

Stefan Klaus Kreutzer  
Dr. med.

## **Der Einfluss von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Modulatoren auf die zerebrale ischämische Prækonditionierung**

Geboren am 20.02.1977 in Ottweiler, Saar  
Reifeprüfung am 13.06.1996 in St. Wendel, Saar  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/97 bis WS 2003/04  
Physikum am 13.09.1999 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Winterthur, Schweiz und in Heidelberg  
Staatsexamen am 27.10.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anaesthesiologie  
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. sc. hum. Konstanze Plaschke

Einleitung: Eine gewisse Toleranz neuronaler Zellen gegenüber Sauerstoffmangelversorgung kann am Versuchstier dadurch induziert werden, dass das Tier einer oder repetitiven kurzen Ischämien im Sinne einer Konditionierung unterworfen wird. Die Ischämiephasen führen in der neuronalen Zelle zur Aktivierung verschiedener protektiver Mechanismen, die sie resistenter gegenüber nachfolgenden, längerfristigen fokalen oder globalen Ischämien werden lässt. Diese Toleranzinduktion, welche an verschiedensten Organsystemen beschrieben werden konnte, wird auch als ischämische Prækonditionierung bezeichnet. Bezüglich des zugrunde liegenden Pathomechanismus dieser ischämischen Toleranzinduktion werden verschiedene Theorien diskutiert, wobei insbesondere endogenem, während Ischämie freigesetzten Adenosin eine herausragende Bedeutung beigemessen wird. Das Nukleosid Adenosin vermittelt seine Wirkung über Bindung an verschiedene Adenosin-Rezeptoren (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>), wovon in erster Linie Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung einer ischämischen Toleranzinduktion übernehmen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es gewesen, durch kontinuierliche Applikation von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Modulatoren zu überprüfen, ob der potenzielle Zusammenhang zwischen endogenem, bei Minderdurchblutung vermehrt freigesetztem Adenosin und dessen neuroprotektiven Effekt auf den zerebralen Energiestoffwechsel bestätigt werden kann. Im Sinne einer pharmakologisch induzierten zerebralen Prækonditionierung wird untersucht, inwieweit eine Verbesserung der ischämischen Resistenz neuronaler Zellen durch Applikation des spezifischen Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten 2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin (CCPA) erreicht werden kann. Im Gegensatz dazu könnte durch die Applikation des spezifischen Adenosin-A<sub>1</sub>-Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthin (CPT), eine Verminderung oder Blockierung dieses prækonditionierenden Effektes im Gehirn demonstriert werden.

Material und Methoden: Zum Nachweis dieser potenziellen Wirkung der beiden Adenosin-A<sub>1</sub>-Modulatoren wurde ein etabliertes Tiermodell an männlichen Wistar-Ratten verwendet. Differenziert wurden 1. akute experimentelle Ischämiebedingungen (60 min bilaterale Karotidenokklusion plus systemische Hypotension) und 2. subchronische Oligämiebedingungen (2-wöchige permanente bilaterale Karotisligatur mit anschließender 30-minütiger systemischer Hypotension). Gleichzeitig erhielten die akuten Ischämietiere eine intraperitoneale 60-minütige Perfusion mit 0,1 mg/kg KG CCPA (0,3 µM), CPT (0,4 µM) bzw. Lösungsmittel als Placebo. Tieren unter subchronischen Oligämiebedingungen wurde

eine intraperitoneale Pumpe zur kontinuierlichen Applikation der genannten Modulatoren über die Dauer von 14 Tagen in analoger Konzentration implantiert. Die physiologischen Vitalparameter wurden dokumentiert und die Veränderungen im Energiemetabolismus des parietotemporalen Kortex sowohl nach akuter Ischämie und subchronischer Oligämie als auch unter dem Einfluss einer akuten bzw. subchronischen Applikation von CCPA und CPT anhand der Analyse des zerebralen Energiemetabolismus (ATP, PCr, ADP, AMP, Adenosin) mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) registriert.

Darüber hinaus wurde durch immunhistochemische Analyse und Westernblot-Technik ein möglicher pathogenetischer Zusammenhang zwischen einer potenziellen Änderung der Expressionsdichte von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren und einer durch Adenosin vermittelten ischämischen Präkonditionierung unter CCPA/CPT-Einfluss untersucht.

Ergebnisse: Nach *akuter* zerebraler Ischämie konnte gegenüber Scheinoperation eine signifikante Reduktion (ca. -90%) der Konzentration energiereicher Phosphate ATP und PCr gemessen werden. Diese ging einher mit einem signifikanten Konzentrationsanstieg von Adenosin (4,6-fach). Nach *subchronischer* 14-tägiger Oligämie kam es zu einer partiellen Restitution im kortikalen Energiestoffwechsel. Jedoch blieben die Konzentrationen der Energiemetabolite signifikant verändert gegenüber scheinoperierten Tieren. Der präkonditionierende Effekt eines permanenten 2-Gefäßverschlusses gegenüber einer zeitlich versetzten zusätzlichen Hypotension konnte insbesondere für ATP nachgewiesen werden.

Nach akuter Applikation von CCPA kam es zu einem, mit der Perfusionsdauer zunehmendem, signifikanten Blutdruckabfall (-66%). Dieser ging einher mit einer signifikanten Konzentrationsabnahme der energiereichen Phosphatverbindungen (ATP -63%, PCr -69%, AMP -45%). Die subchronische Applikation von CCPA bewirkte im Vergleich zur akuten Infusion einen, wenn auch nur teilweise signifikanten Anstieg der energiereichen Phosphate während Oligämie (ADP +40%, AMP +100%) und Schein-OP (ATP +83%, ADP +78%, AMP +140%). Damit ist ein signifikanter Konzentrationsabfall von Adenosin unter Oligämie (-48%) verbunden. CPT führte unter akuten Bedingungen zu keiner Veränderung der zellulären Energiemetabolite. Eine subchronische CPT-Applikation verbesserte den Energiestatus im Kortex dagegen signifikant während Oligämie (ADP +60%, AMP +175%) und nach Schein-OP (ATP +115%, ADP +47%).

Die Analyse der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen unter dem Einfluss der beiden spezifischen Modulatoren CCPA oder CPT.

Diskussion: Der nach *akuter* Ischämie nachgewiesene signifikante Adenosinanstieg verdeutlicht die Rolle dieses Nukleosids als sensitiver Ischämieparameter. Während *subchronischer* Oligämie kommt es im Vergleich zur Akutsituation zu einer partiellen Restitution im kortikalen Energiemetabolismus; mögliche Kompensationsmechanismen werden dabei diskutiert.

Der präkonditionierende Effekt einer permanenten bilateralen 14-tägigen Karotidenokklusion gegenüber einer zusätzlichen systemischen Hypotension konnte insbesondere anhand einer unbeeinträchtigten ATP-Konzentration demonstriert werden. Das bedeutet, dass ein vorheriger permanenter 2-Gefäßverschluss im Vergleich zu nicht-präkonditionierenden Versuchsbedingungen entweder den Abbau der energiereichen Phosphate verhindert oder deren Rephosphorylierung über den salvage pathway initiiert. Jedoch tritt dieser präkonditionierende Effekt in der vorliegenden Arbeit nach 30-minütiger Hypotensionsphase im Vergleich zu Voruntersuchungen mit 15-minütiger Ischämie weniger deutlich auf.

Für die signifikante Reduktion der Konzentration an energiereichen Phosphatverbindungen nach akuter CCPA-Applikation kann in erster Linie der deutliche Blutdruckabfall verantwortlich gemacht werden. Eine subchronische Modulation des zerebralen Adenosin-A<sub>1</sub>-

Rezeptors mit CCPA und CPT bewirkte eine eher unspezifische Konzentrationssteigerung an Energiemetaboliten im Vergleich zu Placeboratten. Die beiden funktionellen Gegenspieler CCPA und CPT zeigten folglich kein durchgehend agonistisch-antagonistisches Verhalten im vorliegenden Studiendesign. Ein zusätzlicher neuroprotektiver Effekt im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung, wie für CCPA gefordert, konnte nicht bestätigt werden. Auch konnten unter CPT-Einfluss keine hemmenden Effekte auf die Toleranzentwicklung zerebralen Gewebes bei Ischämie gezeigt werden. Die Ergebnisse im Energiemetabolismus konnten durch die Resultate der immunhistochemischen Analyse sowie des Westernblots gestützt werden, bei denen keine signifikante Änderung in der Expression von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren nachgewiesen wurde. Offensichtlich besteht demnach kein pathogenetischer Zusammenhang zwischen einer durch Adenosin vermittelten ischämischen Präkonditionierung und der Veränderung der Expression von zerebralen Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren.

So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass Adenosin in diesem Tiermodell seine postulierte Funktion als Induktor einer ischämischen Präkonditionierung zumindest nicht ausschließlich über spezifische Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt. Die Wirkung der beiden applizierten Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Modulatoren ist möglicherweise komplexer als angenommen. Weiterführende Studien könnten sich mit einer genaueren Differenzierung der Bedeutung anderer Adenosin-Rezeptor-Subtypen befassen. Auch potenzielle Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Rezeptorklassen könnten eine Rolle spielen. Für einen späteren therapeutischen Einsatz von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Modulatoren sind sicherlich weiterreichende Untersuchungen nötig. Unabdingbare Voraussetzung für eine abgestimmte Behandlung wird es sein, eine exakte Differenzierung von kurz- oder längerfristiger Applikationsdauer zu gewährleisten und darüber hinaus die Unterscheidung der spezifischen Wirkung von Agonisten und Antagonisten bzw. Kombinationspräparaten zu untersuchen.