könnte aber auch daran liegen, dass nicht die gleichen Proben verwendet wurden. Die Konzentration an Bradykinin Äquivalenten schwankt nämlich innerhalb des Gehirns erheblich. Während sie in der Ratte in Mittelhirn, Hypothalamus, Striatum und Hippocampus mit  $250\text{-}300\text{fmol}$  BK Äq/g am niedrigsten ist, ist sie mit  $500\text{-}550\text{fmol}$  BK Äq/g in Cortex und Cerebellum sowie  $900\text{fmol}$  BK Äq/g in der Medulla oblongata deutlich höher und mit über  $4\text{pmol}$  BK Äq/g in der Hypophyse am höchsten (Kariya et al., 1985). Sehr viel niedriger ist die von Pellacani et al. ermittelte Konzentration an Kininen im menschlichen Plasma von  $16,8 \pm 5,8\text{fmol/ml}$  (Pellacani et al., 1994). Im Liquor von Hunden und Menschen wurden Kinin Konzentrationen von  $13 \pm 3\text{pg/ml}$  und  $53 \pm 15\text{pg/ml}$  bestimmt (Sciqli et al., 1984;

Thomas et al., 1984). Wenn man der Umrechnung das Molekulargewicht von Bradykinin (1060Da [g/mol]) und eine relative Dichte des Liquors von 1,009g/ml zugrunde legt, so ergeben sich Konzentrationen von  $12,2 \pm 2,8 \text{ fmol/g}$  und  $49,6 \pm 14,0 \text{ fmol/g}$ , was sich ungefähr in der Größenordnung unserer Daten bewegt. Die von uns in den Gehirnen von  $B_2^{-/-}$  und C57/Bl6 Mäusen ermittelten Konzentrationen an Bradykinin von  $2,2 \pm 1,1 \text{ fmol/g}$  und  $3,1 \pm 1,6 \text{ fmol/g}$  sind allerdings sehr viel niedriger als die genannten Konzentrationen an Bradykinin Äquivalenten, die von anderen Arbeitsgruppen im Hirnparenchym gemessen wurden. Dies liegt in erster Linie daran, dass unser Messverfahren höchst spezifisch für Bradykinin ist (Nussberger et al., 1998; Pellacani et al., 1994), während die anderen Arbeitsgruppen nicht selektiv die Konzentration von Bradykinin sondern von Kininen allgemein bestimmt haben. Da wir die Gehirne vor der Entnahme mit PBS durchspülten, ist es unwahrscheinlich, dass Bradykinin aus dem Plasma mit unseren Messungen im Gehirnparenchym interferierte. Die Plasmakonzentration von Bradykinin bewegte sich im gleichen Rahmen und betrug bei den C57/Bl6 Mäusen  $1,8 \pm 0,6 \text{ fmol/g}$ . Damit ist sie der des Menschen, die von Nussberger et al. auf  $2,2 \pm 2,2 \text{ fmol/ml}$  beziffert wurde (Nussberger et al., 1998), sehr ähnlich. Dass die  $B_2^{-/-}$  Mäuse mit  $5,5 \pm 3,5 \text{ fmol/g}$  eine dreifach höhere Plasma Konzentration haben, ist sehr interessant. Möglicher Weise resultiert dies daraus, dass diese Mäuse mangels Kinin  $B_2$  Rezeptor weniger Rezeptor gebundenes und dafür mehr freies Bradykinin besitzen. Daten zur Kinin Konzentration im Parenchym des Zentralnervensystems gibt es bisher nur nach Rückenmarkstrauma und nach transients globaler Ischämie der Ratte. Der zeitliche Verlauf des Konzentrationsanstiegs ist dabei in jeder Pathologie bzw. jedem Modell sehr unterschiedlich. Xu et al. berichten von einem Anstieg der Kinin Konzentration im Rückenmark bis zwei Stunden nach Trauma und einem Verbleiben auf diesem Niveau (Xu et al., 1991). Kamiya et al. beobachteten einen maximalen Anstieg der Bradykinin Konzentration in Plasma und Gehirn 30 Minuten nach dreistündiger Okklusion beider AA. carotes communes, was mit dem zeitlichen Verlauf der Progression des Hirnödems korrespondierte (Kamiya et al., 1990). Anschließend nahm die Konzentration wieder auf Ausgangsniveau ab. Ganz anders verhält es sich wiederum bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie. In unseren Untersuchungen erreichte die Bradykinin Konzentration ihr Maximum 12 Stunden nach Ischämie. Dieser Unterschied mag darin begründet liegen, dass das meiste Hirngewebe, in dem die Konzentration an Bradykinin bestimmt wurde, nach globaler Ischämie keine Zeichen von Schädigung aufwies, während nach fokaler Ischämie ein massiver neuronaler Zelltod zu sehen war. Interessanter Weise korreliert der Zeitverlauf des postischämischen Zelltodes (maximal 4 bis 12 Stunden nach Ischämie) mit dem der

Bradykinin Produktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass Bradykinin an der Schädigung des Gewebes nach zerebraler Ischämie beteiligt ist.

Nachdem wir gesehen hatten, dass es durch eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems zu einer vermehrten Produktion von Bradykinin nach zerebraler Ischämie kommt, interessierte uns als nächstes, ob parallel hierzu Kinin Rezeptoren verstärkt exprimiert werden, die größere Menge an Kininen also auch auf eine größere Zahl an Kinin Rezeptoren trifft. Hiefür bestimmten wir semiquantitativ die Transkription der Kinin Rezeptoren durch Messung ihrer mRNA mit Real Time PCR. Die Transkription allein ist jedoch nicht von Bedeutung sondern es muss auch zur Translation und anschließenden zytoplasmatischen Lokalisation der Rezeptoren kommen, damit die Kinine eine intrazelluläre Signaltransduktion in Gang setzen können. Man darf nicht vom Transkriptionsniveau auf das Translationsniveau schließen, da es zu einer Entkoppelung der Proteinbiosynthese von der Synthese der mRNA kommen kann. Matsuyama et al. zeigten dies am Beispiel der Kupfer-Zink Superoxid Dismutase, deren Expression im Gerbil nach globaler Ischämie erhöht war, ohne dass sich im Western Blot eine Vermehrung des Proteins zeigte (Matsuyama et al., 1993). Daher untersuchten wir zusätzlich die Synthese der Proteine und deren Lokalisation in der Zelle immunhistochemisch. Als wir unsere Untersuchungen durchführten, war nur die Existenz der Kinin Rezeptoren B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> bekannt. Die von Boels et Schaller im November 2003 postulierte Existenz eines weiteren Subtyps von Bradykinin Rezeptor beim Menschen konnten wir nicht berücksichtigen. Der von ihnen beschriebene G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR100 ist ähnlich durch Bradykinin und Kallidin, nicht jedoch durch des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin stimulierbar, und verhält sich damit wie ein Kinin Rezeptor vom Typ B<sub>2</sub> (Boels und Schaller, 2003). Hinweise auf die Existenz von zwei Subtypen von B<sub>2</sub> Rezeptoren hatten zuvor schon verschiedene Autoren in Bindungsstudien mit Radioliganden im Meerschweinchen gefunden (Fujiwara et al., 1989; Murone et al., 1996). Der GPR100 wird auch im Gehirn – am stärksten in Corpus callosum und Amygdala – exprimiert. Die Existenz dieses Rezeptors in der Maus ist bisher noch nicht gezeigt worden.

Die einzige Neuropathologie, in der unseres Wissens die Rolle des Kallikrein-Kinin Systems ähnlich ausführlich, wie von uns für die Ischämie untersucht, bestimmt worden ist, ist die Epilepsie. Arganaraz et al. haben ihren Studien das gleiche Konzept zugrunde gelegt wie wir unseren. Zunächst bestimmten sie im Pilocarpin Modell der Temporallappen Epilepsie die Expression der mRNA der Kinin Rezeptoren B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> mit Real-Time PCR und die Quantität wie Lokalisation der Rezeptorproteine immunhistochemisch (Arganaraz et al., 2004). Anschließend untersuchten sie die pathophysiologische Bedeutung der beiden

Rezeptoren mit B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen (Adolfo et al., 2004). Der B<sub>1</sub> Rezeptor wurde mehr in der chronischen Periode, der B<sub>2</sub> Rezeptor mehr in der akuten synthetisiert, wobei sich jedoch kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Real-Time PCR und Immunhistochemie erkennen lässt (Arganaraz et al., 2004; Ongali et al., 2003). Der B<sub>1</sub> Rezeptor schien dabei einen schädlichen, der B<sub>2</sub> Rezeptor einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der Epilepsie zu haben (Adolfo et al., 2004; Bregola et al., 1999).

Beim Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor handelt es sich wie beim B<sub>2</sub> Rezeptor um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (Couture et al., 2001; Marceau et al., 1998). Die B<sub>1</sub> Rezeptoren von Maus, Ratte und Mensch wurden kloniert und pharmakologisch charakterisiert (Hess et al., 1996; Jones et al., 1999; Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996b). Die Proteine sind zwischen Ratte und Mensch zu 73%, zwischen Ratte und Maus zu 90%, zwischen Ratte und Kaninchen zu 72%, zwischen Mensch und Maus zu 67% bzw. 72% und zwischen Maus und Kaninchen zu 68% bzw. 73% identisch. Die pharmakologischen Eigenschaften dieses Rezeptors unterschieden sich deutlich zwischen verschiedenen Spezies. Unter physiologischen Bedingungen ist er kaum zu finden. Während der konstitutiv exprimierte B<sub>2</sub> Rezeptor mehr in der akuten Phase eines pathologischen Geschehens eine Rolle zu spielen scheint, ist der B<sub>1</sub> Rezeptor wohl eher in der chronischen Phase von Bedeutung. Ein Hinweis darauf ist die unterschiedliche Dynamik. Der Kinin B<sub>1</sub> Rezeptor erfährt keine Desensibilisierung durch Rezeptor-Liganden Internalisierung, während der B<sub>2</sub> Rezeptor als Rezeptor der Akutantwort internalisiert wird, wobei es zur Tachyphylaxie kommt (Haasemann et al., 1998; Marceau et al., 1998; Praddaude et al., 1995; Roscher et al., 1990). Diese durch Agonisten getriggerte Translokation des B<sub>2</sub> Rezeptors führt zur Endozytose von 80-90% der B<sub>2</sub> Rezeptoren der Zelloberfläche mit anschließender Degradation oder Sequestration (Austin et al., 1997; Munoz et al., 1993; Munoz und Leeb-Lundberg, 1992; Phagoo et al., 1999). Ein weiterer Hinweis ist, dass er erst durch de novo Synthese nach Stimulation eine ausreichende Konzentration erreicht um seine Funktion ausführen zu können (Pruneau und Belichard, 1993; Whalley et al., 1983). Die Hochregulation wird v.a. durch Zytokine wie  $\gamma$ -Interferon, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 oder TNF- $\alpha$  stimuliert (Campos et al., 1999; Phagoo et al., 1999; Prat et al., 2000). Aber auch Kinine selbst führen zu einer solchen Hochregulation (Noda et al., 2003; Phagoo et al., 1999). Bradykinin stimuliert über den Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor die Aktivität von NF- $\kappa$ B und die Expression von IL-1 $\beta$  (Pan et al., 1996). Die Hochregulation findet aber nicht nur über das vermehrt gebildete IL-1 $\beta$  sondern auch direkt über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B statt (Campos et al., 1999). Über NF- $\kappa$ B können auch B<sub>1</sub> Rezeptor Agonisten durch B<sub>1</sub> Rezeptor Stimulation

die Expression ihres eigenen Rezeptors hoch regulieren (Schanstra et al., 1998). Manche Immunstimulantien scheinen nicht nur die Transkriptionsrate zu erhöhen sondern auch als posttranskriptionale Regulatoren an der Stabilisierung der gebildeten mRNA beteiligt zu sein – z.B. IL-1 verdoppelt die Halbwertszeit von mRNA auf 2h (Marceau et al., 1998). Die intrazelluläre Signaltransduktion des B<sub>1</sub> Rezeptors ist der des B<sub>2</sub> Rezeptors sehr ähnlich. Effekte, die der B<sub>1</sub> Rezeptor vermittelt, bzw. Funktionen, die er ausführen kann, sind eine Vasokonstriktion mit Anstieg des Blutdrucks (Ni et al., 2003; Whalley et al., 1983), Permeabilitätserhöhung mit Ödembildung (Ni et al., 2003; Prat et al., 2000), Verminderung der Sekretion von IL-8 (Prat et al., 2000) und Zellproliferation (Morbidelli et al., 1998). Zur Expression des Kinin B<sub>1</sub> Rezeptors im gesunden Gehirn gibt es sehr widersprüchliche Angaben. Mahabeer et al. konnten in humanem Autopsiegewebe in den meisten Regionen des Gehirns B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA detektieren (Mahabeer et al., 2000). Jones et al. waren dagegen nicht in der Lage, B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA in Gehirn oder Rückenmark von Ratten nachzuweisen (Jones et al., 1999). Dem könnte zugrunde liegen, dass es sich bei dem Autopsiegewebe nicht um unvorbelastetes, gesundes Gewebe handelte, es also unter den zuvor gegebenen pathologischen Umständen zu einer Hochregulierung gekommen sein könnte. Es wäre jedoch auch denkbar, dass es sich bei dieser Differenz um einen Speziesunterschied handelt. Shughrue et al. fanden in einer in situ Hybridisierungs Studie eine Grundexpression von B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA zwar weit verbreitet im Gehirn von Affen, nicht jedoch in dem von Ratten (Shughrue et al., 2003). Wir sahen in unseren Untersuchungen an der Maus eine basale Expression von B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA und Protein. B<sub>1</sub> Rezeptoren tragende Neurone waren zuvor schon in normalen Gehirnen von Ratten und Menschen beschrieben worden (Ongali et al., 2003; Raidoo und Bhoola, 1997). Die Hochregulation der mRNA Expression nach Ischämie zeigte zwei Gipfel, einen niedrigeren sehr frühen nach einer Stunde und einen späteren nach 24 Stunden. Nach der Hochregulation auf das Fünffache zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie nahm das Expressionsniveau innerhalb der folgenden 24 Stunden wieder auf das Dreifache ab. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen unserer Immunhistochemie. Die Anzahl immunpositiver Neuronen nahm auf das Sechsfache zu. Wir sahen eine kontinuierliche Zunahme des Anteils immunpositiver Neuronen an der Gesamtzahl von Neuronen. Da aber kontinuierlich Neuronen sterben, nahm diese Gesamtzahl über die Zeit deutlich ab. So kommt es, dass trotz weiterer Zunahme des Anteils positiver Neuronen deren absolute Zahl nach einem Maximum nach acht Stunden wieder abnahm. Dies erklärt den Gipfel der Expression nach 24 Stunden und die darauf folgende Abnahme. Dass zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie trotz der Verminderung der Anzahl immunpositiver

Zellen die Expression ihr Maximum hatte, deutet darauf hin, dass die Expression in einzelnen vitalen Zellen weiter zugenommen hat. Nach 48 Stunden scheint der Verlust von Neuronen dann aber stärker gewesen zu sein als die Hochregulation der Expression des B<sub>1</sub> Rezeptors in den überlebenden Neuronen, sodass es insgesamt zu einer Abnahme der messbaren Menge an B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA kam. Noda et al. hatten in vitro eine Expression von B<sub>1</sub> Rezeptor mRNA zwar nicht unter basalen Bedingungen aber nach Stimulation mit Bradykinin beobachtet (Noda et al., 2003). Dies entspricht nicht unseren Befunden und ist unter Umständen durch die in vitro Bedingungen zu erklären. Wir haben wie auch einige andere Arbeitsgruppen (Arganaraz et al., 2004; Ongali et al., 2003) ausschließlich auf Neuronen B<sub>1</sub> Rezeptoren nachweisen können. Gesunde Neuronen hatten eine leichte zytoplasmatische Färbung unter Aussparung des Kerns. Immunpositive Neuronen waren meist morphologisch sichtbar ischämisch geschädigt und zeigten eine membranbetonte Anfärbung, was sich mit den Beobachtungen von Arganaraz et al. deckt (Arganaraz et al., 2004). Auch immunreaktive zerebrale Gefäße sahen wir nicht. Prat et al. fanden auf Endothel in normalem Hirngewebe, das Patienten im Rahmen eines Epilepsie chirurgischen Eingriffs entnommen worden war, ebenso keine B<sub>1</sub> Immunreaktivität (Prat et al., 2000). Bei der von Raidoo et al. auf zerebralen Gefäßen beobachteten B<sub>1</sub> Immunreaktivität (Raidoo et al., 1997) könnte es sich um ein durch verspätete Fixation des humanen Autopsiegewebes bedingtes post mortem Artefakt handeln.

Die Klonierung von B<sub>2</sub> Rezeptoren verschiedener Spezies, ihre pharmakologische Charakterisierung und die Unterschiede im Protein wie in ihren pharmakologischen Eigenschaften sind an anderer Stelle schon ausführlich beschrieben worden (Raidoo und Bhoola, 1998; Regoli et al., 1996). Immunhistochemisch und autoradiographisch nachgewiesen wurden Kinin B<sub>2</sub> Rezeptoren bisher in den Gehirnen von Ratten (Chen et al., 2000; Ongali et al., 2003; Privitera et al., 2003; Shi et al., 1999), Meerschweinchen (Fujiwara et al., 1988; Murone et al., 1996; Privitera et al., 1992), Schafen (Murone et al., 1997) und Menschen (De Sousa et al., 2002; Raidoo et al., 1996a; Raidoo und Bhoola, 1997). Sie scheinen über das gesamte Gehirn verbreitet zu sein. Ihr Vorkommen wurde in fast allen Regionen – wie Kortex, Zerebellum, Mittelhirn, Hirnstamm, Basalganglien, Hippocampus, Thalamus und Hypothalamus – nachgewiesen (Murone et al., 1997; Ongali et al., 2003; Raidoo und Bhoola, 1997; Shi et al., 1999). Auch mRNA des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors ist in den meisten Regionen des Gehirns gefunden worden (Mahabeer et al., 2000). Dies stimmt mit unseren immunhistochemischen Befunden überein. Wir fanden in den gesunden Gehirnen von C57/Bl6 Mäusen B<sub>2</sub> Rezeptor mRNA und sahen in der Immunhistochemie eine sich über das ganze Gehirn erstreckende leichte Anfärbung von Zellen, in manchen Gebieten auch eine



etwas stärkere Immunreaktivität. Bei den angefärbten Zellen handelte es sich – morphologisch beurteilt – ausschließlich um Neuronen. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Chen et al. überein, die in ihrer B<sub>2</sub> Rezeptor Immunhistochemie an der Ratte eine Doppelfärbung mit NeuN oder GFAP durchführten. Sie identifizierten die B<sub>2</sub> Rezeptor immunpositiven Zellen immunhistochemisch als Neuronen (Chen et al., 2000). Murone et al. wiederum glauben in einer autoradiographischen Studie am Schaf die Existenz des Rezeptors nicht nur in Neuronen sondern auch in der Glia belegen zu können (Murone et al., 1997). Und die vielen Arbeiten, die von einer Dilatation und Permeabilitätserhöhung zerebraler Gefäße durch die Applikation von Bradykinin berichten, deuten auf das Vorhandensein des B<sub>2</sub> Rezeptors auf diesen Gefäßen hin (Butt, 1995; Pellacani et al., 1994; Unterberg und Baethmann, 1984; Wahl et al., 1983; Whalley et al., 1983; Whalley und Wahl, 1983; Yong und Linthicum, 1996). Zumindest in den größeren zerebralen Gefäßen wie Aa. cerebri media, basilaris und pericallosa ist der Rezeptor auch immunhistochemisch oder autoradiographisch nachgewiesen worden (Murone et al., 1996; Raidoo et al., 1997). Selbst wenn in vitro Bedingungen kein physiologisches Milieu darstellen und unter diesen Bedingungen gewonnene Ergebnisse sich nur bedingt auf die Situation in vivo übertragen lassen, so ist der biochemisch-pharmakologische und autoradiographische Nachweis von B<sub>2</sub> Rezeptoren in primär kultivierten Astrozyten und Oligodendrozyten (Cholewinski et al., 1991; Gimpl et al., 1992; Hosli und Hosli, 1993; Stephens et al., 1993) dennoch ein Hinweis auf die Existenz dieses Rezeptors auch in Glia. Die von uns gesehenen gesunden immunpositiven Neuronen zeigten eine Anfärbung von Kern und Kernmembran, was den Beobachtungen von Arganaraz et al. entspricht und mit den Ergebnissen der Untersuchung von Lee et al. zur subzellulären Verteilung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors übereinstimmt (Arganaraz et al., 2004; Lee et al., 2004). Diese ermittelten eine nukleäre Lokalisation von 70% des Rezeptors. In ischämisch geschädigten Neuronen nahm die Färbeintensität des Kerns zu und eine Immunreaktivität des Zytoplasmas und v.a. auch der Plasmamembran wurden sichtbar. Dies entspricht den Beschreibungen von Raidoo et al., die humanes Autopsiegewebe, also Hirnparenchym, das durch verspätete Fixation quasi einer globalen Ischämie ausgesetzt worden war, auf das Vorkommen von B<sub>2</sub> Rezeptoren hin untersucht haben (Raidoo et al., 1996a; Raidoo und Bhoola, 1997). Wie sich der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der Regulation des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors nach zerebraler Ischämie gestalten, ist unseres Wissens bisher noch nicht erforscht worden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die B<sub>2</sub> Rezeptor mRNA bereits sehr früh – nach einer Stunde – hochreguliert wurde. Der Grad der Hochregulierung stieg stetig an, bis er nach 24 Stunden sein Maximum im 17fachen der Grundexpression erreichte. Dass diese

Vervielfachung der mRNA zum Zeitpunkt 48h nach Ischämie wieder leicht abgenommen hat, ist unseres Erachtens – wie beim B<sub>1</sub> Rezeptor – nicht auf eine Verminderung der Hochregulation sondern auf den Zellverlust zurück zu führen. In der Immunhistochemie sahen wir nämlich, dass die Anzahl immunpositiver Neuronen bereits nach 24 Stunden abnahm. Da trotz sinkender Zahl immunpositiver Neurone die mRNA Expression zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum hatte, konnte die Hochregulation der Expression offensichtlich den Verlust an Zellen eine Weile kompensieren, sodass die Menge an Rezeptor mRNA weiter zunahm. Wie beschrieben nahm die Anzahl immunpositiver Neuronen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach vorheriger kontinuierlicher Zunahme wieder ab. Der prozentuale Anteil an der Gesamtneuronenzahl stieg jedoch weiter an, was darauf hindeutet, dass die absolute Zahl positiver Neuronen nicht durch Runterregulierung des Rezeptors sondern durch Zelltod vermindert wurde. Damit stimmt auch unsere Beobachtung überein, dass Zellen, die Zeichen eines ischämischen Schadens zeigten, verstärkt angefärbt wurden, während tote Zellen sich nicht färbten. Die Quantifizierung dieser Daten ergab, dass die Hochregulation des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors dem zeitlichen Verlauf des Zelltodes in diesem Modell folgt, wobei neuronaler Zelltod im Striatum 1 bis 2 Stunden nach Reperfusion und im Kortex 4 bis 12 Stunden später auftritt (Plesnila et al., 2004). Diese Korrelation zwischen Fortschreiten des Zelltodes und Hochregulation des B<sub>2</sub> Rezeptors lässt vermuten, dass das Kallikrein-Kinin System in die Einleitung des neuronalen Zelltodes nach transientser fokaler zerebraler Ischämie involviert sein könnte. Diese Vermutung wird von unseren Daten unterstützt, die zu genau dieser Zeit, nämlich den ersten 12 Stunden nach Ischämie, eine erhöhte Konzentration an Bradykinin im Hirngewebe zeigen.

## **4.3 Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für den neuronalen Zelltod nach transienter fokaler zerebraler Ischämie**

Dass die zeitlichen Verläufe der Produktion von Bradykinin und der Hochregulation der Kinin Rezeptoren nach transienter fokaler zerebraler Ischämie gut mit dem Auftreten des neuronalen Zellunterganges korrelieren, ist ein wichtiger Hinweis auf eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Ischämie – jedoch kein Beweis. Auf eine solche Beteiligung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors weisen auch mehrere pharmakologische Studien hin. Um diesen Punkt abschließend zu klären, haben wir B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse verwendet. Diese Tiere hatten sich schon in der Erforschung der Beteiligung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors an anderen neurologischen Pathologien wie dem Schädel-Hirn Trauma (Hellal et al., 2003) und der Epilepsie (Adolfo et al., 2004) bewährt. Zur Erforschung der zerebralen Ischämie waren sie bisher jedoch noch nicht herangezogen worden. Als tierexperimentelles Modell für den Schlaganfall diente uns das beschriebene Fadenokklusionsmodell der A. Cerebri media. Mit dessen Hilfe untersuchten wir die Auswirkungen des Fehlens des B<sub>2</sub> Rezeptors auf die Bildung des Hirnödems, die Größe des infarzierten Hirngewebes und die kurz- oder langfristigen Folgen der Ischämie wie motorische Ausfälle, Verlust an Körpergewicht oder Sterblichkeit. Aus den gewonnenen Daten lassen sich Schlüsse über die Bedeutung dieses Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Ischämie ziehen.

### **4.3.1 Hirnödem**

Wie bereits ausführlich dargelegt, können mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure und freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies; ROS) ein vasogenes Hirnödem induzieren (Bhoola et al., 1992; Chan und Fishman, 1984; Fishman und Chan, 1981; Schilling und Wahl, 1999). Auch für eine Beteiligung von NO und cGMP gibt es Hinweise (Hara et al., 1996; Joo et al., 1983). Sämtliche dieser Substanzen werden nach Stimulierung einer Zelle über Kinin Rezeptoren freigesetzt bzw. gebildet. Dabei wird zusätzlich ein sich selbst verstärkender Mechanismus in Gang gesetzt, indem ROS bei der Lipidperoxidation Fettsäuren freisetzen und beim Abbau dieser Fettsäuren dann wiederum ROS entstehen. Schilling et Wahl haben fünf Kriterien zur Beurteilung einer Substanz als

Mediator des Hirnödems formuliert (Schilling und Wahl, 1999). Eine solche Substanz muss I. die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke erhöhen, II. einen vasodilatorischen Effekt haben und III. in der Lage sein, ein vasogenes Hirnödem zu erzeugen, IV. unter pathologischen Bedingungen muss sich ihre Konzentration in Gewebe oder interstitieller Flüssigkeit erhöhen und V. eine Inhibierung ihrer Freisetzung oder Aktivität muss zu einer Verminderung des Hirnödems führen. Bradykinin erfüllt all diese Kriterien. Daher ist zu erwarten, dass ein Fehlen des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors, über den Bradykinin in erster Linie wirkt, zu einer Verminderung des Hirnödems führt. Um dies zu untersuchen, bestimmten wir 24 Stunden nach transientser fokaler zerebraler Ischämie den Wassergehalt der Gehirne von B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen und ihren wildtyp Kontrollen. Slivka et al. hatten gezeigt, dass in unserem Modell der transienten MCA Okklusion der Hirnwassergehalt nach 24 Stunden maximal ist (Slivka et al., 1995). Dieser Befund ist von Ding-Zhou et al., die die stärkste Störung der Blut-Hirn Schranke 24 Stunden nach transientser fokaler zerebraler Ischämie beobachtet hatten, bestätigt worden (Ding-Zhou et al., 2002). Daher entschieden wir uns für eine Bestimmung des Hirnwassergehalts 24 Stunden nach Ischämie. Zu diesem Zeitpunkt sahen wir in beiden Hemisphären der Gehirne von B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen eine um 87% geringere Zunahme des Wassergehalts. Das Fehlen des B<sub>2</sub> Rezeptors scheint die Mäuse also vor der Entwicklung eines Hirnödems nach zerebraler Ischämie zu schützen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die von einer Verminderung des Hirnödems nach transientser MCA Okklusion durch den B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten LF 16-0687Ms berichten (Ding-Zhou et al., 2003; Zausinger et al., 2002). Yong et Linthicum hatten zwischen den Mäusestämmen BALB/c und SJL/J einen Unterschied in der Bildung undichter Stellen in pialen Venolen nach topischer Applikation von Bradykinin entdeckt (Yong und Linthicum, 1996). Es wäre also auch denkbar, dass andere genetische Differenzen als das Fehlen des B<sub>2</sub> Rezeptors für die verminderte Ödembildung verantwortlich sind. Dies halten wir jedoch für äußerst unwahrscheinlich, da der basale Hirnwassergehalt in B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen sogar etwas höher als in den Kontrollen war. Dass nicht nur die ipsi- sondern auch die kontralaterale Hemisphäre beider Mäusestämme eine Zunahme des Wassergehalts zeigte, die immerhin halb so groß war wie in der infarzierten Hemisphäre, entspricht den Beobachtungen anderer wie auch unserer Arbeitsgruppe (Chan et al., 1983a; Plesnila et al., 2001a) und ist durch die Diffusion der Ödemflüssigkeit entlang der Nervenbahnen vom Ort der Schädigung über das Corpus callosum in die andere Hemisphäre zu erklären. Ganz allgemein ist das vasogene Ödem v.a. in der weißen Substanz, das zelluläre Ödem in weißer und grauer Substanz zu finden (Chan und Fishman, 1984).

Darüberhinaus interessierte uns, ob aus dem histomorphometrischen Datensatz zur Bestimmung des Infarktvolumens über die Errechnung der Hemisphärenschwellung ausreichend genaue Aussagen über das Hirnödem getroffen werden können. Da in dieser Rechnung die ebenfalls ödematöse kontralaterale Hemisphäre als Bezugsgröße dient, wäre mit einer Unterschätzung der Schwellung der infarzierten Hemisphäre zu rechnen. Interessanter Weise ergaben sich für die Zunahme des Hemisphärenvolumens aber sehr viel größere Werte als für die Zunahme des Hirnwassergehalts. Außerdem unterschied sich die Differenz der Schwellung von 53% zwischen den beiden Gruppen erheblich von der Differenz in der Zunahme des Wassergehalts von 87%. Daraus schließen wir, dass mit dieser Methode – zumindest wenn das Gewebe durch Gefrieren fixiert wurde – genauere Aussagen zum Hirnödem nicht getroffen werden können. Sie kann allenfalls als Screening Methode dienen, um einen schon vorhandenen histomorphometrischen Datensatz dahin gehend zu beurteilen, ob es sich lohnen könnte, eine genaue Untersuchung des Hirnödem durchzuführen.

### **4.3.2 Infarktvolumen**

Die vom Endothel gebildete Blut-Hirn Schranke schränkt die Diffusion zum Austausch zwischen Blut und Gehirn stark ein. Diese Eigenschaft der Schranke wird allgemein als Mechanismus zum Schutz des Gehirns vor ungewollten Einflüssen von im Blut zirkulierenden Stoffen betrachtet. Dabei übt die Blut-Hirn Schranke Kontrolle über Ein- und Austritt von Substanzen aus, die im Gehirn gebraucht werden oder verstoffwechselt wurden. Auch hält sie die Ionenhomöostase, die für Integrität und Funktion der Neurone nötig ist, in sehr engen Grenzen aufrecht. In dieser Vorstellung wird jede Erhöhung der Permeabilität der Schranke als potentiell nachteilig und schädigend beurteilt. Auch bedingt das Hirnödem eine Steigerung des intrakraniellen Drucks, was zu einer Verminderung des zerebralen Perfusionsdrucks und dadurch zu einer Verschlechterung der Durchblutungsverhältnisse führt. Über diese Mechanismen wie über eine Beteiligung an der Glutamatexzitotoxizität, dem oxidativen Stress, der Störung der Ionenhomöostase und des Energiemetabolismus, der Leukozytenmigration u.v.a., worauf an anderer Stelle bereits ausführlich eingegangen wurde, könnte das Kallikrein-Kinin System an der Schädigung des Gehirnparenchyms beteiligt sein. Um diese mögliche Beteiligung an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach transienter fokaler zerebraler Ischämie beurteilen zu können, bestimmten wir

histomorphometrisch die Infarkt volumina in  $B_2^{-/-}$  Mäusen und ihren Kontrollen 24 Stunden nach Ischämie. Garcia et al. und Ding-Zhou et al. berichteten, dass zu den 24h, 48h und 72h nach MCA Okklusion kein signifikanter Unterschied im Infarktvolumen bestehe, zu jedem dieser Zeitpunkte das Infarktvolumen aber signifikant größer als nach 6 Stunden sei (Ding-Zhou et al., 2002; Garcia et al., 1993). Da in unserem Modell die meisten Tiere aus ungeklärten Gründen nach ein paar Tagen verendeten, erschien es uns als opportun, nach 24 Stunden die Infarktquantifizierung durchzuführen. Zu diesem Zeitpunkt musste noch nicht mit dem Verlust von Tieren gerechnet werden, und die Infarktreifung war so gut wie abgeschlossen, das Infarktvolumen hatte also fast sein Maximum erreicht. Ein fundamentales Problem der Infarktquantifizierung ist jedoch die Vergrößerung des infarzierten Gewebes durch das Ödem. Die Schwellung resultiert in einer Überschätzung der Infarktgröße und kann zu einem größeren Fehler in der Bestimmung des Volumens führen. V.a. in unserem Fall einer sehr unterschiedlichen Ödementwicklung in den beiden Versuchsgruppen könnte das in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen sehr viel geringere Ödem eine Infarktreduktion vortäuschen. Um einen solchen Fehler zu vermeiden, schlugen Swanson et al. vor, den Infarkt nicht direkt auszumessen sondern über eine Korrekturrechnung zu berechnen, in der der nicht infarzierte Teil der ipsilateralen Hemisphäre von der kontralateralen Hemisphäre subtrahiert wird (Swanson et al., 1990). Um eventuellen Unterschieden in der Größe der Gehirne Rechnung zu tragen, drückten wir zusätzlich das korrigierte Infarktvolumen nicht in absoluten Werten sondern in Prozent der kontralateralen Hemisphäre aus (Zweckberger et al., 2003). Das auf diese Weise errechnete Infarktvolumen war in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen um 38% geringer als in den Kontrollen. Die Korrekturrechnung macht jedoch nur Sinn, wenn das Ödem hauptsächlich im Infarkt lokalisiert ist. Eine direkte Bestimmung der räumlichen Verteilung des Ödems war uns leider nicht möglich. Daher untersuchten wir einige Korrelationen in unserem histomorphometrischen Datensatz, wenngleich das Ödem durch die histomorphometrisch ermittelte Schwellung nur unzureichend wiedergegeben wird. Schwellungs- und Infarktvolumen korrelierten: je größer der Infarkt, desto größer die Schwellung. Wenn man nun zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Schwellung die einzelnen Schnittebenen untersuchte, so korrelierten Schwellungs- und Hemisphärenfläche. Unterteilte man die Hemisphärenfläche in infarzierte und nicht infarzierte Fläche, so fand man zwar eine deutliche Korrelation zwischen Schwellungs- und nicht infarzierter Fläche, jedoch keine zwischen Schwellungs- und Infarktfläche. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich das Ödem über die gesamte Hemisphäre verteilt und unter Umständen sogar im nicht infarzierten Bereich verstärkt zu finden ist. Da unter diesen Umständen die Anwendung der

Korrekturrechnung keinen Sinn machen würde, errechneten wir zusätzlich das Infarkt volumen direkt und drückten es als Prozent der ipsilateralen Hemisphäre aus. Die Infarkt volumina fielen auf diese Weise etwas größer aus, der Unterschied zwischen den beiden Gruppen betrug allerdings wiederum 38%. Diese Reduktion des Infarkt volumens durch Fehlen des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors fällt geringer aus als man nach den Berichten zweier pharmakologischer Studien zur Therapie der transienten fokalen zerebralen Ischämie an Ratten mit den B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten CP-0597 (Relton et al., 1997) und LF 16-0687Ms (Zausinger et al., 2002) vermuten würde. Diese hatten eine Reduktion um 55% bzw. 50% gezeigt. Diese Differenz könnte in Unterschieden im experimentellen Aufbau oder den unterschiedlichen Versuchstieren begründet liegen. Für letzteres würde sprechen, dass Ding-Zhou et al. in Mäusen mit dem Antagonisten LF 16-0687Ms nur eine Reduktion des Infarkt volumens um 33% nach transientser fokaler zerebraler Ischämie erreichen konnten (Ding-Zhou et al., 2003).

#### **4.3.3 Kurz- und langfristige Folgen der Ischämie**

Um zu untersuchen, ob sich dieser Verlust an Hirngewebe funktionell bemerkbar macht, ermittelten wir in den B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen und ihren Kontrollen die motorische Funktion in den ersten 24 Stunden nach Ischämie sowie die Entwicklung ihres Körpergewichts und ihre Überlebenszeit bis 7 Tage nach Ischämie. B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäuse haben unter physiologischen Bedingungen eine unbeeinträchtigte sensomotorische und allgemein neurologische Funktion (Rupniak et al., 1997). Unter den Bedingungen der zerebralen Ischämie zeigten sie in unserem Test der motorischen Funktion sowohl unmittelbar vor Reperfusion wie auch 24 Stunden nach Ischämie eine deutlich bessere Funktion als ihre Kontrollen. Dies lässt vermuten, dass bereits während der Ischämie die Menge des funktionell beeinträchtigten Hirngewebes in den B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen geringer ist als in den Kontrollen. Der Unterschied 24 Stunden nach Ischämie findet sein morphologisches Korrelat im Unterschied der Infarkt volumina. Beide Gruppen hatten sich in ihrer motorischen Funktion in den 24 Stunden signifikant verbessert. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das zum Zeitpunkt der Reperfusion funktionell beeinträchtigte Gewebe der Penumbra nicht komplett untergegangen ist sondern teilweise seine funktionelle Integrität zurück gewonnen hat. Unsere Ergebnisse einer Verbesserung der motorischen Funktion durch Fehlen des B<sub>2</sub> Rezeptors stimmen mit den Ergebnissen pharmakologischer Studien mit den B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten CP-0597 und LF 16-0687Ms überein, die in Ratten

und Mäusen eine neurologische Verbesserung durch diese Antagonisten nach transienter fokaler zerebraler Ischämie beschrieben haben (Ding-Zhou et al., 2003; Relton et al., 1997; Zausinger et al., 2002).

Funktionelle Unterschiede lassen sich über neurologische Tests jedoch nur in der ersten Zeit nach Ischämie beurteilen, da Gehirne von Nagern ein enormes funktionelles Regenerationsvermögen haben. Zausinger et al. zeigten mit ausführlichsten neurologischen Tests an Ratten über 7 Tage nach transienter fokaler zerebraler Ischämie, dass sich ihre Fähigkeiten kontinuierlich verbessern, bis sie nach einer Woche fast keine neurologischen Defizite mehr zeigen (Zausinger et al., 2002).

Da diese Regeneration nach unseren eigenen Beobachtungen in Mäusen noch schneller abläuft, suchten wir nach einer Möglichkeit, auch im mittleren Zeitraum von ein paar Tagen nach Ischämie den Zustand unserer Versuchstiere beurteilen zu können. Wir vermuteten, dass das Körpergewicht ein Indikator für den Allgemeinzustand der Mäuse sein könnte. Um dies zu untersuchen, maßen wir bis zu 7 Tage nach Ischämie täglich das Körpergewicht in  $B_2^{-/-}$  Mäusen und Kontrollen. Wir sahen, dass in Mäusen, die während des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen verstarben, das Körpergewicht bis zum Tod kontinuierlich abnahm. In Mäusen, die die Beobachtungszeit überlebten, fiel das Körpergewicht in den ersten 24 Stunden um 10%, stabilisierte sich auf diesem Niveau über die folgenden 3 Tage und erholte sich dann, bis es am 6. Tag fast wieder Ausgangsniveau erreichte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich beim Körpergewicht in der Tat um einen Indikator für den Allgemeinzustand der Versuchstiere handelt. Als wir die beiden Versuchsgruppen verglichen, konnten wir jedoch keinen Unterschied feststellen. Die wildtyp Mäuse hatten im Durchschnitt sogar ein leicht höheres Körpergewicht als die  $B_2^{-/-}$  Mäuse. Dies ist dadurch zu erklären, dass in der wildtyp Gruppe die Tiere früher starben. In der knockout Gruppe hingegen blieben auch die schwer beeinträchtigten Mäuse, die im Rahmen ihres schlechten Allgemeinzustandes wahrscheinlich weniger Nahrung und Flüssigkeit zu sich nahmen und dadurch ein tendenziell niedrigeres Körpergewicht hatten, länger am Leben und drückten das durchschnittliche Körpergewicht nach unten. Hierfür spricht auch, dass sich der Trend von durchschnittlich sinkenden zu steigenden Körpergewichten in beiden Gruppen jeweils an dem Tag umkehrte, als die Hälfte der Tiere – also die, die von der Ischämie besonders schwer gezeichnet waren – verendet war. Dies entsprach in der wildtyp Gruppe dem 3. Tag, in der knockout Gruppe dem 5. Tag.

Der Hirnwassergehalt, das Infarkt volumen und die motorische Funktion wurden innerhalb des ersten Tages nach transienter fokaler zerebraler Ischämie bestimmt. Die



besseren Ergebnisse in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen in dieser frühen Phase bedeuten aber nicht zwangsweise auch einen längerfristigen Vorteil durch Fehlen des  $B_2$  Rezeptors. Um zu untersuchen, ob Mäuse auch in der chronischen Phase nach Ischämie vom Fehlen des Rezeptors profitieren, bestimmten wir die Mortalität der ersten Woche nach Insult in  $B_2^{-/-}$  Mäusen und Kontrollen. Das von uns verwendete Modell ist für die Versuchstiere tödlich, wobei sie aber nicht in der akuten Phase, in der die zerebrale Pannekrose wie das Hirnödem zunehmen, verenden sondern erst später. Wir beobachteten eine signifikant längere Überlebenszeit von  $B_2^{-/-}$  Mäusen. Während von diesen sechs Tage nach Ischämie immer noch die Hälfte am Leben war, war die Hälfte der Kontrollen bereits nach drei Tagen verstorben. Die  $B_2^{-/-}$  Mäuse sind also nicht nur kurz- sondern auch längerfristig vor den Folgen der transienten fokalen zerebralen Ischämie geschützt. Da bisher nicht bekannt ist, was genau zum Tod der Tiere führt, kann man spekulieren, dass schlicht der geringere Verlust an Nervengewebe das Überleben der  $B_2^{-/-}$  Mäuse verbessert.

#### **4.3.4 Schlussfolgerung**

Da Phänotyp und Expression des  $B_1$  Rezeptors sich in den  $B_2^{-/-}$  Mäusen nicht von dem der Kontrolltiere unterscheiden, muss – wie bereits vermutet (Ding-Zhou et al., 2003; Relton et al., 1997; Zausinger et al., 2002) – die beobachtete Ischämieresistenz mit der fehlenden Expression des Kinin  $B_2$  Rezeptors in Verbindung gebracht werden. Es existieren Hinweise bezüglich einer schützenden Funktion des Kinin  $B_1$  Rezeptors bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie. Relton et al. mutmaßten, dass  $B_1$  Antagonisten die protektive Wirkung von  $B_2$  Antagonisten abschwächen könnten (Relton et al., 1997). Lehmborg et al. beobachteten bei der globalen Ischämie des Gerbils keine Wirkung des  $B_1/B_2$  Antagonisten B-9340 auf die Anzahl überlebender Neurone und eine leichte Verschlechterung der neurologischen Funktion (Lehmborg et al., 2000). Diese Befunde zusammen genommen mit einer kürzlich erschienen Studie, die eine Neuroprotektion durch Überexpression von Kallikrein im Gehirn zeigt (Xia et al., 2004), könnten auf eine schädliche wie neuroprotektive Rolle von Bradykinin beim akuten Hirnschaden hindeuten, wie in unserer Arbeitsgruppe bereits vermutet wurde (Plesnila et al., 2001a). Obwohl die gegenwärtigen Daten auf eine wichtige Rolle des Kinin  $B_2$  Rezeptors für die Entwicklung des postischämischen Hirnschadens hinweisen, sind die Mechanismen des durch Bradykinin induzierten Zelltodes noch immer nicht ausreichend verstanden. Bisher wurde dieser durch

Bradykinin hervorgerufene Hirnschaden hauptsächlich mit der Erhöhung der vaskulären Permeabilität und der folgenden Entwicklung eines posttraumatischen oder postischämischen Hirnödems erklärt (Francel, 1992; Kamiya et al., 1990; Kamiya et al., 1993; Kaplanski et al., 2002; Maier-Hauff et al., 1984; Plesnila et al., 2001a; Schilling und Wahl, 1999; Stover et al., 2000; Unterberg et al., 1986; Unterberg und Baethmann, 1984; Wahl et al., 1996; Whittle et al., 1992; Yong und Linthicum, 1996; Zausinger et al., 2002). Allerdings wurden auch andere Mechanismen wie z.B. die Generierung inflammatorischer Mediatoren, die Aktivierung von Leukozyten oder die Produktion freier Radikale vermutet (Francel, 1992), die neben dem Einfluss auf die Bildung des Hirnödems jedoch zweitrangig sein könnten. Unsere Ergebnisse, die eine deutliche Erhöhung der Expression des B<sub>2</sub> Rezeptors auf Neuronen zeigen, könnten auf einen direkten Einfluss von Bradykinin auf deren Überleben nach zerebraler Ischämie hindeuten. Dieser Einfluss könnte bisher übersehen worden sein, da Neurone in der Kultur keine Expression von Kinin Rezeptoren aufweisen (Couture et al., 2001) und dadurch Studien zur Bedeutung des Kallikrein-Kinin Systems für das neuronale Überleben schwierig machen. Da die Rolle von Bradykinin für das neuronale Überleben und den Zelltod nach akutem Hirnschaden ambivalent zu sein scheint, wären weitere Untersuchungen dringend notwendig. Für klinische Therapiestudien, wie sie mit dem B<sub>2</sub> Antagonisten CP-0127 beim Schädel-Hirn Trauma bereits durchgeführt wurden (Marmarou et al., 1999; Narotam et al., 1998), ist es unseres Erachtens jedoch noch zu früh.

## 5 Zusammenfassung

Bradykinin – ein früher Entzündungsmediator – ist ein aktiver Metabolit des Kallikrein-Kinin Systems, der seine Funktion in erster Linie über den konstitutiv exprimierten Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor vermittelt. Sämtliche Komponenten dieses Systems sind im Gehirn nachgewiesen worden. Pharmakologische Studien mit Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten lassen vermuten, dass Bradykinin an der Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach zerebraler Ischämie beteiligt ist. Ferner gibt es sehr starke Hinweise darauf, dass Bradykinin durch Öffnung der Blut-Hirn Schranke maßgeblich an der Entstehung des Hirnödems nach Ischämie beteiligt ist. Dennoch ist der zeitliche Verlauf der Produktion von Bradykinin und der Expression der Kinin Rezeptoren sowie die Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Entwicklung des Hirnschadens nach experimentellem Schlaganfall bisher nicht weiter beleuchtet worden.

Aufgrund der sehr starken Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz des Kallikrein-Kinin Systems bei der zerebralen Ischämie, wollten wir dessen Beteiligung an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie genauer untersuchen. Hierfür unterzogen wir Mäuse des Stammes C57/Bl6 einer 45minütigen Okklusion der A. cerebri media (MCA) mittels eines intraluminalen Fadens, was zu einem standardisierten ischämischen Infarkt im MCA-Versorgungsgebiet führte. Zunächst bestimmten wir die Konzentration an Bradykinin mit einem Radioimmunoassay, sowie die Expression der Kinin Rezeptoren auf mRNA- und Protein-Ebene mit Real-Time PCR bzw. Immunhistochemie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ischämie. Nachdem wir die zeitlichen Verläufe der Produktion von Bradykinin und der Expression der Kinin Rezeptoren ermittelt hatten, interessierten wir uns besonders für die funktionelle Bedeutung des B<sub>2</sub> Rezeptors, über den vermutlich die pathologischen Mechanismen in Gang gesetzt werden. Um dessen Bedeutung beurteilen zu können, ermittelten wir 24 Stunden nach Ischämie bei B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäusen (B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) gravimetrisch durch Messung von Feucht- und Trockengewicht das Hirnödem, histomorphometrisch das Infarktvolumen, die motorische Funktion mit Hilfe eines Neuroscores und die Mortalität während der ersten Woche nach experimentellem Schlaganfall. Die B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> und C57/Bl6 Mäuse waren zuvor ausführlich hinsichtlich der für unsere Versuche relevanten Parameter charakterisiert und verglichen worden, wobei wir die C57/Bl6 Mäuse als geeignete Kontrollen evaluierten.

Die Konzentration an Bradykinin im Hirngewebe war 12 Stunden nach Ischämie maximal angestiegen (3-fach), während die Hochregulation der mRNA der Kinin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Rezeptoren nach 24 Stunden ihr Maximum hatte (5-fach bzw. 17-fach). Die Immunhistochemie zeigte, dass die Kinin B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Rezeptoren konstitutiv über das gesamte Mäusegehirn verteilt exprimiert wurden, bereits 2 Stunden nach Ischämie in Neuronen, die morphologische Zeichen ischämischer Schädigung zeigten, hochreguliert wurden und über 24 Stunden hochreguliert blieben. Bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors für die Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie zeigte sich, dass die B<sub>2</sub> Rezeptor knockout Mäuse verglichen mit ihren wildtyp Kontrollen signifikant vor den Folgen der MCA-Okklusion geschützt waren. Sie hatten verglichen mit ihren Kontrollen eine bessere motorische Funktion ( $p < 0,03$ ) und ein um 38% kleineres Infarktvolumen ( $p < 0,001$ ), entwickelten um 87% weniger Hirnödeme ( $p < 0,05$ ) und überlebten länger ( $p < 0,05$ ).

Somit bestätigen unsere Ergebnisse die Befunde anderer Arbeitsgruppen, die eine Neuroprotektion durch eine Pharmakotherapie mit B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten bei der zerebralen Ischämie zeigen konnten. Während die zeitlichen Muster der Produktion von Bradykinin und der Expression der Kinin Rezeptoren nach transientser fokaler zerebraler Ischämie eine allgemeine Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Pathophysiologie des Schlaganfalls nahe legen, weisen unsere Versuche mit B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Mäusen auf eine besonders schädliche Rolle des Kinin B<sub>2</sub> Rezeptors beim postischämischen Zelltod hin. Desweiteren scheint der Kinin B<sub>2</sub> Rezeptor ein sehr wichtiger Faktor der Hirnödementstehung zu sein. Diese Befunde erweitern unser bisher sehr beschränktes Verständnis des Kallikrein-Kinin Systems nach zerebraler Ischämie und könnten den Weg zu der Entwicklung neuer, spezifischerer Strategien zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls ebnen.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdalla S, Lothar H, Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407: 94-98.

Adolfo AG, Regina PS, Cristina LE, Bader M, Abrao CE, Graca Naffah-Mazzacoratti M, Bosco PJ, Antonio SJ, Jr. (2004) Role of kinin B1 and B2 receptors in the development of pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1013: 30-39.

Alexiou T, Boon WM, Denton DA, Nicolantonio RD, Walker LL, McKinley MJ, Campbell DJ (2005) Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene copy number and angiotensin and bradykinin peptide levels in mice. *J Hypertens* 23: 945-954.

Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carretero OA (1997) Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* 29: 483-487.

Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA (1996) Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 625-630.

Allogho SN, Gobeil F, Pheng LH, Nguyen L, Neugebauer W, Regoli D (1995) Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1759-1764.

Almeida e Silva TC, Pela IR (1978) Changes in rectal temperature of the rabbit by intracerebroventricular injection of bradykinin and related kinins. *Agents Actions* 8: 102-107.

Ames A, III, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G (1968) Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-453.

Arbeit JM, Hirose R (1999) Murine mentors: transgenic and knockout models of surgical disease. *Ann Surg* 229: 21-40.

Arganaraz GA, Silva JA, Jr., Perosa SR, Pessoa LG, Carvalho FF, Bascands JL, Bader M, da Silva TE, Amado D, Cavaleiro EA, Pesquero JB, Graca Naffah-Mazzacoratti M (2004) The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1006: 114-125.

- Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725.
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977) Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8: 51-57.
- Austin CE, Faussner A, Robinson HE, Chakravarty S, Kyle DJ, Bathon JM, Proud D (1997) Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem* 272: 11420-11425.
- Back T, Hoehn-Berlage M, Kohno K, Hossmann KA (1994) Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. *Stroke* 25: 494-500.
- Bareis DL, Manganiello VC, Hirata F, Vaughan M, Axelrod J (1983) Bradykinin stimulates phospholipid methylation, calcium influx, prostaglandin formation, and cAMP accumulation in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2514-2518.
- Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN (1993) Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 683-692.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80.
- Black KL, Hoff JT (1985) Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats. *Ann Neurol* 18: 349-351.
- Blatter LA, Taha Z, Mesaros S, Shacklock PS, Wier WG, Malinski T (1995) Simultaneous measurements of Ca<sup>2+</sup> and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ Res* 76: 922-924.
- Block F, Schwarz M (1996) Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci Lett* 208: 41-44.

- Boels K, Schaller HC (2003) Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor. *Br J Pharmacol* 140: 932-938.
- Bogle RG, Coade SB, Moncada S, Pearson JD, Mann GE (1991) Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 926-932.
- Borkowski JA, Hess JF (1995) Targeted disruption of the mouse B2 bradykinin receptor in embryonic stem cells. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 773-779.
- Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, Hess JF (1995) Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 270: 13706-13710.
- Bregola G, Varani K, Gessi S, Beani L, Bianchi C, Borea PA, Regoli D, Simonato M (1999) Changes in hippocampal and cortical B1 bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy. *Neuroscience* 92: 1043-1049.
- Brooks DP, Share L, Crofton JT, Nasjletti A (1986) Interrelationship between central bradykinin and vasopressin in conscious rats. *Brain Res* 371: 42-48.
- Brussel T, Fitch W, Brodner G, Arendt I, Van Aken H (1991) Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in the baboon. *Anesth Analg* 73: 758-764.
- Burch RM, Axelrod J (1987) Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6374-6378.
- Busse R, Fleming I, Hecker M (1993) Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 5: S31-S36.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD (1989) The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke* 20: 1113-1114.
- Butt AM (1995) Effect of inflammatory agents on electrical resistance across the blood- brain barrier in pial microvessels of anaesthetized rats. *Brain Res* 696: 145-150.

- Caligiorne SM, Santos RA, Campagnole-Santos MJ (1996) Cardiovascular effects produced by bradykinin microinjection into the nucleus tractus solitarii of anesthetized rats. *Brain Res* 720: 183-190.
- Camargo AC, Graeff FG (1969) Subcellular distribution and properties of the bradykinin inactivation system in rabbit brain homogenates. *Biochem Pharmacol* 18: 548-549.
- Campos MM, Souza GE, Calixto JB (1999) In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol* 127: 1851-1859.
- Cerf ME, Raidoo DM (2000) Immunolocalization of plasma kallikrein in human brain. *Metab Brain Dis* 15: 315-323.
- Cervenka L, Harrison-Bernard LM, Dipp S, Primrose G, Imig JD, El Dahr SS (1999) Early onset salt-sensitive hypertension in bradykinin B(2) receptor null mice. *Hypertension* 34: 176-180.
- Chan PH, Fishman RA (1984) The role of arachidonic acid in vasogenic brain edema. *Fed Proc* 43: 210-213.
- Chan PH, Fishman RA, Caronna J, Schmidley JW, Prioleau G, Lee J (1983a) Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid. *Ann Neurol* 13: 625-632.
- Chan PH, Kerlan R, Fishman RA (1983b) Reductions of gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J Neurochem* 40: 309-316.
- Chao J, Woodley C, Chao L, Margolius HS (1983) Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J Biol Chem* 258: 15173-15178.
- Chen EY, Emerich DF, Bartus RT, Kordower JH (2000) B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427: 1-18.
- Cholewinski AJ, Stevens G, McDermott AM, Wilkin GP (1991) Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J Neurochem* 57: 1456-1458.



- Chopp M, Welch KM, Tidwell CD, Helpert JA (1988) Global cerebral ischemia and intracellular pH during hyperglycemia and hypoglycemia in cats. *Stroke* 19: 1383-1387.
- Cloutier F, Ongali B, Campos MM, Thibault G, Neugebauer W, Couture R (2004) Correlation between brain bradykinin receptor binding sites and cardiovascular function in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 142: 285-296.
- Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ (1996) Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 38: 523-531.
- Correa FM, Guilhaume SS, Saavedra JM (1990) Autoradiography of angiotensin-converting enzyme in fixed and unfixed rat brain using the specific enzyme inhibitor [125I]351A or a polyclonal antibody and [125I]staphylococcal protein A. *Neurosci Lett* 110: 244-248.
- Correa FM, Innis RB, Uhl GR, Snyder SH (1979) Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1489-1493.
- Correa FM, Plunkett LM, Saavedra JM (1986) Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry. *Brain Res* 375: 259-266.
- Couto LB, Correa FM, Pela IR (1998) Brain sites involved in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. *Br J Pharmacol* 125: 1578-1584.
- Couture R, Harrison M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161-176.
- Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, Samuelsson B (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3887-3891.
- de la Torre JC, Fortin T, Saunders JK, Butler K, Richard MT (1992) The no-reflow phenomenon is a post-mortem artifact. *Acta Neurochir (Wien)* 115: 37-42.
- De Sousa BH, Ongali B, Thibault G, Lindsey CJ, Couture R (2002) Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 249-257.

- del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22: 1276-1283.
- Ding-Zhou L, Marchand-Verrecchia C, Croci N, Plotkine M, Margail I (2002) L-NAME reduces infarction, neurological deficit and blood-brain barrier disruption following cerebral ischemia in mice. *Eur J Pharmacol* 457: 137-146.
- Ding-Zhou L, Margail I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C (2003) 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* 139: 1539-1547.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397.
- Doetschman T (1999) Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab Anim Sci* 49: 137-143.
- Dogan A, Eras MA, Rao VL, Dempsey RJ (1999) Protective effects of memantine against ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 1107-1113.
- Easton AS, Abbott NJ (2002) Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 953: 157-169.
- Eggerickx D, Raspe E, Bertrand D, Vassart G, Parmentier M (1992) Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1306-1313.
- Emanuelli C, Maestri R, Corradi D, Marchione R, Minasi A, Tozzi MG, Salis MB, Straino S, Capogrossi MC, Olivetti G, Madeddu P (1999) Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation* 100: 2359-2365.
- Farooqui AA, Anderson DK, Flynn C, Bradel E, Means ED, Horrocks LA (1990) Stimulation of mono- and diacylglycerol lipase activities by bradykinin in neural cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 1001-1009.

- Feletou M, Bonnardel E, Canet E (1996) Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 118: 1371-1376.
- Fischer EG, Ames A, III, Hedley-Whyte ET, O'Gorman S (1977) Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon". *Stroke* 8: 36-39.
- Fisher M (2003) Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 34: 1539-1546.
- Fishman RA, Chan PH (1981) Hypothesis: membrane phospholipid degradation and polyunsaturated fatty acids play a key role in the pathogenesis of brain edema. *Trans Am Neurol Assoc* 106: 58-61.
- Francel PC (1992) Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1: S27-S45.
- Francel PC, Miller RJ, Dawson G (1987) Modulation of bradykinin-induced inositol trisphosphate release in a novel neuroblastoma x dorsal root ganglion sensory neuron cell line (F- 11). *J Neurochem* 48: 1632-1639.
- Fujiwara Y, Mantione CR, Vavrek RJ, Stewart JM, Yamamura HI (1989) Characterization of [<sup>3</sup>H]bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B2 subtypes. *Life Sci* 44: 1645-1653.
- Fujiwara Y, Mantione CR, Yamamura HI (1988) Identification of B2 bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol* 147: 487-488.
- Gammon CM, Allen AC, Morell P (1989) Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J Neurochem* 53: 95-101.
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ (1994) Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 144: 188-199.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26: 627-634.

- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M (1993) Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623-635.
- Gimpl G, Walz W, Ohlemeyer C, Kettenmann H (1992) Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses. *Neurosci Lett* 144: 139-142.
- Ginsberg MD, Busto R (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20: 1627-1642.
- Gorgulu A, Kins T, Cobanoglu S, Unal F, Izgi NI, Yanik B, Kucuk M (2000) Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 1287-1292.
- Gorlach C, Hortobagyi T, Hortobagyi S, Benyo Z, Relton J, Whalley ET, Wahl M (2001) Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. *J Neurotrauma* 18: 833-838.
- Gorlach C, Wahl M (1996) Bradykinin dilates rat middle cerebral artery and its large branches via endothelial B2 receptors and release of nitric oxide. *Peptides* 17: 1373-1378.
- Graeff FG, Pela IR, Rocha e Silva (1969) Behavioural and somatic effects of bradykinin injected into the cerebral ventricles of unanaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol* 37: 723-732.
- Guo ZL, Li P, Longhurst JC (2002) Central pathways in the pons and midbrain involved in cardiac sympathoexcitatory reflexes in cats. *Neuroscience* 113: 435-447.
- Haasemann M, Cartaud J, Muller-Esterl W, Dunia I (1998) Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci* 111 ( Pt 7): 917-928.
- Hacke W, Brodt T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von Kummer R, Donnan G, Heiss WD, Wahlgren NG, Spranger M, Boysen G, Marler JR (1999) Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology* 53: S3-14.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, . (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274: 1017-1025.

- Hallenbeck JM (1996) Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol* 71: 281-297.
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 605-611.
- Harp JR, Nilsson L, Siesjo BK (1976) The effect of halothane anaesthesia upon cerebral oxygen consumption in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 20: 83-90.
- Harris BD, Moody EJ, Basile AS, Skolnick P (1994) Volatile anesthetics bidirectionally and stereospecifically modulate ligand binding to GABA receptors. *Eur J Pharmacol* 267: 269-274.
- Hashizume K, Black KL (2002) Increased endothelial vesicular transport correlates with increased blood-tumor barrier permeability induced by bradykinin and leukotriene C4. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 725-735.
- Hata R, Mies G, Wiessner C, Fritze K, Hesselbarth D, Brinker G, Hossmann KA (1998) A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 367-375.
- Heiss WD (1983) Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue. *Stroke* 14: 329-331.
- Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, Wagner R, Wienhard K (1992) Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 193-203.
- Heiss WD, Rosner G (1983) Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Ann Neurol* 14: 294-301.
- Hellal F, Pruneau D, Palmier B, Faye P, Croci N, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C (2003) Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 20: 841-851.
- Hess JF, Borkowski JA, MacNeil T, Stonesifer GY, Fraher J, Strader CD, Ransom RW (1994) Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol* 45: 1-8.

Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW (1992) Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 260-268.

Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA (1996) The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology* 33: 1-8.

Higashida H, Streaty RA, Klee W, Nirenberg M (1986) Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 942-946.

Hoffman WE, Schmid PG (1978) Separation of pressor and antidiuretic effects of intraventricular bradykinin. *Neuropharmacology* 17: 999-1002.

Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, Stemerman MB (1990) Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 143: 21-25.

Homayoun P, Harik SI (1991) Bradykinin receptors of cerebral microvessels stimulate phosphoinositide turnover. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 557-566.

Hosli E, Hosli L (1993) Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport* 4: 159-162.

Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565.

Hossmann KA (1997) Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock* 8: 95-101.

Hossmann KA (1998) Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 39: 106-120.

Hsieh HL, Yen MH, Jou MJ, Yang CM (2004) Intracellular signalings underlying bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocyte-1. *Cell Signal* 16: 1163-1176.

Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885.

Iadecola C (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132-139.

Jackson TR, Hallam TJ, Downes CP, Hanley MR (1987) Receptor coupled events in bradykinin action: rapid production of inositol phosphates and regulation of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in a neural cell line. *EMBO J* 6: 49-54.

Jeftinija SD, Jeftinija KV, Stefanovic G (1997) Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res* 750: 41-47.

Jeftinija SD, Jeftinija KV, Stefanovic G, Liu F (1996) Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66: 676-684.

Jones C, Phillips E, Davis C, Arbuckle J, Yaqoob M, Burgess GM, Docherty RJ, Webb M, Bevan SJ, McIntyre P (1999) Molecular characterisation of cloned bradykinin B1 receptors from rat and human. *Eur J Pharmacol* 374: 423-433.

Joo F, Temesvari P, Dux E (1983) Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res* 278: 165-174.

Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A (1993) The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24: 571-575.

Kamiya T, Katayama Y, Shimizu J, Soeda T, Nagazumi A, Terashi A (1990) Studies on relation of bradykinin to ischemic brain edema in stroke-resistant spontaneously hypertensive rat. *Adv Neurol* 52: 543.

Kaplanski J, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Pruneau D, Shapira Y (2003) LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. *Resuscitation* 56: 207-213.

Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Shapira Y (2002) 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* 19: 953-964.

Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR (1994a) Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 80: 112-119.

Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR (1994b) Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 620-627.

Kariya K, Iwaki H, Ihda M, Maruta E, Murase M (1981a) Central action of bradykinin (I). Electroencephalogram of bradykinin and its degradation system in rat brain. *Jpn J Pharmacol* 31: 261-267.

Kariya K, Kawauchi R, Okamoto H (1981b) Regional distribution of kininase in rat brain. *J Neurochem* 36: 2086-2088.

Kariya K, Yamauchi A (1981) Effects of intraventricular injection of bradykinin on the EEG and the blood pressure in conscious rats. *Neuropharmacology* 20: 1221-1224.

Kariya K, Yamauchi A, Chatani Y (1982a) Relationship between central actions of bradykinin and prostaglandins in the conscious rat. *Neuropharmacology* 21: 267-272.

Kariya K, Yamauchi A, Hattori S, Tsuda Y, Okada Y (1982b) The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1461-1466.

Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T (1985) Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* 44: 1892-1897.

Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG (1989) Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 403-414.

Kasuya H, Shimizu T, Okada T, Takahashi K, Summerville T, Kitamura K (1988) Activation of the coagulation system in the subarachnoid space after subarachnoid haemorrhage: serial measurement of fibrinopeptide A and bradykinin of cerebrospinal fluid and plasma in patients with subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 91: 120-125.

Kataoka H, Kim SW, Plesnila N (2004) Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 668-676.



Kempski O, Behmanesh S (1997) Endothelial cell swelling and brain perfusion. *J Trauma* 42: S38-S40.

Khan IM, Yamaji I, Miller DH, Margolius HS, Privitera PJ (1993) Cerebrospinal fluid kallikrein in spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 11: 1039-1045.

Kizuki K, Suzuki T, Kudo M, Noguchi T (1994) Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res* 634: 305-309.

Kleniewski J, Bogumil-Oczkowska M (1980) The concentration of high molecular weight kininogen antigen in homogenates of various human tissues. *Experientia* 36: 354-356.

Kochanek PM, Hallenbeck JM (1992) Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 23: 1367-1379.

Koenig HM, Pelligrino DA, Albrecht RF (1993) Halothane vasodilation and nitric oxide in rat pial vessels. *J Neurosurg Anesthesiol* 5: 264-271.

Kohno K, Hoehn-Berlage M, Mies G, Back T, Hossmann KA (1995) Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. *Magn Reson Imaging* 13: 73-80.

Kontos HA (2001) Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* 32: 2712-2716.

Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML (1985) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57: 142-151.

Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, Christman CW (1984) Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ Res* 55: 295-303.

Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellis EF (1980) Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G<sub>2</sub>. *Science* 209: 1242-1245.

Kristian T, Siesjo BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29: 705-718.

- Kudo M, Aono M, Lee Y, Massey G, Pearlstein RD, Warner DS (2001) Absence of direct antioxidant effects from volatile anesthetics in primary mixed neuronal-glia cultures. *Anesthesiology* 94: 303-212.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF (1986) PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59: 612-619.
- Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW (2002) Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H406-H411.
- Lambert TL, Kent RS, Whorton AR (1986) Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 261: 15288-15293.
- Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F, Jr., Chemtob S, George SR, O'Dowd BF (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem* 279: 7901-7908.
- Lee YJ, Zachrisson O, Tonge DA, McNaughton PA (2002) Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 19: 186-200.
- Lehmberg J, Beck J, Baethmann A, Uhl E (2000) Influence of the bradykinin B1/B2-receptor-antagonist B 9430 on the cerebral microcirculation and outcome of gerbils from global cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 76: 39-41.
- Lehmberg J, Beck J, Baethmann A, Uhl E (2003) Bradykinin antagonists reduce leukocyte-endothelium interactions after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 441-448.
- Levy D, Zochodne DW (2000) Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 86: 265-271.
- Lindsey CJ, Buck HS, Fior-Chadi DR, Lapa RC (1997) Pressor effect mediated by bradykinin in the paratrigeminal nucleus of the rat. *J Physiol* 502 ( Pt 1): 119-129.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79: 1431-1568.

- Liu Y, Hashizume K, Chen Z, Samoto K, Ningaraj N, Asotra K, Black KL (2001) Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurol Res* 23: 379-387.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4: 399-415.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.
- Lorenzl S, Kodel U, Frei K, Pfister HW (1996) Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Eur J Pharmacol* 308: 335-341.
- Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, Busse R (1988) Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* 95: 189-196.
- Madden KP (1994) Effect of gamma-aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits. *Stroke* 25: 2271-2274.
- Madeddu P, Emanuelli C, Gaspa L, Salis B, Milia AF, Chao L, Chao J (1999) Role of the bradykinin B2 receptor in the maturation of blood pressure phenotype: lesson from transgenic and knockout mice. *Immunopharmacology* 44: 9-13.
- Madeddu P, Parpaglia PP, Glorioso N, Chao L, Chao J (1996) Antisense inhibition of the brain kallikrein-kinin system. *Hypertension* 28: 980-987.
- Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, Emanuelli C, Demontis MP, Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Anania V (1997) Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation* 96: 3570-3578.
- Maeda K, Hata R, Bader M, Walther T, Hossmann KA (1999) Larger anastomoses in angiotensinogen-knockout mice attenuate early metabolic disturbances after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1092-1098.
- Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM (2000) Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis* 15: 325-335.

Maier-Hauff K, Baethmann AJ, Lange M, Schurer L, Unterberg A (1984) The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J Neurosurg* 61: 97-106.

Makevnina LG, Lomova IP, Zubkov Y, Semenyutin VB (1994) Kininogen consumption in cerebral circulation of humans during brain ischemia and postischemic reperfusion. *Braz J Med Biol Res* 27: 1955-1963.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386.

Marmarou A, Nichols J, Burgess J, Newell D, Troha J, Burnham D, Pitts L (1999) 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* 16: 431-444.

Martin TW, Michaelis KC (1988) Bradykinin stimulates phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1271-1279.

Matsuyama T, Michishita H, Nakamura H, Tsuchiyama M, Shimizu S, Watanabe K, Sugita M (1993) Induction of copper-zinc superoxide dismutase in gerbil hippocampus after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 135-144.

Mayhan WG (1992) Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. *Inflammation* 16: 295-305.

Mayhan WG (2001) Regulation of blood-brain barrier permeability. *Microcirculation* 8: 89-104.

McIntyre P, Phillips E, Skidmore E, Brown M, Webb M (1993) Cloned murine bradykinin receptor exhibits a mixed B1 and B2 pharmacological selectivity. *Mol Pharmacol* 44: 346-355.

Melton DW (1994) Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16: 633-638.

Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK (1992) Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23: 552-559.

- Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-21586.
- Mhairi M, I (1992) New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* 34: 302-308.
- Miao N, Frazer MJ, Lynch C, III (1995) Volatile anesthetics depress Ca<sup>2+</sup> transients and glutamate release in isolated cerebral synaptosomes. *Anesthesiology* 83: 593-603.
- Milia AF, Gross V, Plehm R, De SJ, Jr., Bader M, Luft FC (2001) Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B(2) receptor. *Hypertension* 37: 1473-1479.
- Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjo BK (1990) The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 365-374.
- Montagutelli X (2000) Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16: S101-S105.
- Morbidelli L, Parenti A, Giovannelli L, Granger HJ, Ledda F, Ziche M (1998) B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br J Pharmacol* 124: 1286-1292.
- Morgan-Boyd R, Stewart JM, Vavrek RJ, Hassid A (1987) Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 253: C588-C598.
- Morgenstern LB (1997) rtPA in acute ischemic stroke: the North American perspective. *Neurology* 49: S63-S65.
- Munoz CM, Cotecchia S, Leeb-Lundberg LM (1993) B2 kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch Biochem Biophys* 301: 336-344.
- Munoz CM, Leeb-Lundberg LM (1992) Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J Biol Chem* 267: 303-309.

- Murad F (1996) The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 276: 1189-1192.
- Murakami K, Kondo T, Kawase M, Chan PH (1998) The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Res* 780: 304-310.
- Murone C, Paxinos G, McKinley MJ, Oldfield BJ, Muller-Esterl W, Mendelsohn FA, Chai SY (1997) Distribution of bradykinin B2 receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 381: 203-218.
- Murone C, Perich RB, Schlawe I, Chai SY, Casley D, MacGregor DP, Muller-Esterl W, Mendelsohn FA (1996) Characterization and localization of bradykinin B2 receptors in the guinea-pig using a radioiodinated HOE140 analogue. *Eur J Pharmacol* 306: 237-247.
- Nagasawa H, Kogure K (1989) Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20: 1037-1043.
- Narimatsu E, Tsai YC, Gerhold TD, Kamath SH, Davies LR, Sokoll MD (1996) A comparison of the effect of halothane on N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Anesth Analg* 82: 843-847.
- Narotam PK, Rodell TC, Nadvi SS, Bhoola KD, Troha JM, Parbhoosingh R, van Dellen JR (1998) Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP- 0127. *Acta Neurochir (Wien)* 140: 793-802.
- Nedergaard M (1988) Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 77: 81-101.
- Nellgard B, Mackensen GB, Pineda J, Wellons JC, III, Pearlstein RD, Warner DS (2000) Anesthetic effects on cerebral metabolic rate predict histologic outcome from near-complete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology* 93: 431-436.
- Ni A, Yin H, Agata J, Yang Z, Chao L, Chao J (2003) Overexpression of kinin B1 receptors induces hypertensive response to des-Arg9-bradykinin and susceptibility to inflammation. *J Biol Chem* 278: 219-225.

- Nishizuka Y (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698.
- Niwa K, Haensel C, Ross ME, Iadecola C (2001) Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res* 88: 600-608.
- Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K (2003) Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 72: 1573-1581.
- Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C (1998) Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10966-10971.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17: 2746-2755.
- Norman MU, Lew RA, Smith AI, Hickey MJ (2003) Metalloendopeptidases EC 3.4.24.15/16 regulate bradykinin activity in the cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1942-H1948.
- Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A (1998) Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 351: 1693-1697.
- Olesen SP (1987a) Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta Physiol Scand* 129: 181-187.
- Olesen SP (1987b) Regulation of ion permeability in frog brain venules. Significance of calcium, cyclic nucleotides and protein kinase C. *J Physiol* 387: 59-68.
- Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, Simonato M, Couture R (2003) Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* 461: 506-519.
- Onoue H, Kaito N, Tomii M, Tokudome S, Nakajima M, Abe T (1994) Human basilar and middle cerebral arteries exhibit endothelium-dependent responses to peptides. *Am J Physiol* 267: H880-H886.
- Orawski AT, Simmons WH (1989) Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides* 10: 1063-1073.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.

Pan W, Kastin AJ, Gera L, Stewart JM (2001) Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. *Neurosci Lett* 307: 25-28.

Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, Browning DD, Ye RD (1996) Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 98: 2042-2049.

Parfenova H, Massie V, Leffler CW (2000) Developmental changes in endothelium-derived vasorelaxant factors in cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H780-H788.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747.

Parpura V, Liu F, Jęftinija KV, Haydon PG, Jęftinija SD (1995) Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. *J Neurosci* 15: 5831-5839.

Pellacani A, Brunner HR, Nussberger J (1994) Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects. *Clin Sci (Lond)* 87: 567-574.

Perry DC, Snyder SH (1984) Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* 43: 1072-1080.

Pesquero JB, Lindsey CJ, Paiva AC, Ganten D, Bader M (1996a) Transcriptional regulatory elements in the rat bradykinin B2 receptor gene. *Immunopharmacology* 33: 36-41.

Pesquero JB, Pesquero JL, Oliveira SM, Roscher AA, Metzger R, Ganten D, Bader M (1996b) Molecular cloning & functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 281.

Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* 56: 325-333.



- Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Belardetti F (1987) Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of *Aplysia* sensory cells. *Nature* 328: 38-43.
- Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, Eriskat J, Pruneau D, Baethmann A (2001a) Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 18: 1049-1058.
- Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Groger M, Moskowitz MA, Blomgren K (2004) Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 458-466.
- Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA (2001b) BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15318-15323.
- Praddaude F, Tack I, Emond C, Bascands JL, Girolami JP, Tran-Van T, Regoli D, Ader JL (1995) In vivo and in vitro homologous desensitization of rat glomerular bradykinin B2 receptors. *Eur J Pharmacol* 294: 173-182.
- Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 896-906.
- Privitera PJ, Beckstead RM, Yates P, Walgren R (2003) Autoradiographic localization of [125I-Tyr<sup>0</sup>]bradykinin binding sites in brains of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 23: 805-815.
- Privitera PJ, Daum PR, Hill DR, Hiley CR (1992) Autoradiographic visualization and characteristics of [125I]bradykinin binding sites in guinea pig brain. *Brain Res* 577: 73-79.
- Privitera PJ, Yates P (1995) Hypertensive effect of tissue kallikrein in rostral ventrolateral medulla is mediated by brain kinins. *Brain Res* 704: 103-106.
- Pruneau D, Belichard P (1993) Induction of bradykinin B1 receptor-mediated relaxation in the isolated rabbit carotid artery. *Eur J Pharmacol* 239: 63-67.

- Pruneau D, Chorny I, Benkovitz V, Artru A, Roitblat L, Shapira Y (1999) Effect of LF 16-0687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma. *J Neurotrauma* 16: 1057-1065.
- Pulsinelli WA, Brierley JB (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272.
- Qadri F, Baurle L, Hauser W, Rascher W, Dominiak P (1999) Centrally bradykinin B2-receptor-induced hypertensive and positive chronotropic effects are mediated via activation of the sympathetic nervous system. *J Hypertens* 17: 1265-1271.
- Qadri F, Hauser W, Johren O, Dominiak P (2002) Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 258-263.
- Raichle ME (1983) The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol* 13: 2-10.
- Raidoo DM, Bhoola KD (1997) Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol* 77: 39-44.
- Raidoo DM, Bhoola KD (1998) Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 79: 105-127.
- Raidoo DM, Ramchurren N, Naidoo Y, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD (1996a) Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology* 33: 104-107.
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD (1996b) Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 32: 39-47.
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD (1997) Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* 36: 153-160.
- Raymond JJ, Robertson DM, Dinsdale HB (1986) Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier. *Can J Neurol Sci* 13: 214-220.
- Regoli D, Barabe J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1-46.

- Regoli D, Pheng LH, Allogho SN, Nguyen L, Gobeil F (1996) Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology* 33: 24-31.
- Reiser G, Hamprecht B (1985) Bradykinin causes a transient rise of intracellular  $Ca^{2+}$ -activity in cultured neural cells. *Pflugers Arch* 405: 260-264.
- Reiser G, Walter U, Hamprecht B (1984) Bradykinin regulates the level of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) in neural cell lines. *Brain Res* 290: 367-371.
- Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET (1997) CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 28: 1430-1436.
- Ribeiro SA, Corrado AP, Graeff FG (1971) Antinociceptive action of intraventricular bradykinin. *Neuropharmacology* 10: 725-731.
- Roscher AA, Klier C, Dengler R, Faussner A, Muller-Esterl W (1990) Regulation of bradykinin action at the receptor level. *J Cardiovasc Pharmacol* 15 Suppl 6: S39-S43.
- Rosenblum WI (1983) Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: probable role of hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245: H139-H142.
- Rupniak NM, Boyce S, Webb JK, Williams AR, Carlson EJ, Hill RG, Borkowski JA, Hess JF (1997) Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. *Pain* 71: 89-97.
- Ryan JW, Roblero J, Stewart JM (1968) Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation. *Biochem J* 110: 795-797.
- Rydh-Rinder M, Kerekes N, Svensson M, Hokfelt T (2001) Glutamate release from adult primary sensory neurons in culture is modulated by growth factors. *Regul Pept* 102: 69-79.
- Saed GM, Carretero OA, MacDonald RJ, Scicli AG (1990) Kallikrein messenger RNA in rat arteries and veins. *Circ Res* 67: 510-516.
- Saito R, Graf R, Hubel K, Fujita T, Rosner G, Heiss WD (1997) Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 857-864.

- Salzman SK, Lee WA, Sabato S, Mendez AA, Agresta CA, Kelly G (1993) Halothane anesthesia is neuroprotective in experimental spinal cord injury: early hemodynamic mechanisms of action. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 80: 59-81.
- Sarker MH, Hu DE, Fraser PA (2000) Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J Physiol* 528 Pt 1: 177-187.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL (1998) 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* 101: 2080-2091.
- Schilling L, Wahl M (1999) Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol* 474: 123-141.
- Schilling WP, Rajan L, Strobl-Jager E (1989) Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. *J Biol Chem* 264: 12838-12848.
- Schini VB, Boulanger C, Regoli D, Vanhoutte PM (1990) Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 581-585.
- Schulz J, Plesnila N, Eriskat J, Stoffel M, Pruneau D, Baethmann A (2000) LF16-0687 a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist reduces vasogenic brain edema from a focal lesion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 76: 137-139.
- Schurer L, Temesvari P, Wahl M, Unterberg A, Baethmann A (1989) Blood-brain barrier permeability and vascular reactivity to bradykinin after pretreatment with dexamethasone. *Acta Neuropathol (Berl)* 77: 576-581.
- Schwaninger M, Sallmann S, Petersen N, Schneider A, Prinz S, Libermann TA, Spranger M (1999) Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 73: 1461-1466.
- Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA (1984) Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A* 6: 1731-1738.
- Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghi DJ, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG (1997) Expression of B1 and B2 bradykinin receptor mRNA

and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurones from wild-type and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 36: 1009-1017.

Shastri BS (1995) Genetic knockouts in mice: an update. *Experientia* 51: 1028-1039.

Shi B, Bhat G, Mahesh VB, Brotto M, Nosek TM, Brann DW (1999) Bradykinin receptor localization and cell signaling pathways used by bradykinin in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 140: 4669-4676.

Shi B, Mahesh VB, Bhat GK, Ping L, Brann DW (1998) Evidence for a role of bradykinin neurons in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 67: 209-218.

Shughrue PJ, Ky B, Austin CP (2003) Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 465: 372-384.

Siemkowicz E, Hansen AJ (1978) Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand* 58: 1-8.

Siesjo BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjo P, Smith ML (1995) Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 12: 943-956.

Siesjo BK, Siesjo P (1996) Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 13: 247-268.

Slivka A, Murphy E, Horrocks L (1995) Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 26: 1061-1065.

Smith AL, Larson CP, Jr., Hoff JT (1973) Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology* 39: 377-381.

Sobey CG (2003) Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *Br J Pharmacol* 139: 1369-1371.

Stephens GJ, Marriott DR, Djamgoz MB, Wilkin GP (1993) Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 153: 223-226.

Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH (1988) Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3245-3249.

Stieg PE, Sathi S, Warach S, Le DA, Lipton SA (1999) Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur J Pharmacol* 375: 115-120.

Stover JF, Dohse NK, Unterberg AW (2000) 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* 92: 853-859.

Sugita M, Hunt GE, Liu Y, Black KL (1998) Nitric oxide and cyclic GMP attenuate sensitivity of the blood-tumor barrier permeability to bradykinin. *Neurol Res* 20: 559-563.

Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990) A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 290-293.

Symon L, Branston NM, Strong AJ, Hope TD (1977) The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 11: 149-154.

Takano M, Sakanaka F, Yayama K, Okamoto H (2000) Tissue-Specific expression of rat kininogen mRNAs. *Biol Pharm Bull* 23: 1239-1242.

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981a) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60.

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981b) Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [<sup>14</sup>C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 61-69.

Theilen H, Schrock H, Kuschinsky W (1993) Capillary perfusion during incomplete forebrain ischemia and reperfusion in rat brain. *Am J Physiol* 265: H642-H648.

- Theilen H, Schrock H, Kuschinsky W (1994) Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 1055-1061.
- Thomas GR, Thibodeaux H, Margolius HS, Privitera PJ (1984) Cerebrospinal fluid kinins and cardiovascular function. Effects of cerebroventricular melittin. *Hypertension* 6: I46-I50.
- Thomassen L, Brainin M, Demarin V, Grond M, Toni D, Venables GS (2003) Acute stroke treatment in Europe: a questionnaire-based survey on behalf of the EFNS Task Force on acute neurological stroke care. *Eur J Neurol* 10: 199-204.
- Trabold F, Pons S, Hagege AA, Bloch-Faure M, Alhenc-Gelas F, Giudicelli JF, Richer-Giudicelli C, Meneton P (2002) Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein- deficient mice. *Hypertension* 40: 90-95.
- Unterberg A, Baethmann AJ (1984) The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J Neurosurg* 61: 87-96.
- Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Muller-Esterl W (1986) The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J Neurosurg* 64: 269-276.
- Unterberg A, Wahl M, Baethmann A (1984) Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 4: 574-585.
- Unterberg A, Wahl M, Hammersen F, Baethmann A (1987) Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol (Berl)* 73: 209-219.
- Van Aken J (1976) Influence of anesthesia on autoregulation of the cerebral blood flow. *Acta Anaesthesiol Belg* 27: 11-19.
- Wagner S, Kalb P, Lukosava M, Hilgenfeldt U, Schwaninger M (2002) Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke. *J Neurol Sci* 202: 75-76.
- Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A (1993) Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 57: 64-72.

- Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young AR (1996) Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 33: 257-263.
- Wahl M, Young AR, Edvinsson L, Wagner F (1983) Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in situ. *J Cereb Blood Flow Metab* 3: 231-237.
- Wang C, Chao C, Madeddu P, Chao L, Chao J (1998) Central delivery of human tissue kallikrein gene reduces blood pressure in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 449-454.
- Warner DS, McFarlane C, Todd MM, Ludwig P, McAllister AM (1993) Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation. *Anesthesiology* 79: 985-992.
- Warner DS, Zhou JG, Ramani R, Todd MM (1991) Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, and methohexital anesthesia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 794-802.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17: 497-504.
- Wei EP, Christman CW, Kontos HA, Povlishock JT (1985) Effects of oxygen radicals on cerebral arterioles. *Am J Physiol* 248: H157-H162.
- Wei EP, Ellison MD, Kontos HA, Povlishock JT (1986) O<sub>2</sub> radicals in arachidonate-induced increased blood-brain barrier permeability to proteins. *Am J Physiol* 251: H693-H699.
- Whalley ET, Amure YO, Lye RH (1987) Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar artery in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335: 433-437.
- Whalley ET, Fritz H, Geiger R (1983) Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 324: 296-301.
- Whalley ET, Wahl M (1983) Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 323: 66-71.



- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179: 1-33.
- Whittle IR, Piper IR, Miller JD (1992) The role of bradykinin in the etiology of vasogenic brain edema and perilesional brain dysfunction. *Acta Neurochir (Wien)* 115: 53-59.
- Williams RS, Wagner PD (2000) Transgenic animals in integrative biology: approaches and interpretations of outcome. *J Appl Physiol* 88: 1119-1126.
- Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao L, Chao J (2004) Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension* 43: 452-459.
- Xu J, Hsu CY, Junker H, Chao S, Hogan EL, Chao J (1991) Kininogen and kinin in experimental spinal cord injury. *J Neurochem* 57: 975-980.
- Yamauchi A, Nakayama A, Kariya K (1985) Determination of kinin in the rat brain by a sensitive radioimmunoassay. *J Pharmacobiodyn* 8: 607-613.
- Yong T, Linthicum DS (1996) Microvascular leakage in mouse pial venules induced by bradykinin. *Brain Inj* 10: 385-393.
- Zarow GJ, Karibe H, States BA, Graham SH, Weinstein PR (1997) Endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in rats: effect of suture insertion distance on cerebral blood flow, infarct distribution and infarct volume. *Neurol Res* 19: 409-416.
- Zausinger S (2003) Bradykinin receptor antagonists in cerebral ischemia and trauma. *IDrugs* 6: 970-975.
- Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A (2002) 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* 950: 268-278.
- Zhang ZG, Chopp M, Chen H (1993) Duration dependent post-ischemic hypothermia alleviates cortical damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 117: 240-244.

Zweckberger K, Stoffel M, Baethmann A, Plesnila N (2003) Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma* 20: 1307-1314.

# 7 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

## Originalarbeiten

**Gröger, Lebesgue, Pruneau, Relton, Kim, Nussberger, Plesnila**

Release of Bradykinin and Expression of Kinin B<sub>2</sub> Receptors in the Brain – Role for Cell Death and Brain Edema Formation after Focal Cerebral Ischemia in Mice

*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2005; 25(8):978-989*

## Poster

**Gröger, Back, Baethmann, Plesnila**

Role of Bradykinin B<sub>2</sub> receptors in focal cerebral ischemia

*32<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Society for Neuroscience; Orlando, USA; 02. – 07.11.2002*

**Gröger, Lebesgue, Pruneau, Baethmann, Plesnila**

Expression and role of bradykinin receptors in focal ischemia in mice

*XXIst International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function; Calgary, Canada; 29.06. – 03.07.2003*

## Vorträge

Rolle des Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptors bei fokaler zerebraler Ischämie

*28. Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirnödem und Hirndurchblutung“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie; Universität Bonn; 18. – 19.10.2002*

Rolle von Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptoren für den postischämischen Hirnschaden bei der Maus  
*Kolloquium über wissenschaftliche Arbeiten in der Chirurgischen Forschung; Universität München; 24.04.2003*

Expression and role of bradykinin receptors in focal ischemia in mice  
*XXIst International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function; Calgary, Canada; 29.06. – 03.07.2003*

Expression und Rolle von Bradykinin-Rezeptoren bei der fokalen zerebralen Ischämie der Maus  
*29. Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirnödem und Hirndurchblutung“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie; Unfallkrankenhaus Berlin; 10. – 11.10.2003*

## 8 Danksagung

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung, Kommissarischer Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl, in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie von Prof. Dr. med. A. Baethmann durchgeführt. Das Projekt wurde von Herrn Prof. Dr. med. N. Plesnila betreut und durch das Graduiertenkolleg 688 „Neurotraumatologie und Neuropsychologische Rehabilitation“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer danken, der bis 2003 das Institut für Chirurgische Forschung leitete. Durch die freundliche Aufnahme in das Institut ermöglichte er mir die Durchführung der Experimente in der kooperativen, motivierenden und professionellen Atmosphäre, die diese Einrichtung auszeichnet. Der wissenschaftliche Anspruch, das enorme Wissen und die Exaktheit des Direktors waren mir stets Vorbild und Ansporn. Die wissenschaftliche Ausbildung und Betreuung der Doktoranden im Institut für Chirurgische Forschung sind vorbildlich.

Herrn Prof. Baethmann gilt mein ganz herzlicher Dank für die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe sowie für die geduldige, unermüdliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, Denken und Schreiben. Sein Einsatz für die Ausbildung seiner Assistenten und Doktoranden nicht nur in Wissenschaft und Klinik sondern auch in gesellschaftlichen Werten wurde für mich Sinnbild akademischen Denkens und Handelns.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Plesnila für die Überlassung des interessanten Themas und die sorgfältige, gründliche Einarbeitung in die experimentellen Techniken danken. Mit seiner fachlichen Kompetenz und Erfahrung stand mir ein Partner zur Seite, mit dem jedes Problem gelöst werden konnte. Die anregenden und kritischen fachlichen Diskussionen haben mein wissenschaftliches Denken maßgeblich bestimmt.

Frau Dr. Lebesgue und Herrn Dr. Pruneau sei herzlich für die mRNA Quantifizierung, Herrn Dr. Nussberger für die Bradykinin Messung und Frau Dr. Relton für den B<sub>1</sub> Rezeptor Antikörper gedankt. Ein ganz herzlicher Dank gilt auch unseren medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Bischoff, Frau Mamrak, Frau Wu und Frau Kölbel für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Der Kollegialität, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft jedes einzelnen Mitarbeiters des Instituts und ganz besonders meines Mitdoktoranden und Mitkollegiaten Maximilian Waldner war die hervorragende und produktive Arbeitsatmosphäre zu verdanken.

Und zuletzt sei nach ganz herzlich der Germanistin Tina Eichmüller gedankt, die ihr Grauen vor Tierexperimenten überwand und sich aus den Höhen der deutschen Literatur herabließ um meine Dissertation Korrektur zu lesen. Ich hoffe, die Details über tierexperimentelles Arbeiten, die sie erfahren hat ohne sie eigentlich wissen zu wollen, haben ihre schöngeistige Seele und ihr Weltbild nicht nachhaltig erschüttert.

# 9 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Moritz Friedrich Gröger

Geburtsdatum: 8. April 1977

Geburtsort: München

Nationalität: deutsch

Eltern: Manfred Gröger (Diplomingenieur für Bauwesen)  
Trude Gröger (Gymnasiallehrerin)

Geschwister: Toni Gröger (Diplomingenieur für Architektur)

## Schul- und Ausbildung

09.1987 – 07.1996 Wittelsbacher-Gymnasium, München (Sprecher in KS12/13)

08.1999 – 01.2000 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund in München und Lauf a.d. Pegnitz

05.1998 – 04.2005 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München

seit 10.2000 Promotionsarbeit bei Prof. Plesnila/Prof. Baethmann, Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie, Institut für Chirurgische Forschung, Ludwig-Maximilians-Universität, München

### Famulaturen:

02.2001 Neurochirurgische Klinik, Prof. Tonn, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München

03.2002 Gynäkologische Praxis, Dr. Bermüller, Altötting

08.2002 Abteilung für Neuroradiologie, Prof. Lehmann, Radiologische Klinik, Charité, Humboldt Universität Berlin

09.2002 Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Prof. Weidauer, Universität Heidelberg

## **Praktisches Jahr:**

04. – 07.2004 Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Prof. Berghaus, Ludwig-Maximilians-Universität, München
08. – 09.2004 Neurochirurgische Klinik, Prof. Yonekawa, Universitätsspital Zürich, Schweiz
10. – 11.2004 Klinik für Wiederherstellungschirurgie, Prof. Meyer, Universitätsspital Zürich, Schweiz
- 12.2004 – 03.2005 Department of Internal Medicine, Victoria Hospital, University of Cape Town, Südafrika

## **Sonstige Tätigkeiten**

- 08.1996 – 08.1997 Zivildienst beim Mobilen Sozialen Hilfsdienst des Arbeiter-Samariter-Bundes, München
- 09.1997 – 03.1998 Krankenpflegehelfer im Rotkreuz-Krankenhaus, München
- 09.1997 – 10.2001 Ehrenamtlicher Mitarbeiter im Sanitätsdienst des Arbeiter-Samariter-Bundes, München
- 03.1999 – 04.1999 Hospitation im St. Anthony's Hospital, London, England
- 10.2000 – 12.2001 Nebenamtlicher Mitarbeiter in Rettungsdienst, Intensiv- und Krankentransport der Aicher Ambulanz Union, München
- 10.2002 – 02.2003 Co-Assistent im Kursus der Makroskopischen Anatomie bei Prof. Putz, Anatomische Anstalt, Ludwig-Maximilians-Universität, München

## **Beruf**

- 10.2005 – 12.2005 Junior Projekt Manager in der Forschungsgruppe Medizinische Ökonomie – MERG
- seit 01.2006 Wissenschaftlicher Assistent von Prof. Berghaus, Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Ludwig-Maximilians-Universität, München



## Stipendien

Doktorandenstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs 688 „Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation“

Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes für den Aufenthalt am Victoria Hospital, Kapstadt Südafrika, im Rahmen des Praktischen Jahres

## Sonstiges

### Fremdsprachen:

Latein: Latinum

Englisch: A-Level

Französisch: Grundkenntnisse

### EDV:

gute Kenntnisse der gängigen Textverarbeitungs-, Statistik-, Graphik- und Präsentationsprogramme für Personal Computer

### Fortbildungen:

DFG-Graduiertenkolleg: *Kolloquien, Kollegiatenreferate, Laborbesuche, Methodenseminare zu z.B. Statistik, Präsentation, Moderation, Postergestaltung*

Onkologisches Seminar: *Prof. Schmid, Schlossbergklinik Oberstaufen*

Molekularbiologischer Kurs: *Prof. Jauch, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München*

Mikrovaskulärer Kurs: *Prof. Yonekawa, Universitätsspital Zürich, Schweiz*

Neurobiological Practical Course: *Prof. Gummer, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen*