

Aus dem Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitäts Professor Dr. med. Karsten Schrör

**Untersuchung der direkten vasoaktiven
Wirkung des Akute-Phase-Proteins
Fibrinogen
- eine experimentelle Studie -**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Tatjana Kirchhartz

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	25
1.1	Einleitung	25
1.2	Fibrinogen	30
1.3	Voruntersuchungen zum Fibrinogen	34
2	Fragestellung	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Untersuchungsobjekte	37
3.2	Gefäßpräparation	38
3.2.1	Arteria lingualis dextra	38
3.2.2	Arteria coronaria dextra	40
3.3	Transportlösung	42
3.4	Versuchsaufbau	42
3.4.1	Apparatur und Instrumente	42
3.4.2	Nährmedium im Organbad	44
3.5	Versuchsablauf	45
3.5.1	Kalibrierung	46
3.5.2	Einhängen	46
3.5.3	Äquilibrierung	46
3.5.4	Kontraktionstest	47
3.5.5	Endotheltest	47
3.5.6	Inkubationsversuche	48
3.5.7	Konzentrations-Wirkungs-Kurven	49
3.5.8	Kaliumchlorid	49
3.5.9	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	49
3.5.10	Phenylephrin	49
3.5.11	Acetylcholin	50
3.5.12	Bradykinin	50
3.5.13	Fibrinogen	50
3.5.14	Entfernung des Endothels	52
3.6	Fixierung	52
3.7	Histologie	53
3.8	Probenvorbereitung für die Vasodilator stimulierten Phosphoprotein-Western-Blots	55
3.9	Proteinbestimmung (Bio-Rad-Assay)	55

3.10	Vasodilator-stimulierte-Phosphoprotein-Western-Blots	56
3.11	Western-Blots zum Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren	60
4	Berechnung und Statistik	61
5	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	62
5.1	Funktionstests	62
5.1.1	Kaliumchlorid	62
5.1.2	Phenylephrin und Prostaglandin $F_{2\alpha}$	63
5.1.3	Acetylcholin und Substanz P	65
5.1.4	Bradykinin	68
5.1.5	Fibrinogen	69
5.2	Vasodilator stimulierte Phosphoprotein-Western-Blots	81
5.3	Histologische Bilder	84
5.4	Immunhistochemie	87
5.5	Integrinexpression	91
6	Diskussion	94
6.1	Generelle Charakterisierung	94
6.2	Histologische Bilder	95
6.3	Versuche mit Fibrinogen	95
6.3.1	Basaltonus	95
6.3.2	Überprüfung der Endothelabhängigkeit der direkten vasoaktiven Wirkung von Fibrinogen	96
6.3.3	Einfluss von ATP-abhängigen Kaliumkanälen auf die Fibrinogen vermittelte Vasodilation nach submaximaler Vorkontraktion mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$	99
6.4	Wechselwirkung von Fibrinogen und Bradykinin	101
6.5	Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein-Western-Blots	103
6.6	Immunhistochemie	104
6.7	Mechanismus der fibrinogenvermittelten Vasodilation und der Wechsel- wirkung mit Bradykinin	104
6.8	Beteiligung von Fibrinogen an der Entstehung des nicht allergischen An- gioödems	106
7	Zusammenfassung	108
8	Abstract	109
9	Anhang	111
9.1	Formeln	111
9.2	Publikationen & Kongressbeiträge	119

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung der Unterformen von Angioödemem	27
1.2	Manifestationsformen des Angioödems aus [93]	27
1.3	Erstmanifestation des Angioödems unter ACEH-Therapie (in Monaten) aus [9]	28
1.4	Fotos von Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem aus [9]	28
1.5	Plasma-Fibrinogen-Konzentration bei Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem (RAE) und bei Patienten mit Ödemen anderer Genese (IAE) modifiziert nach [9]	29
1.6	Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems aus [10]	29
1.7	Fibrinogen	32
1.8	Funktionen des Fibrinogens und seiner Spaltprodukte	33
3.1	Dargestellt ist die A. lingualis dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierung gibt die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an	38
3.2	Aufbau für die Kontrastmitteldarstellung der A. lingualis dextra	39
3.3	Kontrastmitteldarstellung der A. lingualis dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierung gibt die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an	39
3.4	Dargestellt ist die A. coronaria dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierungen geben die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an	41
3.5	Foto des verwendeten Organbades	43
3.6	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung des Gefäßtonus isolierter porviner Arterienringe, Aufhängung auf triangelförmige Haken	43
5.1	Einfluss steigender K^+ -Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Arterien vom Schwein. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen	63
5.2	Kontraktion durch Phenylephrin bei intaktem Endothel. Dargestellt sind die Mittelwerte der vaskulären Kraftentwicklung (\pm SEM), A. lingualis dextra	64
5.3	Kontraktion durch $PGF_{2\alpha}$ bei intaktem Endothel. Dargestellt sind die Mittelwerte der vaskulären Kraftentwicklung (\pm SEM), A. lingualis dextra und A. coronaria dextra	65

5.4	Endothelabhängige Relaxation in Zungenarterien mit intaktem Endothel. Die Relaxationen sind dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch Phenylephrin ausgelösten Vasotonus. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen	66
5.5	Ergebnisse der durchgeführten Endothelteste	67
5.6	Endothelabhängige Relaxation in Zungenarterien und Koronararterien mit intaktem Endothel. Die Relaxationen sind dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Vasotonus. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen	68
5.7	Wirkung von Sab simplex auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	69
5.8	Zugabe von Antifoam auf das vorkontrahierte Gefäß und anschließende Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Fibrinogen. Starke Schaumentwicklung, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	70
5.9	Zugabe von DMSO auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	70
5.10	Zugabe von Dimeticon und F68 auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	71
5.11	Wirkung von Fibrinogen auf den Basaltonus (\pm SEM), Lingual- und Koronararterien	72
5.12	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Zungen- und Koronararterien mit intaktem Endothel. Die Relaxation ist dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Vasotonus. Die Mittelwerte (\pm SEM) sind nach kumulativer Gabe von Fibrinogen für alle Konzentrationen dargestellt	72
5.13	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Zungenarterien mit intaktem Endothel, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	73
5.14	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Koronararterien mit intaktem Endothel, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung	73
5.15	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Koronararterien mit zerstörtem Endothel (\pm SEM), Kontrolle mit Endothel	74
5.16	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Zungenarterie mit zerstörtem Endothel (\pm SEM), Kontrolle mit Endothel	75
5.17	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit L-NAME (\pm SEM)	76
5.18	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit L-NAME (\pm SEM)	76
5.19	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Glibenclamid (\pm SEM)	77
5.20	Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porvine Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Glibenclamid (\pm SEM)	78

5.21	Wirkung von Bradykinin auf isolierte porcine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Fibrinogen (\pm SEM)	79
5.22	Wirkung von Bradykinin auf isolierte porcine Lingualarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Fibrinogen (\pm SEM)	79
5.23	Effekt von Moexipril auf die vasodilatatorische Wirkung von Bradykinin an isolierten porcinen Koronararterien mit intaktem Endothel (\pm SEM, ■ Vehikel, * Moexipril, $p < 0.0001$). Der Effekt von Moexipril ließ sich nach einer einstündigen Vorbehandlung mit Fibrinogen ($15\mu M$) ebenfalls noch nachweisen (□ Fibrinogen, ● Fibrinogen/Moexipril).	80
5.24	Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford	81
5.25	VASP-Westernblot nach einstündiger Vorinkubation mit/ohne Fibrinogen und anschließender Zugabe von Bradykinin. Die Markierungen zeigen die Ergebnisse der Proben 6 ⁻ (ohne Fibrinogen) und 6 ⁺ (mit Fibrinogen). Die Untersuchung erfolgte an isolierten porcinen Koronararterien	82
5.26	Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin-vermittelte Phosphorylierung von Ser239. Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein-Western-Blots nach Inkubation mit bzw. ohne Fibrinogen. Zur Kontrolle wurden VASP-Western-Blots zur Überprüfung der Phosphorylierung der Seite Ser157 durchgeführt	83
5.27	A. lingualis, 40 fache Vergrößerung	84
5.28	A. lingualis, 100 fache Vergrößerung	85
5.29	A. lingualis, 200 fache Vergrößerung	85
5.30	Seitenast der Koronararterie, 40 fache Vergrößerung	86
5.31	Seitenast der Koronararterie, 100 fache Vergrößerung	86
5.32	Seitenast der Koronararterie, 200 fache Vergrößerung	87
5.33	Mediadicke der isolierten Koronar- und Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit und ohne Fibrinogen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), One way ANOVA, $p < 0.01$	88
5.34	Immunhistochemische Aufnahme, Seitenast der A. coronaria dextra nach Inkubation mit Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]	89
5.35	Immunhistochemische Aufnahme, Seitenast der A. coronaria dextra nach Inkubation ohne Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]	89
5.36	Immunhistochemische Darstellung der A. lingualis dextra nach Inkubation mit Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]	90
5.37	Immunhistochemische Darstellung der A. lingualis dextra nach Inkubation ohne Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]	90
5.38	Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra und der A. coronaria dextra, Ergebnisse der Koronarien sind als 100% gesetzt, $p < 0.01$	91
5.39	Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra und der A. coronaria dextra bei mechanisch zerstörtem Endothel, Ergebnisse der Koronarien sind als 100% gesetzt, $p < 0.01$	92

5.40	Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra mit und ohne Endothel, n.s.	92
5.41	Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Seitenästen der A. coronaria dextra mit und ohne Endothel, n.s.	93
6.1	Vergleich der dilativen Eigenschaften von Fibrinogen bei einer mittleren physiologischen Konzentration von $8\mu M$ mit dem maximal untersuchten Effekt bei $15\mu M$. Der dilatative Effekt von $8\mu M$ Fibrinogen wurde als 100% gesetzt	97
6.2	Schematische Darstellung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen in vaskulärer glatter Muskulatur modifiziert nach [72]	101
6.3	Struktur von $\alpha_v\beta_3$ -RGD-Mn aus [118]	105
9.1	Strukturformel Angiotensin	111
9.2	Strukturformel Bradykinin	112
9.3	Strukturformel Diclofenac-Natrium	112
9.4	Strukturformel Essigsäure	112
9.5	Strukturformel Eosin	113
9.6	Strukturformel F68	113
9.7	Strukturformel Fibrinogen aus [90]	113
9.8	Strukturformel Formalin	114
9.9	Strukturformel Glibenclamid	114
9.10	Strukturformel Haemalaun	115
9.11	Strukturformel Haematein	116
9.12	Strukturformel Haematoxylin	116
9.13	Strukturformel Prostaglandin $F_{2\alpha}$	117
9.14	Strukturformel Pikrinsäure	117

Tabellenverzeichnis

1.1	Faktoren, die die Plasmakonzentration von Fibrinogen beeinflussen. Übersetzt aus [80]	33
3.1	Zusammensetzung des verwendeten Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffers	42
3.2	Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers (KHP)	44
3.3	Zusammensetzung der Stammlösungen	45
3.4	Zusammensetzung der Formalinlösung nach Lilie (4% FA)	54
3.5	Zusammensetzung Meyers Haematoxylin	54
3.6	Durchführung der Haemalaun-Eosin-Färbung	55
3.7	Proteaseinhibitormix von Sigma	56
3.8	Zusammensetzung Bradford-Reagenz	56
3.9	Trenngel	57
3.10	Sammelgel	58
3.11	Trenngelpuffer (vierfach), 500ml, pH 8,8	58
3.12	Sammelgelpuffer (zehnfach), 500ml, pH 6,8	58
3.13	Zusammensetzung des Lysis-Puffers	58
3.14	Zusammensetzung des TBST-Puffers, pH 7,6	59
3.15	Zusammensetzung des Tank-Puffers	59
3.16	Zusammensetzung des Western-Blot-Puffers, pH 8,5	59
3.17	Zusammensetzung des Trenngels (7,5%) für zwei Gele	60
3.18	Zusammensetzung des Sammelgels (4,5%)	60

Abkürzungsverzeichnis

<i>n</i>	Nano
μ	Micro
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläres Calcium
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AAE	Acquired Angioedema, erworbenes Angioödem
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACEH	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
ACh	Acetylcholin
ANOVA	Analysis Of Variance
Aqua dest.	Aqua destillata
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintri-phosphat
AÖ	Angioödem
BSA	Bovines-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C1-INH	C1-Inhibitor
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
DGPT	Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSA	Digitale Subtraktions Angiographie
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor, endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor
EDRF	Endothelium Dependent Relaxing Factor, endothelabhängiger relaxierender Faktor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
g	Gramm
GTP	Guanosintri-phosphat
gtt	Guttae, Tropfen
h	Stunde

HAE	Hereditäres Angioödem
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSVEC	Human Saphenous Vein Endothelial Cells, Endothelzellen aus humaner Vena saphena
IAE	Idiopathic Angioedema, idiopathisches Angioödem
ICAM	Inter Cellular Adhesion Molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO_3	Kaliumhydrogencarbonat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter
L-NAME	N_ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
M	Molar
m	Milli
M.	Musculus
MG	Molekulargewicht
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minute
Mm.	Musculi
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumbicarbonat
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffoxid
NPH	Northwick Park Heart
PAE	Pseudoallergic Angioedema, pseudoallergisches Angioödem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phenylephrin
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Cellular Protein Kinase C, zelluläre Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAE	Renin-Angiotensin-Aldosterone-System Blocker Induced Angioedema, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System Blocker induziertes Angioödem
RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz, Arginin-Glycin-Asparaginsäure
s	Sekunde

Ser239	Serin239
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20, Tris-gepufferte, salzige Tween 20
TREND-Studie .	Trial on Reversing Endothelial Dysfunction
V.	Vena
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein
VOCs	Voltage-Operated Ca ²⁺ Channels, spannungsabhängige Calciumkanäle
Vv.	Venae

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Georg Kojda und Herrn Doktor med. Murat Bas für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Laborräume und Arbeitsmittel, die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit, ihren Rat sowie ihre Unterstützung in wissenschaftlichen und sonstigen Belangen ebenso wie für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Herrn Privat Dozent Dr. med. Martin Wagenmann danke ich für die Übernahme des Ko-referats.

Cornelia Tüllmann danke ich für Hilfe, Freundschaft und eine Menge Spaß, vor allem, wenn während einer Nachtschicht im Labor der Strom ausfiel, und ein 18 Stunden Tag ohne Ergebnis blieb.

Andrea Marzoll danke ich für ihre Unterstützung bei den Fixierungen und der Anfertigung der histologischen Gefäßquerschnitte.

Stephanie Kumpf danke ich für ihre Hilfe bei den Western-Blots.

Dem Fachbereich Histologie des Anatomischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule Hannover und ganz besonders Herrn Professor Dr. rer. nat. Wilfried Meyer danke ich für die immunhistologische Aufarbeitung der Gefäßproben und die Erstellung der Fotos.

Der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und insbesondere Herrn Ing. grad. Jürgen Springer danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei Problemen im Laboralltag.

Dem Schlachthof Viersen und der Firma Kemink am Schlachthof Duisburg-Meiderich danke ich für die Überlassung der Schweineherzen und Zungen.

Georg Himmrich und dem „Rosa Nilpferd“ danke ich für viel Geduld und gute Nerven bei meinen ersten Versuchen mit \LaTeX . Vielen Dank für die Hilfe während der kleinen und großen computerbedingten Krisen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg sowie während des Studiums.

Ich danke darüber hinaus allen noch nicht erwähnten, derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes für Pharmakologie und klinische Pharmakologie für kollegiale Hilfsbereitschaft sowie eine hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ich versichere hiermit, dass die vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den

Bezug der Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Chemikalien	Hersteller
Accupaque™ 300	Amersham Buchler GmbH & Co KG
Acetylcholin pro analysis	Sigma
Advanced Blocking Agent	Amersham
Antifoam A Concentrate	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serra
Bradykinin pro analysis	Alexis Biochemicals
Comassie Brilliant Blue G	Sigma
D ⁺ Glucose Monohydrat	Merck
Diclofenac pro analysis	Sigma
Dimethicon 100 Silikonöl Typ 100	Caesar & Loretz GmbH
DMSO	Sigma
Ethanol	Merck
F68 (Poloxamer 188), F87, F108 (Poloxamer 338), F127 (Poloxamer 407)	Fluka
Fibrinogen from bovine plasma	Fluka
Hepes sodium salt ultra grade	Calbiochem
KCl, KHCO ₃ , KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄ *7H ₂ O, NaHCO ₃	Merck
Moexipril HCL	SIFA limited
Monoclonal Antibody to VASP (Phosphorylated)(pSer239) (16C2)	Alexis Biochemicals
Monoclonal Anti Fibrinogen Antibody	Sigma
NaCl	Roth
N _ω -Nitro-L-Arginin-methylester (L-NAME) pro analysis	Sigma
PGF _{2α} Minoprost® F _{2α} Ampullen	Pharmacia
Phenylephrin pro analysis	Sigma

Phosphorsäure	Merck
Polyclonal Antibody to VASP (Anti-Vasodilator Stimulated Phosphoprotein)	Alexis Biochemicals
Sab simplex 69, 19mg Dimethicon, 350-Siliciumdioxid 92, 5 : 7, 5 (Simethicon)	Parke-Davis GmbH
Substanz P pro analysis	Sigma
Tween™ 20 Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat	Sigma

Hersteller	Ort
Alexis Biochemicals	Grünberg
Amersham Buchler GmbH & CoKG	Braunschweig
Caesar & Loretz GmbH	Hilden
Calbiochem	Schwalbach
Fluka	Deisenhofen
Merck	Darmstadt
Park-Davis GmbH	Karlsruhe
Pharmacia	Karlsruhe
Roth	Karlsruhe
Schwarz Pharma	Monheim
Serra	Boehringer Ingelheim B.
SIFA limited	Liestal
Sigma	Deisenhofen

1 Einführung

1.1 Einleitung

Angioödeme wurden von Heinrich Irenäus Quincke 1882 erstmals beschrieben [47]. Unter einem Angioödem versteht man ein akut auftretendes Ödem der Subkutis beziehungsweise der Submukosa. Als Ödem bezeichnet man den Austritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem und deren Ansammlung im interstitiellen Raum. Ödeme können isoliert bis generalisiert vorkommen. Ursachen für die Entstehung sind eine herabgesetzte lymphatische Drainage bzw. eine Erschöpfung der normalen Drainagekapazität. Ein erhöhter hydrostatischer Druckgradient, ein verminderter onkotischer Druckgradient oder eine erhöhte Kapillarpermeabilität verändern den transkapillären Filtrationsdruck und führen zum Ödem [12, 84]. Angioödeme (AÖ) lassen sich nach ihrer Entstehungsweise in allergische und nicht-allergische AÖ unterscheiden. Bei den nicht-allergischen AÖ kann man weiter zwischen hereditären¹, idiopathischen², pseudo-allergischen³, erworbenen⁴ und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) Blocker induzierten Angioödem⁵ differenzieren [8]. Zu Letzteren können die durch Einnahme eines Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmers (ACEH) hervorgerufenen Angioödeme gezählt werden. Die hereditären AÖ können weiter in genetisch bedingte vermehrte Bradykininbildung infolge C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) Mangel (Typ 1) oder Funktionsstörung (Typ 2) unterteilt werden [4, 8, 9, 21]. Einen Überblick über diese Einteilung gibt die Abbildung 1.1. Die verschiedenen Manifestationsformen des AÖ veranschaulicht Abbildung 1.2. Das Glykoprotein Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, Kininase II), welches vor allem auf der luminalen Seite von vaskulären Endothelzellen und in Alveolen lokalisiert ist, wandelt Angiotensin I durch Abspaltung des carboxyterminalen Dipeptids in das vasoaktive Angiotensin II (AT II) um. AT II führt über direkte Interaktion mit der vaskulären Mus-

¹Hereditary Angioedema, HAE

²Idiopathic Angioedema, IAE

³Pseudoallergic Angioedema, PAE

⁴Acquired Angioedema, AAE

⁵RAAS Blocker Induced Angioedema, RAE

kulatur sowie über Stimulation des adrenergen Systems zur Vasokonstriktion und über Aldosteronausschüttung zur Natriumretention. Die hierdurch resultierende Erhöhung des Blutdrucks kann durch die kompetitive ACE-Hemmung blockiert werden. Darüber hinaus führen ACEH zu einem verminderten Bradykininabbau. Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer sind die in der antihypertensiven Therapie am häufigsten eingesetzte Medikamentengruppe [8, 56]. Beim ACEH-induzierten Angioödem handelt es sich um eine akut und mitunter ohne Vorwarnung auftretende ödematöse Schwellung subkutaner beziehungsweise submuköser Gewebsschichten. Die Erstmanifestation dieser gefährlichen Nebenwirkung entwickelt sich häufig erst nach jahrelanger Einnahme des Medikaments (Abb. 1.3) [4, 9]. In der Literatur werden Fälle beschrieben, bei denen bereits wenige Stunden bis Tage nach Ersteinnahme ein Angioödem auftrat. Ebenso werden Fälle beschrieben, in denen es erst mit einer Latenz von sieben bis acht Jahren oder nach Absetzen des ACEH zum Angioödem kam [9, 36, 101, 111]. Die Schwellung betrifft bevorzugt Lippe, Zunge, Rachen und Kehlkopf [36, 46, 110, 113]. Das Spektrum der Ausprägung reicht von leichten Schwellungen, beispielsweise im Bereich der Lippen, bis zur kompletten Verlegung der Atemwege (Abb. 1.4(a), 1.4(b)) [4]. Seltener Manifestationen betreffen Ödeme des subkutanen Fettgewebes und der inneren Organe wie den Gastrointestinaltrakt [26, 28, 38, 96, 104]. Diese potentiell letale Nebenwirkung tritt dosisunabhängig auf und kann zu Rezidiven führen [4, 9, 10, 21, 35, 46, 101]. Zur Inzidenz des ACEH-induzierten Angioödems gibt es in der Literatur variierende Angaben von 0,2-0,7% bei ethnischen Unterschieden [4, 20, 25, 44, 63, 81, 83, 110]. Über die Pathophysiologie des ACEH-induzierten Angioödems ist nur wenig bekannt. Bisher wurden erhöhte Plasma-Bradykininspiegel für die Entstehung unter der ACEH-Medikation verantwortlich gemacht [6, 36, 61, 68, 95, 112, 113]. Adam et al. stellten in ihrer Arbeit die These auf, dass verminderte Plasmaspiegel an Aminopeptidase, einem Enzym, welches ebenfalls am Bradykininmetabolismus beteiligt ist, ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung eines Angioödems darstellen könnte [3]. Unklar bleibt allerdings, warum Veränderungen des Bradykininspiegels, die bei allen Patienten unter der ACEH-Therapie auftreten, nur bei einigen wenigen Patienten zum Angioödem führen sollen. Angiotensin II Rezeptor Blocker wie Losartan gehen nicht mit einer Blockierung des Abbaus von Bradykinin und somit nicht mit einer Bradykininerhöhung, wie sie unter ACEH-Therapie beobachtet wird, einher. Trotzdem können AT II Blocker als unerwünschte Wirkung ein Angioödem verursachen [2, 31, 51, 57, 60, 98, 101].

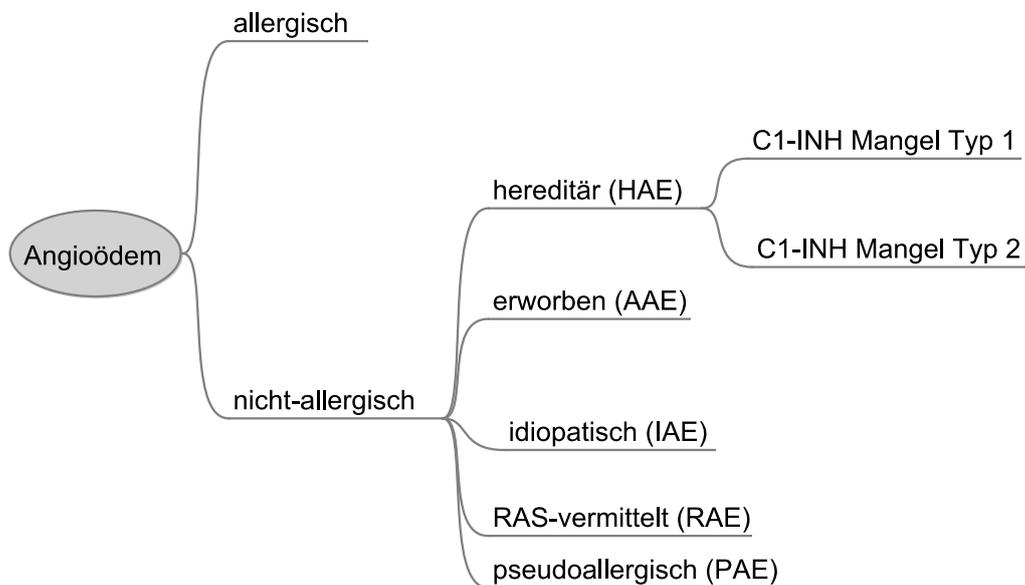


Abb. 1.1: Darstellung der Unterformen von Angioödem

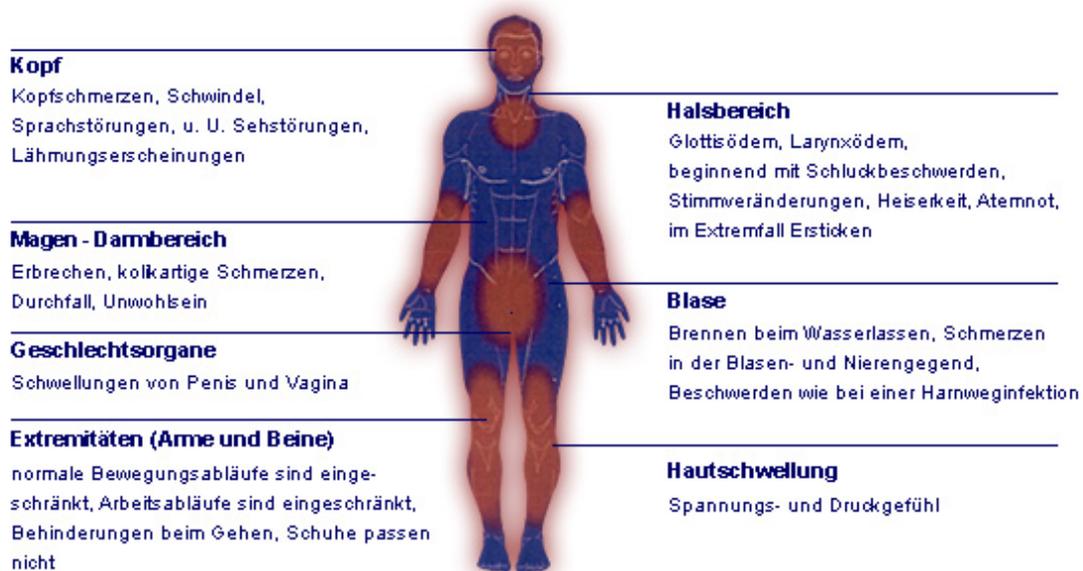


Abb. 1.2: Manifestationsformen des Angioödems aus [93]

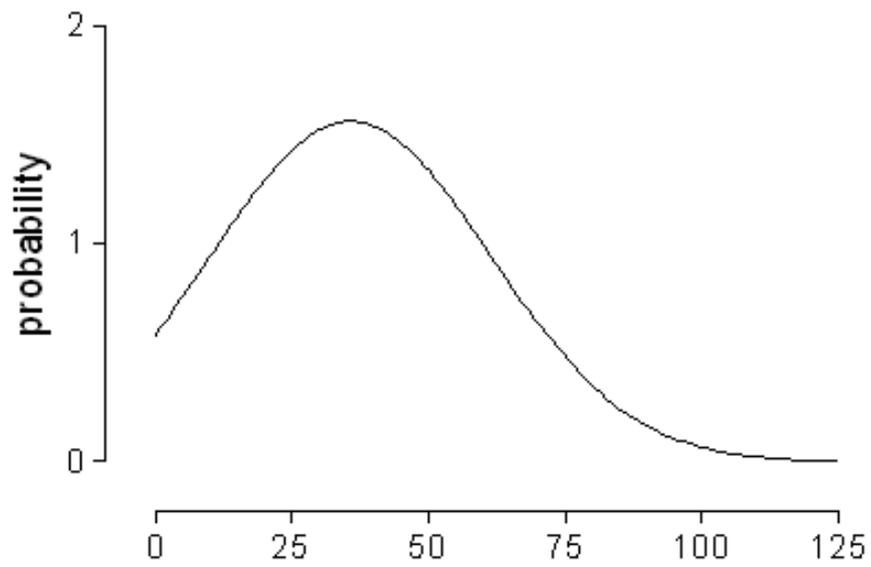


Abb. 1.3: Erstmanifestation des Angioödems unter ACEH-Therapie (in Monaten) aus [9]



(a) Patient mit ACEH-induziertem Angioödem (b) Intubationspflichtiger Patient mit ACEH-induziertem Angioödem

Abb. 1.4: Fotos von Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem aus [9]

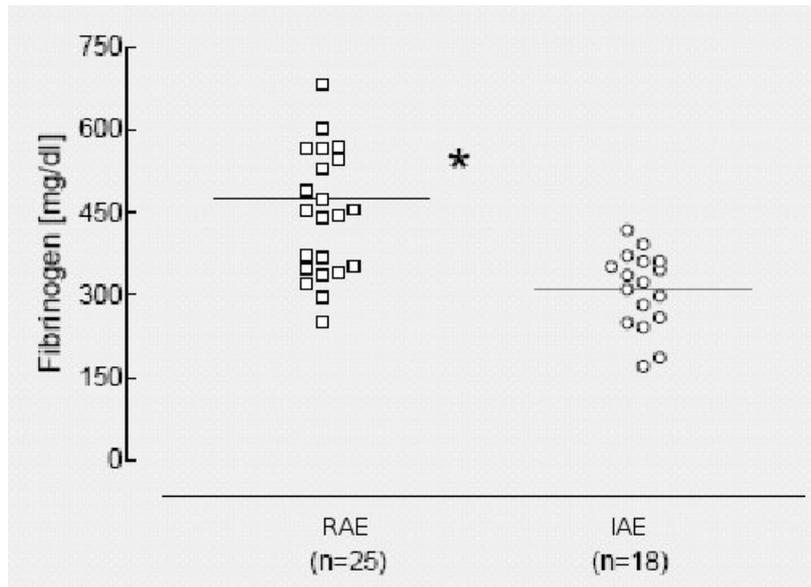


Abb. 1.5: Plasma-Fibrinogen-Konzentration bei Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem (RAE) und bei Patienten mit Ödemen anderer Genese (IAE) modifiziert nach [9]

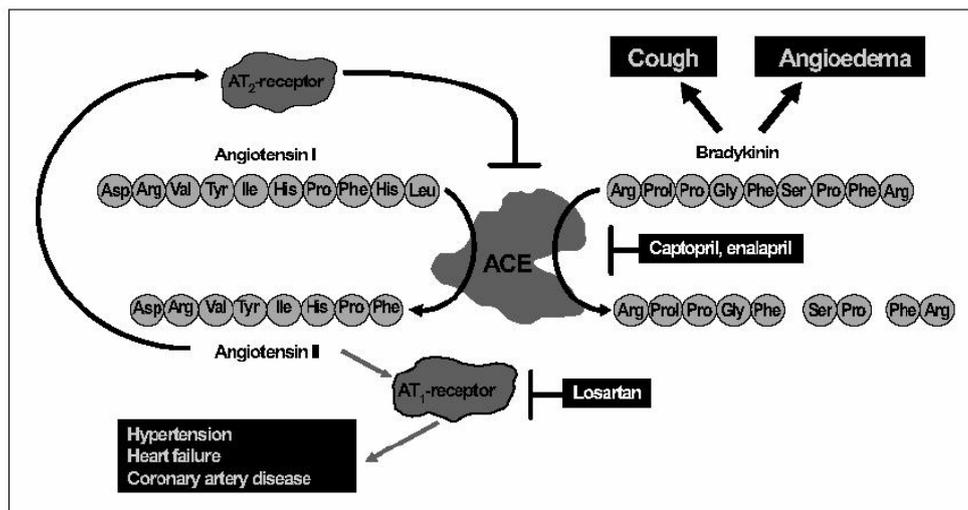


Abb. 1.6: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems aus [10]

Weiterhin ist die Latenz zwischen Ersteinnahme eines ACEH und der Entstehung eines ACEH-induzierten Angioödems ungeklärt. Es müssen also zusätzliche Faktoren existieren, die ein Angioödem unter der ACEH-Therapie begünstigen beziehungsweise verursachen.

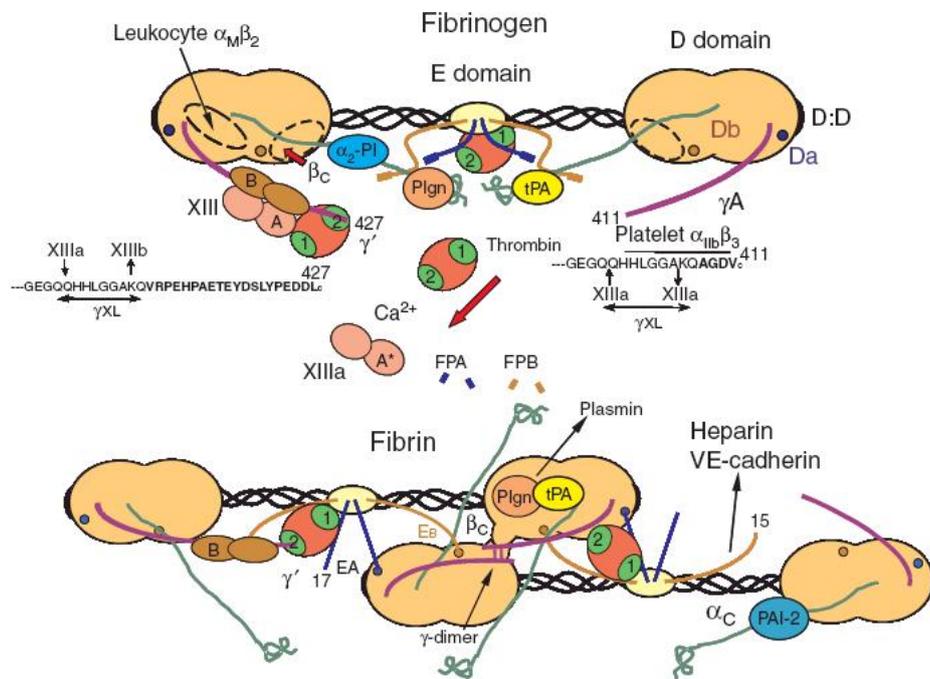
Bei Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem findet man im Vergleich zu Patienten mit Ödemen anderer Genese, signifikant über den physiologischen Bereich erhöhte Fibrinogenwerte (Abb. 1.5) [9]. Dies tritt nur in der Akutphase auf. Mit Abklingen des Ödems kommt es zu einer Normalisierung der Werte. Die Erhöhung ist nicht als Ausdruck eines infektiösen Geschehens zu betrachten, die Patienten weisen weder eine Erhöhung der Körpertemperatur noch einen Anstieg der Leukozyten im Blutbild auf. Bei Patienten unter ACEH-Behandlung ohne Angioödem-Episode sind Normalwerte von Fibrinogen im Serum nachweisbar [9]. Diese Befunde lassen vermuten, dass Fibrinogen eine Rolle im Rahmen des ACEH-induzierten Angioödems spielen könnte.

1.2 Fibrinogen

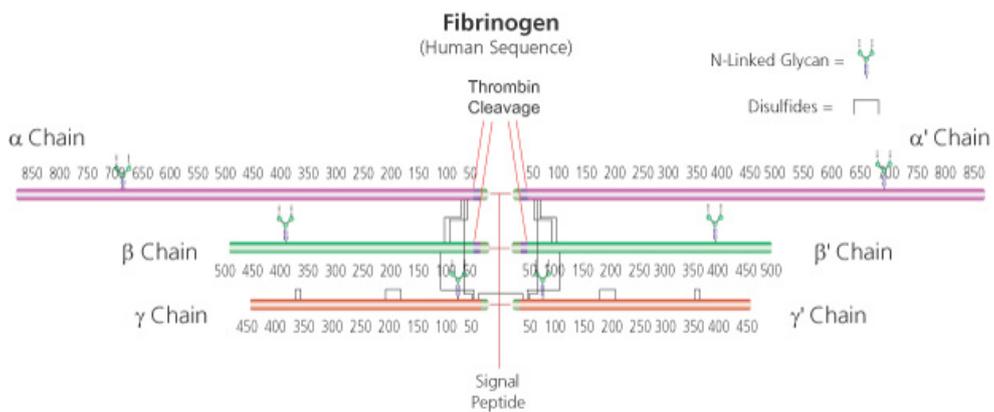
Bei dem Faktor I der Blutgerinnung und Akute-Phase-Protein der β -Fraktion Fibrinogen (lat. Fibra = die Faser) handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein. Jedes Monomer setzt sich aus den Proteinketten α , β und γ zusammen. Der Zusammenhalt der Monomere ist durch drei Disulfidbrücken gewährleistet. Innerhalb der einzelnen Monomere findet man dreizehn Disulfidbrücken. Pro Monomer sind zwei Kohlenhydratseitenketten nachweisbar (Abb. 1.7(a), 1.7(b)). Jedes Fibrinogenmolekül besitzt zwei terminale D-Domänen, verbunden mit einer zentralen E-Domäne [52, 78, 86]. Durch Abspaltung der an den aminoterminalen Enden der $A\alpha$ - und $B\beta$ -Ketten befindlichen Fibrinopeptide A und B entsteht Fibrin. Die Halbwertszeit des Glykoproteins Fibrinogen beträgt circa einhundert Stunden. Fibrinogen hat ein Molekulargewicht von 340.000 Dalton und wird Vitamin K unabhängig in der Leber von den Hepatozyten synthetisiert. Die genetische Information ist auf Chromosom vier lokalisiert und unterliegt einer hohen genetischen Variabilität [52]. Fibrinogen trägt 50% zur Blutsenkungsgeschwindigkeit bei. Die normale Plasma-Konzentration liegt bei 4,8 bis 10,5 μM (160 – 350 mg/dl). Erhöhungen sind bei akuten wie chronischen Entzündungen, Verletzungen und Verbrennungen ebenso wie nach Operationen und bei Tumorerkrankungen nachweisbar. Ebenfalls sind Erhöhungen im Rahmen eines nephrotischen Syndroms, während der Schwangerschaft oder erblich bedingt festzustellen (Tab. 1.1) [80, 85]. Der Anstieg wird durch Interleukin 6, Glukokor-

tikoide und Onkostatin M vermittelt. Als Antwort auf Entzündungsreize ist eine lokale Synthese und Sekretion im extrahepatischem Epithel, besonders im Alveolarepithel möglich. Verminderte Werte sind bei Verbrauchskoagulopathien, schweren Leberschäden und gegebenenfalls bei Operationen an Uterus, Prostata oder Lunge sowie bei Patienten unter Lysetherapie mit Strepto- und Urokinase oder Asparaginasetherapie nachweisbar. Weiterhin treten A-, Hypo- und Dysfibrinogenämien genetisch bedingt auf [62].

Zu den biologischen Funktionen des Fibrinogens gehört die Kontrolle von Blutverlusten. Es wirkt als adhäsives Protein zur Plättchen-Aggregation und als Mediator der transendothelialen Leukozyten-Migration (Abb. 1.8). In der finalen Phase der Blutgerinnung kommt es zur Ausbildung eines Fibrinthrombus. Dieser Thrombus schafft ein Gerüst für die Zell-Adhäsion, Wachstum, Migration und Proliferation ebenso wie für Re-Epithelisation, Vaskulierung und für den Kollagen-Abbau [78]. Fibrinogen bindet an das Glykoprotein IIb/IIIa. Dieser adhäsive Rezeptor aus der Familie der Integrine befindet sich auf der Oberfläche von Thrombozyten. Mit der proteolytischen Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von der $A\alpha$ - und $B\beta$ -Kette durch Einwirkung der Serinprotease Thrombin beginnt die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Die so entstandenen Fibrinogenmonomere polymerisieren und bilden ein Fibrinnetz als Grundlage des Gerinnungsthrombus. Die Stabilisierung erfolgt durch den als Transglutaminase wirkenden Faktor XIIIa, welcher kovalente Quervernetzungen im polymeren Fibrin bildet. Der Abbau von Fibrin erfolgt durch die Protease Plasmin unter Bildung von löslichen Spaltprodukten [75, 87]. Durch Bindung von Plasminogen und dessen Aktivator erfolgt eine Beschleunigung der Aktivierung zu Plasmin und damit eine verstärkte Fibrinolyse.



(a) Modell des Fibrinogens aus [86]



(b) Modell des Fibrinogens aus [91]

Abb. 1.7: Fibrinogen

Anstieg	Abnahme
Rauchen von Zigaretten	Normale körperliche Betätigung
Orale Kontrazeptiva	N-3 Fettsäuren
Positive Energiebilanz	Ticlopidin
Diabetes mellitus	Bezafibrat
Schwangerschaft	β -Blocker
Hohe diätische Fettzufuhr	Pentoxifyllin ^a
Zunehmendes Alter	Defibrotid
Menopause	Stanazolol
Entzündung	Celiprolol
Thrombin Endotoxin	
Prostaglandine	Calcium dobesilate
Steroide	Alkohol
Gefäßschäden	

^a Keine einheitlichen Ergebnisse.

Tabelle 1.1: Faktoren, die die Plasmakonzentration von Fibrinogen beeinflussen. Übersetzt aus [80]

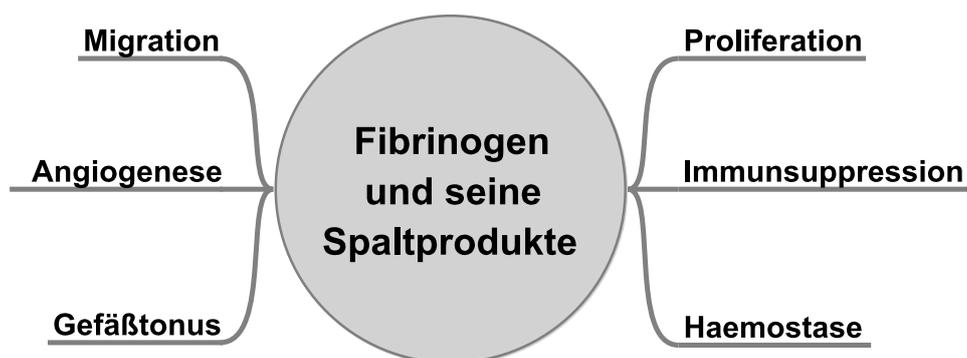


Abb. 1.8: Funktionen des Fibrinogens und seiner Spaltprodukte

Die Abbauprodukte des Fibrinogens sind bioaktiv wirksam und aktivieren unter anderem Fibroblasten. Besonders Fibrinopeptid B Spaltprodukte haben einen mitogenen

Effekt auf endotheliale Zellen, Mesothel und auf die glatte Muskulatur. Eine Stimulation der vaskulären Proliferation, inklusive der Angiogenese, der Migration und Differenzierung wird durch das Fragment E bewirkt [16]. Ebenfalls werden für das Fragment E inhibierende Effekte auf die endotheliale Zellmigration beschrieben [15, 22]. Für Fragment D und E wurden permeabilitätssteigernde Wirkungen auf das Endothel für Albumin sowie konstriktive Effekte nachgewiesen [43, 76, 77]. Weiterhin wurden für Spaltprodukte dilative Eigenschaften dargestellt [23]. Fibrinogen dient an extrazellulären Matrixproteinen gebunden als Reservoir für Wachstumsfaktoren, Proteasen und deren Inhibitoren. Fibrinogen selber ist ein mitogener Faktor für die lymphatische und die hämatopoetische Zelllinie und kann sowohl eine Dilation als auch eine Konstriktion sowie eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität bewirken. Harley et al. stellten eine Erhöhung der interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)-Protein-Expression in Endothelzellen aus humaner Vena saphena (human saphenous vein endothelial cells, HSVEC) nach Inkubation mit Fibrinogen ($0,3 - 4\mu\text{mol/l}$) dar [50]. Meade et al. zeigten in der Northwick Park Heart (NPH) Studie eine Assoziation zwischen einem erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegel, ischämischer Herzkrankheit und dadurch bedingtem Tod [82]. Fibrinogen steht im Verdacht an der Stenosierung von Gefäßen beteiligt zu sein und gilt als Risikofaktor für koronare Herzkrankheit (KHK) [53, 73, 74, 85, 100, 115, 116, 117]. Banerjee et al. zeigten in ihrer sechs-Jahres Follow-up Untersuchung der NPH Studie die Plasmakonzentration von Fibrinogen als stärksten, unabhängigen Prädiktor für den Tod der untersuchten Probanden. Ein Anstieg von 1g/l war assoziiert mit einer beinahe zweifach erhöhten Wahrscheinlichkeit, innerhalb der nächsten sechs Jahre zu versterben [7]. Zudem wiesen Scarabin et al. geographische Unterschiede in der Plasmakonzentration von Fibrinogen auf. Diese korrelierten mit der unterschiedlichen Inzidenz der KHK in den untersuchten Ländern [99]. Weitere Studien wiesen Fibrinogen als Risikofaktor für Zerebralinfarkte aus [18, 17]

1.3 Voruntersuchungen zum Fibrinogen

Während über die Funktion von Fibrinogen im Rahmen der Koagulation viel bekannt ist, gibt es nur wenige Untersuchungen über die vasomotorischen Effekte. In der Literatur werden sowohl vasokonstriktorische als auch dilatorische Eigenschaften des Fibrinogens beschrieben. Nach Hicks et al. stellt eine erhöhte Fibrinogenkonzentration einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Graft-Stenose im ersten Jahr nach Operation dar [53].

Im Weiteren zeigten Hicks et al. in Organbadversuchen eine endothelabhängige Vasodilation vermittelt durch Fibrinogen ($0 - 2\mu M$) gefolgt von einer Kontraktion bei höheren Konzentrationen ($3 - 5\mu M$) an Segmenten von humaner Vena (V.) saphena magna [54]. Hicks et al. demonstrierten eine Inhibition der fibrinogenvermittelten Dilation sowohl durch den K^+ -Kanal Blocker Glibenclamid ($30\mu M$) als auch durch ICAM-1 Antikörper (bis $40\mu g/ml$). Vorinkubation mit Indometacin ($10\mu M$) beziehungsweise mit N_ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME, $0,1mM$) oder Haemoglobin ($100\mu g/ml$) bewirkten hier eine geringe Reduktion der Fibrinogen vermittelten Relaxation. Eine Vorinkubation mit sowohl Indometacin als auch L-NAME führte zu einer Verringerung der Relaxation um ca. 23%. Hicks et al. postulierten, dass Fibrinogen vermutlich über Bindung an ICAM-1 wirkt und so einen Signalweg zur Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren, andere als Nitroxid und Prostacyclin, führt [54]. 1997 ermittelten Hicks et al. einen Unterschied in der Reaktion von Vena saphena magna Segmenten von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus auf Fibrinogen. Entweder Diabetes mellitus selbst oder die Therapie von Diabetes mellitus scheint die Reaktion der humanen V. saphena magna auf Fibrinogen zu blockieren [55].

Golledge et al. wiesen 1997 eine relaxierende Wirkung von Fibrinogen (bis $3\mu M$) an humaner V. saphena magna, verstärkt durch vorübergehende Exposition mit arteriellen Flussbedingungen, im Organbad nach. Die Dilation war durch Glibenclamid ($25\mu M$) inhibierbar und möglicherweise ICAM-1 abhängig [45].

Xie et al. zeigten 1998 an Zellkulturen von humaner V. saphena magna und an aus Ratten-Aorten gewonnen Zelllinien, dass Fibrinogen intrazelluläres Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) erhöht und postulierte ein Fortschreiten von Arteriosklerose unter Anwesenheit von Fibrinogen. Ferner stellten sie die These auf, dass die Aktivierung der Tyrosinkinase und die Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ einen wichtigen Schritt in der Vermittlung der Wirkung von Fibrinogen darstellt [117].

2 Fragestellung

Die Pathogenese des Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer induzierten Angioödems ist bis heute ungeklärt. In der Literatur werden erhöhte Plasmabradynkininspiegel, welche bei Patienten unter ACEH-Medikation nachweisbar sind, als mögliche Ursache genannt. Jedoch tritt das ACEH-induzierte Angioödem nur mit einer Inzidenz von 0,2-0,7% bei ethnischen Unterschieden auf. Untersuchungen von Bas et al. [9] wiesen laborchemisch erhöhte Werte von Fibrinogen bei Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem nach. Zu den physiologischen Aufgaben des Akute-Phase-Proteins Fibrinogen zählen unter anderem eine Beteiligung an der Blutgerinnung und mitogene Eigenschaften. Durch zahlreiche Studien wurde die Bedeutung von Fibrinogen in der Entstehung der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen [53, 73, 74, 85, 100, 115, 116, 117]. Über die direkte vasoaktive Wirkung von Fibrinogen ist hingegen nur wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte die vasoaktive Wirkung von Fibrinogen auf porcine Arterien sowie die Wechselwirkung von Fibrinogen und Bradykinin untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung von Fibrinogen an der Entstehung des ACEH-induzierten Angioödems zu ermitteln. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben einer histologischen Charakterisierung der verwendeten arteriellen, porcinen Gefäßtypen in vitro Versuche in speziellen Organbädern durchgeführt um Ausmaß und Charakteristik der Gefäßwirkung von Fibrinogen zu bestimmen. Ergänzend wurden molekularbiologische Untersuchungen angeschlossen, um Hinweise auf den beteiligten Wirkungsmechanismus zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsobjekte

Zur Durchführung der Experimente wurden arterielle Gefäßsegmente aus porvinen Herzen und porvinen Zungen verwendet.

Die benötigten Organe wurden direkt vom Schlachthof Viersen beziehungsweise (bzw.) von der Firma Kemink am Schlachthof Duisburg-Meiderich bezogen. Beide Schlachthöfe ermöglichten eine Entnahme der Organe unmittelbar nach Tötung der Schweine. Die Schweine waren durchschnittlich sechs Monate alt, männlich beziehungsweise weiblich und hatten ein Gewicht von ca. 100kg .

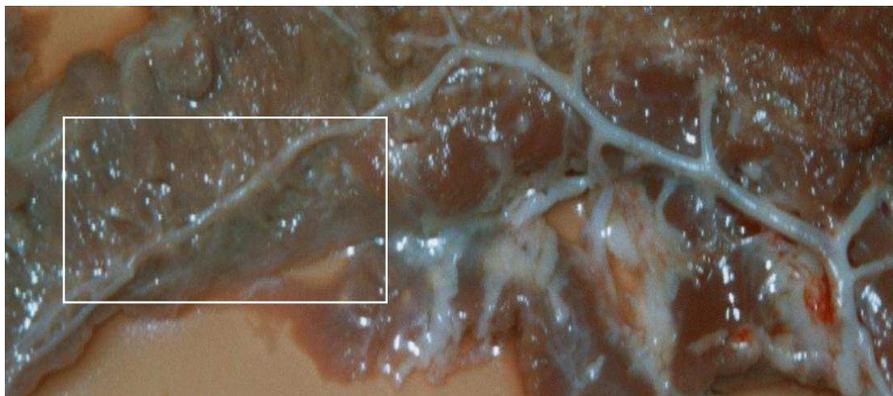
Die Zungen wurden inklusive der Rachenanteile, die Herzen mit Aortenisthmus abgesetzt und in einen mit Puffer gefüllten Vorratsbehälter überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass stets ausreichend Puffer in dem verwendeten Transportgefäß enthalten war. Der Puffer war wie unter Tabelle 3.1 beschrieben zusammengesetzt. Nach dem Transport schloss sich die weitere Präparation im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an. Für die Untersuchungen mit den Zungengefäßen wurden $5 \pm 1\text{mm}$ lange Segmente der rechten porvinen Arteria lingualis verwendet. Für die Versuche mit den Koronargefäßen wurden Segmente von $5 \pm 1\text{mm}$ Länge des ersten oder zweiten größeren, zur Apex ziehenden Abgangs der porvinen Arteria coronaria dextra verwendet. Die Segmente maßen im Außendurchmesser $1 - 1,5\text{mm}$. Die Präparation erfolgte unter Vermeidung von Zug und direktem Kontakt von Gefäß und Präparationsbesteck. Durch luminale Spülung mit dem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (KHP, Zusammensetzung siehe Tab. 3.2) ließen sich kleinere Blutreste problemlos entfernen.

Die vollständig präparierten Gefäße lagerten bei 4°C in KHP im Kühlschrank. Sie wurden am Schlachttag und dem darauf folgenden Tag für die Versuche verwendet. Durch die Aufbewahrung bis zum Folgetag kam es zu keiner Beeinträchtigung der Reaktion der Gefäße im Organbad.

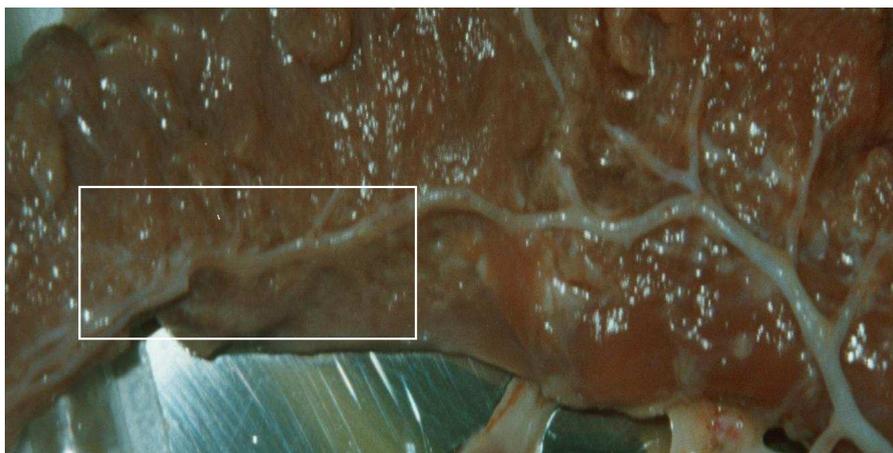
3.2 Gefäßpräparation

3.2.1 Arteria lingualis dextra

Zur Vereinfachung der Präparation erfolgte die Abtrennung der Kehlkopfanteile und anschließende Teilung der Zunge von der Radix bis zur Apex zwischen den beiden Musculi (Mm.) genioglossii entlang dem Septum linguae. Aus der so entstandenen rechten Zungenhälfte wurde die Arteria (A.) lingualis dextra aus der Tasche zwischen dem Musculus (M.) genioglossus und dem M.hyoglossus und M.longitudinalis inferior frei präpariert (Abb. 3.1(a), 3.1(b)) und in eine Petrie-Schale mit modifizierten KHP überführt.



(a)

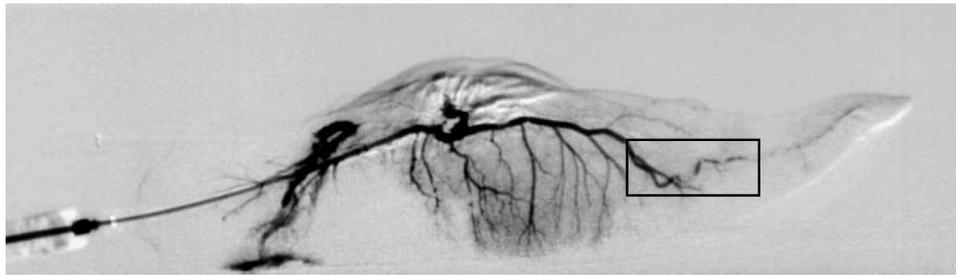


(b)

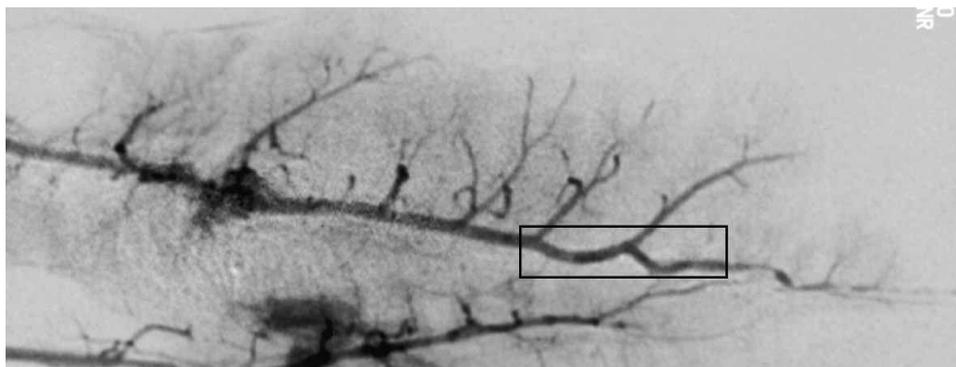
Abb. 3.1: Dargestellt ist die A. lingualis dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierung gibt die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an



Abb. 3.2: Aufbau für die Kontrastmitteldarstellung der A. lingualis dextra



(a) Seitbild



(b) Aufnahme von rostral

Abb. 3.3: Kontrastmitteldarstellung der A. lingualis dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierung gibt die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an

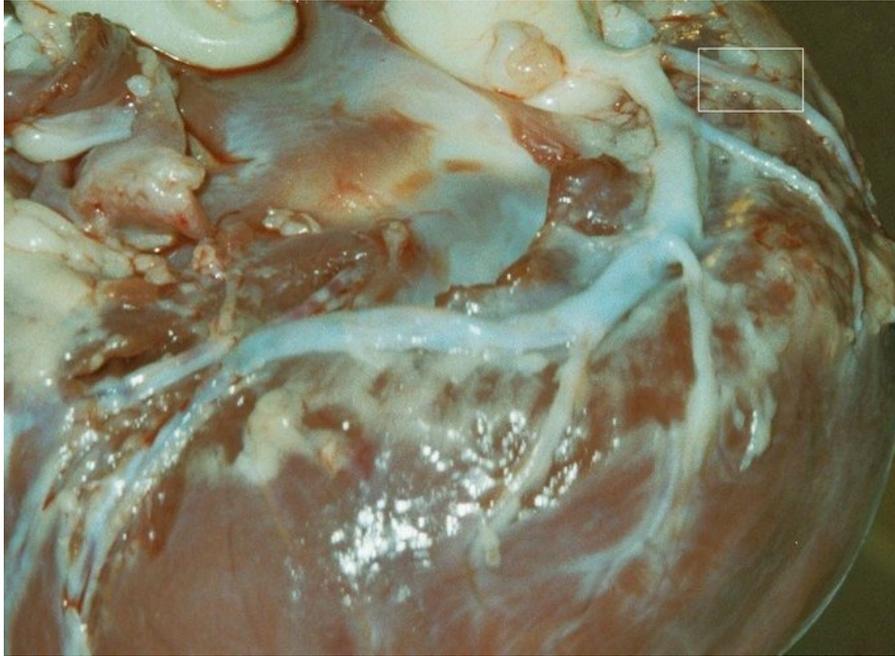
Die Kontrastmitteldarstellung der Zungenarterien erfolgte im Institut für Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf mit freundlicher Genehmigung von Herrn Universitäts Professor Dr. med. Ulrich Mödder unter Mithilfe von Herrn Doktor med. Wolfram Heinen.

Die Aufnahmen erfolgten in DSA-Technik (Digitale Subtraktions Angiographie). Als Kontrastmittel wurde das Iohexol-haltige Accupaque™ 300 verwendet.

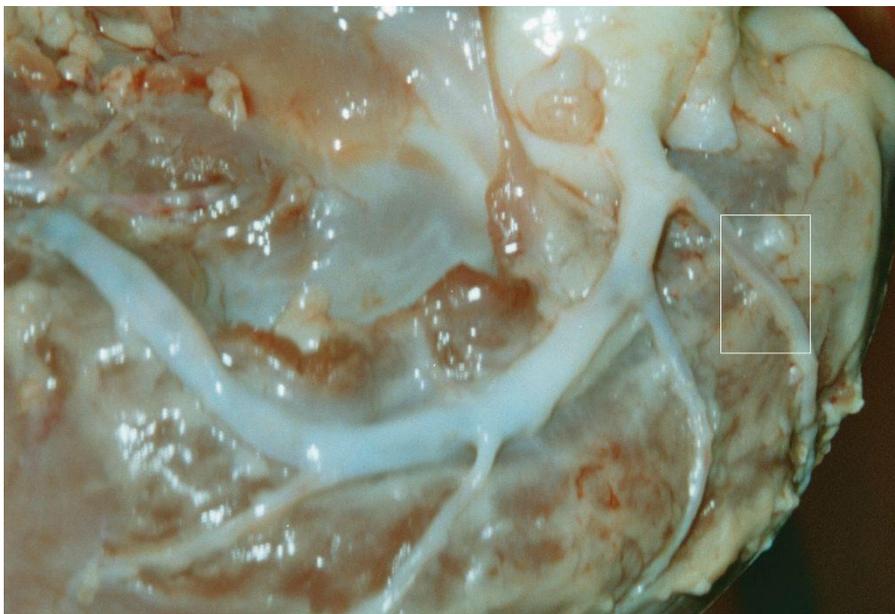
Die Abbildungen 3.3(a) und 3.3(b) zeigen die Verteilung des Kontrastmittels innerhalb des arteriellen Gefäßsystems der porvinen Zunge. Die Markierungen geben die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an. Die beiden Artrieae (Aa.) lingualis weisen eine gemeinsame Endstrecke auf.

3.2.2 Arteria coronaria dextra

Nach Freilegung der A. coronaria dextra im Sulcus coronarius aus dem umgebenden Fettgewebe erfolgte die Präparation der ersten beiden größeren, zur Apex ziehenden Abgänge. Die Auswahl des für den Versuch verwendeten Abgangs erfolgte nach Bestimmung des Gefäßdurchmessers (Abb. 3.4(a), 3.4(b)). Der entsprechende Abgang wurde in eine Petrie-Schale mit KHP überführt. Die Feinpräparation erfolgte im KHP.



(a)



(b)

Abb. 3.4: Dargestellt ist die A. coronaria dextra mit ihren Seitenästen. Die Markierungen geben die Lokalisation der verwendeten Gefäßsegmente an

3.3 Transportlösung

Der Transport der Organe vom Schlachthof zum Labor erfolgte in Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffer (Tab. 3.1).

Bestandteil	Konzentration [g/l]
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄	1,15

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des verwendeten Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffers

3.4 Versuchsaufbau

Der Aufbau und die Durchführung des Versuches werden zur Erleichterung der Transparenz dezidiert beschrieben:

3.4.1 Apparatur und Instrumente

Die **experimentelle Anlage** war wie folgt aufgebaut:

- vier doppelwandige Organbäder (Innen ca. 16,5ml Fassungsvermögen) aus Glas
- ein Umlaufthermostat (Fa. Haake, Typ NB22)
- vier Spannungsaufnehmer (Fa. Statham, USA)
- ein doppelwandiges Vorratsgefäß aus Glas (ca. 1l Fassungsvermögen) für die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung mit Anschluss an den Thermostatkreislauf
- zwei Verstärker
- zwei Schreiber (Fa. Goerz Mettrawatt, Typ SE 120)

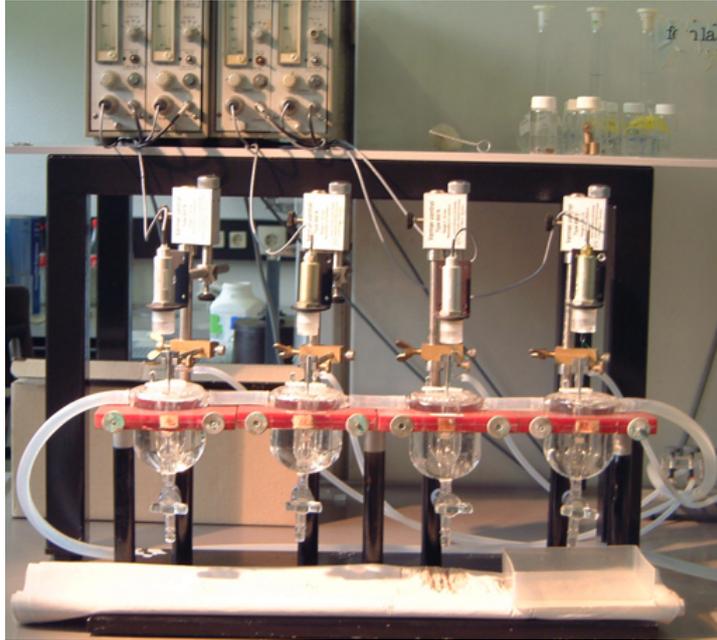


Abb. 3.5: Foto des verwendeten Organbades

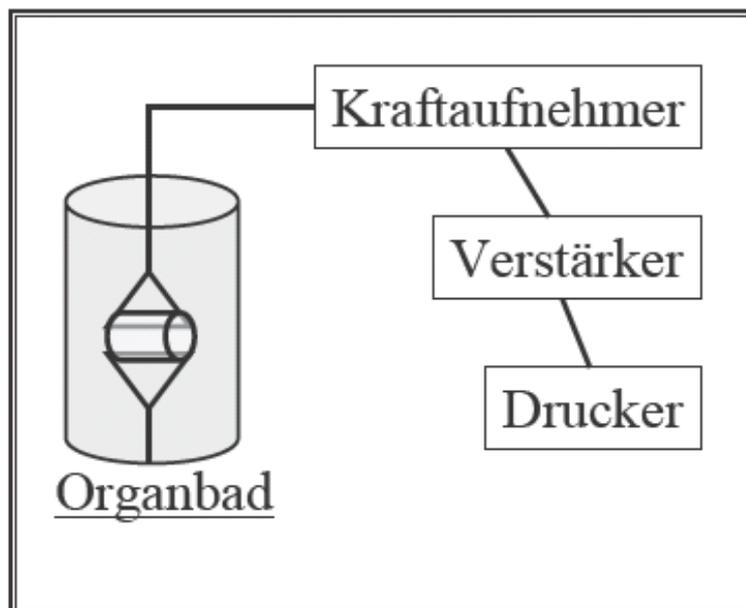


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung des Gefäßtonus isolierter porviner Arterienringe, Aufhängung auf triangelförmige Haken

Instrumente:

- OP-Instrumentensieb mit mehreren Scheren und Pinzetten
- eine anatomische, spitze, gebogene Pinzette
- Einweg-Skalpelle (Fa. Feather, No.21)
- mehrere Petrie-Schalen
- Spritzen mit Kanülen
- triangelförmige Haken aus Edelstahl zum Einhängen der Gefäßringe ins Organbad
- textiler Faden (Supolene, 1,5 metric 4/0 USP, Resorba Nürnberg) zur Verbindung zwischen Haken und Spannungsaufnehmer
- feine Holzspäne
- Flaschen mit Deckel (Kunststoff, Füllvermögen 20ml)
- mehrere Feinpipetten (Eppendorf Research)

3.4.2 Nährmedium im Organbad

Während der Messung wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHP) verwendet (Tab. 3.2). Diese wurde täglich frisch angesetzt.

Bestandteile	Konzentration [mM/l]
K^+	5,87
Na^+	143,07
Cl^-	125,96
Ca^{2+}	1,6
Mg^{2+}	1,18
HCO_3^-	25
$H_2PO_4^-$	1,18
SO_4^{2-}	1,18
Glucose	5,05

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers (KHP)

Zur Herstellung wurden NaCl (13,8g), NaHCO₃ (4,2g) und Glucosemonohydrat (2,2g) als Trockensubstanz abgewogen. Die übrigen Mineralien wurden mittels den in Tabelle 3.3 dargestellten, kühl gelagerten Stammlösungen zugefügt.

	Bestandteile	Konzentration [M/l]
Stammlösung 1	KH ₂ PO ₄	0,235
Stammlösung 2	KCL	0,939
Stammlösung 3	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,235
Stammlösung 4	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,320

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Stammlösungen

Hiervon wurde jeweils 10ml zu den Trockensubstanzen gegeben. Zu der Lösung wurde, wenn nicht anders bezeichnet, 10⁻⁵mol Diclofenac hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung auf zwei Liter aufgefüllt und bei Raumtemperatur mittels Salzsäure (HCl, 37%) und Natronlauge (NaOH, 1M) auf einen pH-Wert von 7,35 bis 7,45 eingestellt.

3.5 Versuchsablauf

Folgendes Grundschema wurde weitgehend eingehalten:

- Kalibrierung
- Einhängen der Gefäße
- Äquilibrierung
- Kontraktionstest mit Kaliumchlorid
- Endotheltest mit
 - Prostaglandin F_{2α} und Substanz P (Koronararterien)
 - Phenylephrin und Acetylcholin (Lingualarterien)
- Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit und ohne Vorinkubation

Zwischen den einzelnen Versuchsschritten wurde jeweils mindestens drei Mal der Puffer im Organbad ersetzt und die Vorspannung korrigiert. Die Zugabe der zu prüfenden Substanzen erfolgte über eine Feinpipette.

3.5.1 Kalibrierung

Vor jedem Versuch wurden das Messgerät und der Verstärker kalibriert. Die Einstellung der Vorspannung erfolgte mittels Anhängen von 2g schweren Gewichten am Spannungsaufnehmer und durch Abgleichung der Verstärkung auf „null“. Dies wurde als „Baseline“ gesetzt. Die Eichung des Ausschlags erfolgte mit zwei zusätzlichen, jeweils 2g schweren Gewichten.

3.5.2 Einhängen

Nach der Feinpräparation wurden die Gefäßringe, wenn nicht anders benötigt, unter größtmöglicher Schonung der Intima auf jeweils zwei Triangeln aufgezogen und in die mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Organbäder eingehängt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass sich die beiden Triangeln nicht in einander verhakten. Die untere Triangel wurde an einer Haltestange befestigt, die obere Triangel mittels des Supolenefadens vertikal mit dem Spannungsaufnehmer verbunden. Der Supolenefaden durfte nicht zu stramm gezogen werden, da hierdurch die Gefahr einer Endothelbeschädigung bestanden hätte. Eine zu lockere Einspannung konnte nicht justiert werden. Die Triangeln durften nicht zu nachgiebig sein, da hierdurch falsch zu niedrige Ergebnisse resultierten. Die befüllten Organbäder wurden mit einer Heizung konstant auf 37°C gehalten und mit Karbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, begast.

3.5.3 Äquilibrierung

Die Äquilibrierungsphase nahm einen Zeitraum von ca. 90 Minuten (Koronargefäß) bis ca. 120 Minuten (Zungengefäß) ein. Nach Einbringen der Gefäßringe in das mit KHP gefüllte Organbad wurden die Präparate schrittweise durch wiederholte Justierung am Spannungsaufnehmer vorgedehnt, um eine für die maximale Kontraktion optimale Vorspannung zu erhalten. Anschließend wurden die Gefäßringe im Organbad äquilibriert und gegebenenfalls die Organlast nachreguliert. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus wurde mit den Kontraktionsversuchen begonnen. Der Puffer wurde regelmäßig durch frischen, begasten und vorgewärmten Puffer ersetzt. Frischer Puffer wurde über eine Messpipette zügig, aber ohne die Gefäßringe oder ihre Aufhängung zu berühren, nachgefüllt. Nach jeder Auswaschung wurde gegebenenfalls die Vorspannung korrigiert.

Diese Nulllinie auf der Basis der Gefäßvorspannung durch das Anhängen der 2g schweren Gewichte diente während des ganzen Versuchs als Bezugspunkt und wurde zwischen den einzelnen Versuchsschritten bei Abweichung wieder eingestellt. Erst bei konstanter Vorspannung wurden weitere Versuchsschritte durchgeführt. Vor Zugabe der Testsubstanzen betrug das in den Organbädern eingefüllte Puffervolumen, außer bei den Versuchen mit Fibrinogen, genau 10,0ml. Die Zugabe der Substanzen erfolgte mittels Feinpipetten (Eppendorf Research).

3.5.4 Kontraktionstest

Durch Zugabe von 90mM Kaliumchlorid (KCl) in einer Einzeldosis wurde die generelle, rezeptorunabhängige Kontraktionsfähigkeit der glattmuskulären Gefäßwand überprüft. Hierzu erfolgte zweimalig eine maximale Kontraktion und anschließende Berechnung des Mittelwertes. Nach positivem Kontraktionstest folgte erneut eine Äquilibrationsphase mit dem Ziel der Wiedereinstellung der Vorspannung. Zur vollständigen Relaxation der Arterien und zur Einstellung der Vorspannung war ein mehrfaches Auswaschen der Pufferlösung notwendig, dies nahm einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten ein.

3.5.5 Endotheltest

Das Ausmaß der endothelabhängigen Relaxation ist abhängig von der Intaktheit des Gefäßendothels und ermöglicht eine quantitative Aussage über eventuelle Funktionsveränderungen. Der pharmakologische Nachweis einer dilativen Reaktion begann stets mit einer Vorkontraktion der Gefäßsegmente. Das Maximum der Kontraktion wurde als Bezugspunkt auf 100 Prozent gesetzt.

Arteria lingualis dextra

Der Endotheltest an der A. lingualis dextra erfolgte durch rezeptorvermittelte Vorkontraktion mit 0,6µM Phenylephrin und anschließender Gabe von 10µM Acetylcholin bei Erreichen eines Plateaus.

Auf Grund der relativ kurzen Wirkungsdauer des Acetylcholins erfolgte eine nur kurzfristige Dilatation. Mit dem Nachlassen der Wirkung des Acetylcholins stellte sich die Spannung der Gefäßsegmente wieder im Bereich der Vorspannung ein. Nach mehrmaligem Auswaschen wurde der nachfolgende Versuchsschritt durchgeführt. Acetylcholin bewirkt

eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, dies führt über Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zur Vasorelaxation. Furchgott postulierte 1981 die rezeptorvermittelte Freisetzung einer endothelialen, relaxierenden Substanz, des „Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF)“ [42]. 1987 wurde Stickstoffmonoxid (NO) als EDRF erkannt [59, 97]. NO steuert vielzählige physiologische Funktionen. Hierzu zählen unter anderem die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus. NO führt nach Diffusion durch die Zellmembran in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu einer Stimulation der löslichen Guanylatcyclyase, dies katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) [88]. Das cGMP führt durch Ausschleusung des $[Ca^{2+}]_i$ und Rückresorption von Calcium ins sarkoplasmatische Retikulum zu einer Abnahme des Calciums in der Zelle. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung des Myosins und damit zur Lösung der Brückenverbindungen mit Actin und so zur messbaren Relaxation der Gefäßwand.

Arteria coronaria dextra

Der Endotheltest an der A. coronaria dextra erfolgte durch Vorkontraktion mit $5\mu M$ Prostaglandin $F_{2\alpha}$. Die Relaxation nach Erreichen des Plateaus erfolgte endothelabhängig mittels Zugabe von $3nM$ Substanz P [13, 30, 41, 65].

Nach der Durchführung des Endotheltests erfolgte erneut eine Äquilibrationsphase mit dem Ziel der Wiedereinstellung der Vorspannung unter mehrfachem Wechsel der Pufferlösung, was einen Zeitraum von ca. 50 bis 80 Minuten einnahm.

Der Wirkungsmechanismus von Substanz P ist nicht endgültig geklärt. Die Vasodilation wird durch eine cGMP Produktion über verschiedene Signalwege vermittelt.

Substanz P induziert eine endogene NO-Produktion über die Aktivierung der endothelialen NOS [64]. Die Ergebnisse von Klede und Tagawa legen nahe, dass die Substanz P vermittelte Vasodilation nicht nur vom NO-Signalweg abhängig ist [66, 108].

3.5.6 Inkubationsversuche

Bei den Inkubationsversuchen wurden im Ablauf entsprechende Kontrollen mit Puffer durchgeführt.

3.5.7 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Die Konzentrations-Wirkungs-Versuche wurden kumulativ durchgeführt. Die Folgekonzentration wurde jeweils nach Einstellung des Maximaleffektes gegeben.

3.5.8 Kaliumchlorid

Der konstriktorische Effekt von Kaliumchlorid (KCl) auf glatte Muskelzellen von Arterien wird durch eine auf dem Ausgleich des Kalium-Konzentrationsgradienten beruhende Depolarisation induziert. Dies führt zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle (Voltage-Operated Ca^{2+} Channels, VOCs) in den Intrazellularraum [14].

Die Konzentration von Kaliumchlorid im Organbad wurde für die Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) kumulativ gesteigert. Die Steigerung der Konzentration erfolgt in Schritten von 10mM , ausgehend von den im Puffer enthaltenen 5mM KCl ($10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90\text{mM}$).

3.5.9 Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$

Der klinische Einsatz des Arachidonsäure Metaboliten Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) beruht auf dessen stark uteruskontrahierendem Effekt. Darüber hinaus besitzt $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine ausgeprägte vasokonstriktorische Wirkung auf arterielle Gefäße [5]. Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ führt nach Rezeptorbindung zu einer Aktivierung von Phospholipase C und von Adenylatzyklase.

Die Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Organbad wurde kumulativ gesteigert. Die Steigerung der Konzentration erfolgt zunächst kleinschrittig bis $20\mu\text{M}$ ($1\mu\text{M}, 5\mu\text{M}, 10\mu\text{M}, 20\mu\text{M}$), dann in Schritten von $10\mu\text{M}$ bis zu einer maximalen Konzentration von $70\mu\text{M}$ im Organbad.

3.5.10 Phenylephrin

Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 10^{-2}M angesetzt. Die α_1 -Rezeptor-vermittelte Kontraktion von Phenylephrin erfolgte kumulativ ($1\text{nM} - 300\mu\text{M}$). Die anschließende Auswaschungs- und Äquilibrationsphase beanspruchte in der Regel 50 bis 70 Minuten.

3.5.11 Acetylcholin

Es wurde eine Stammlösung von $10^{-2}M$ angesetzt. Nach Vorkontraktion mit $0,6\mu M$ Phenylephrin wurde eine endothelabhängige Relaxation durch kumulative Zugabe von Acetylcholin (ACh, $1nM-300\mu M$) ausgelöst. Auswaschung und Äquilibration erfolgten wie oben beschrieben.

3.5.12 Bradykinin

Das Peptid Bradykinin gehört zur α_2 -Globulinfraction und hat eine Halbwertszeit von circa 30 Sekunden im Blut. Die Primärstruktur bilden neun Aminosäuren (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) mit einer Molekülmasse von 1060,22 Dalton. Bradykinin ist ein endothelabhängiger Vasodilatator, erhöht die Gefäßpermeabilität und bedingt eine Kontraktion nicht-vaskulärer glatter Muskulatur. Weiterhin ist Bradykinin an der Schmerzvermittlung beteiligt.

Es wurde eine Stammlösung von $10^{-2}M$ angesetzt. Nach einer Vorkontraktion mit $8\mu M$ $PGF_{2\alpha}$ erfolgte zum Nachweis der endothelabhängigen Relaxation eine zunächst kleinschrittige Zugabe von Bradykinin, beginnend mit einer Konzentration von $0,01nM$ bis zu einer maximalen Konzentration von $1\mu m$ im Organbad beziehungsweise, sollte dies vorher erreicht werden, bis zur vollständigen Relaxation. Versuche mit Bradykinin wurden ohne Diclofenac im Puffer durchgeführt.

3.5.13 Fibrinogen

Fibrinogen, aus Rinderplasma, wurde von der Firma Fluka bezogen und enthielt mindestens 77% Protein. Für die Versuchsreihe wurde eine $35\mu M$ Stammlösung hergestellt. Das Lösen des Fibrinogens zur Herstellung der Stammlösung erfolgte in KHP bei $37^\circ C$ im Wärmebad. Hierzu wurde das Fibrinogen portionsweise auf den in den Petrie-Schalen befindlichen KHP gestreut. Die Schale wurde während dieses Vorgangs, welcher ca. 40 Minuten einnahm, wiederholt geschwenkt. Die Versuche mit Fibrinogen erfolgten auf Grund der starken Schaumentwicklung im Organbad unter Zusatz von Entschäumern. Folgende Zusätze wurden hierfür erprobt:

- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Sab simplex

- Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)
- Antifoam A Concentrate
- Dimethicon
- Tenside F68 (Poloxamer 188), F87, F108 (Poloxamer 338), F127 (Poloxamer 407)

Zunächst wurden die Entschäumer auf eine mögliche Eigenwirkung auf die Gefäße untersucht. Hierzu erfolgte eine kumulative Zugabe von entschäumender Substanz auf das mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierte Gefäß. Bei fehlender Beeinflussung des Vasotonus erfolgte das Austreten der entschäumenden Wirkung. Die Versuche mit Fibrinogen wurden unter Zugabe der Antischaum-Mittel F68 ($0,8\text{mg/ml}$) und Dimethicon ($12\mu\text{M}$) durchgeführt. F68 und Dimethicon wurden vor der Zugabe in das Organbad miteinander vermischt. Durch die Kombination konnte die Ausbildung eines größeren Tropfens Dimethicons im Organbad verhindert, und eine ausreichende entschäumende Wirkung erzielt werden. Bei Poloxameren handelt es sich um tensidartige Blockpolymere mit einem zentralen Polypropylynglykol-Anteil. Dieser ist an den Kettenenden mit jeweils einem Polyethylenglykol-Anteil verknüpft [94].

Es erfolgten Untersuchungen auf den Basaltonus der Gefäße und nach Vorkontraktion mit $5\mu\text{M}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ sowie Versuche nach Vorinkubation mit Fibrinogen. Für die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) wurde die Konzentration von Fibrinogen im Organbad kumulativ gesteigert. Dies erfolgte zunächst in Schritten von $2\mu\text{M}$ und, ab einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ im Organbad, in Schritten von $1\mu\text{M}$ bis zur Endkonzentration von $15\mu\text{M}$. Bis zum Erreichen des Plateaus dauerte es nach Zugabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ 20 bis 30 Minuten.

Weitere Versuche mit Fibrinogen wurden mit mechanisch zerstörtem Endothel und nach Inkubation mit dem ATP-abhängigen Kalium-Kanal Blocker Glibenclamid (10^{-5}M) durchgeführt. Die Dauer der Vorinkubation mit Glibenclamid betrug bis zur Zugabe von Fibrinogen circa 50 bis 60 Minuten, je nach Varianz bis zur Einstellung eines Plateaus nach Vorkontraktion.

Der Einfluss des Stickstoffmonoxid wurde mittels Blockierung der NO-Wirkung durch den eNOS-Inhibitor N_ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) überprüft. L-NAME wurde in einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ zugegeben. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Eine weitere Versuchsreihe erfolgte nach Vorinkubation mit dem ACE-Hemmer Moexipril. Moexipril gehört zu den neuen ACE-Hemmern und ist zur Behandlung der essentiellen Hypertonie zugelassen. Der eigentliche Wirkstoff ist Moexiprilat und wird sowohl renal als auch hepatisch eliminiert [32]. Moexipril wurde in einer Konzentration von $100\mu M$ zugegeben.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Durchführung einer Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) mit Fibrinogen wie oben beschrieben.

Die konzentrationsabhängige Bradykinin-Wirkung wurde nach einstündiger Vorinkubation mit und ohne Fibrinogen ermittelt. Die DWK wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Untersuchungen im Organbad beanspruchten pro Versuchstag 5 bis 8 Stunden, in denen sich die Reaktionsfähigkeit der Gefäßsegmente nicht verschlechterte.

3.5.14 Entfernung des Endothels

Die mechanische Zerstörung des Endothels erfolgte unter Zuhilfenahme der Triangeln und mit ca. $0,4 * 20mm$ messenden Holzspänen. Diese wurden vorsichtig in das Gefäßlumen eingeführt und unter Rollbewegungen vor und zurück gezogen. Wichtig war hierbei eine größtmögliche Schonung der glatten Muskulatur. Dies wurde durch nachfolgende Kontraktionstests überprüft.

3.6 Fixierung

Es erfolgte eine Fixierung von Gefäßsegmenten in Bouinscher Lösung nach zweistündiger Inkubation im KHP mit und ohne Fibrinogen ($15\mu M$). Das Lösen des Fibrinogens wurde wie für die Konzentrations-Wirkungs-Kurven beschrieben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in Petrie-Schalen im Wärmebad bei konstant $37^{\circ}C$ unter gelegentlichem Schwenken der Schalen. Hierzu wurde Bouinscher Fixierlösung hergestellt.

Bouinsche Lösung enthält:

- 15 Teile gesättigte Pikrinsäure
- 5 Teile Formalin (37% Formaldehyd)
- 1 Teil Eisessig (100% Essigsäure)

Der Eisessig wurde erst kurz vor Gebrauch zugesetzt.

Ansatz der wässrig gesättigten Pikrinsäure:

- 15g Pikrinsäure
- 950ml Aqua dest.

Die Pikrinsäure wurde in Aqua dest. gelöst und zwei bis drei Tage stehen gelassen bis sie vollständig gelöst war, wobei die Pikrinsäure auf Grund der Explosionsgefahr immer feucht gehalten wurde. Der Umgang mit der Fixierlösung erfolgte wegen der Giftigkeit unter dem Abzug. Die Arteriensegmente wurden in 20ml fassende Flaschen aus Plastik überführt, anschließend wurden 8ml Bouinsche Lösung hinzugefügt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sämtliche Segmente ausreichend bedeckt waren. Die geschlossenen Flaschen wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Nach einer Stunde sowie nach vierundzwanzig Stunden wurde die Fixierlösung erneuert.

Die fixierten Gefäßsegmente wurden zur weiteren Analyse zum Anatomischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover gesendet und hier in Paraffin-Wachs eingebettet. Hiervon wurden 6 μ m dicke Schnitte für den Nachweis von Fibrinogen eingefärbt (Monoklonale Antikörper in einer Lösung von 1 : 50 und 1 : 75, antihuman, von Mäusen, Sigma) mit anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C. Die Reaktion wurde mittels eines sehr sensitiven Dextran-Polymer Visualisierungs-Systems (Firma DAKO), welches den zweiten Antikörper einschloss, detektiert. Kontrollen wurden mit dem ersten und / oder dem zweiten Antikörper sowie unter Weglassen des Visualisierungssystems durchgeführt. Beide Arterientypen wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

3.7 Histologie

Neben den Funktionstests erfolgte eine morphologische Begutachtung der Gefäßsegmente. Für die histologischen Querschnitte wurden frei präparierte Gefäßsegmente zunächst in Formalin nach Lillie fixiert (Tab. 3.4). Die Fixierlösung wurde frisch angesetzt und bestand aus neun Teilen Puffer und einem Teil Formaldehyd. Die geschlossenen Plastikbehälter wurden im Kühlschrank aufbewahrt und die Fixierlösung regelmäßig gewechselt. Anschließend wurden die Gefäße nach Haemalaun-Eosin gefärbt. Die Haemalaun-Eosin-Färbung ist eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie. Ziel ist die Abbildung von Gewebsstrukturen im Organschnitt durch den Kernfarbstoff Haemalaun und Kontrastierung durch den Plasmafärbstoff Eosin. So stellen sich die Kerne blaßblau und Muskel- sowie Bindegewebe rot dar [71]. Die Durchführung erfolgte wie in

Tabelle 3.6 beschrieben. Die Eosin-Lösung setzte sich aus 1g auf 1l Aqua dest. (Aqua destillata) zusammen. Auf 100ml Färbelösung wurde ein Tropfen Eisessig zugesetzt, um die Färbeintensität zu erhöhen. Da das hydrophobe und alkoholunlösliche Paraffin den Zugang des Farbstoffes zum Gewebe erschwert, musste es vor der Färbung entfernt, also entparaffiniert und der Schnitt in ein wässriges Medium gebracht und rehydriert werden. Entparaffiniert wurde mittels Zugabe von Xylol. Hierbei war eine vollständige Lösung nötig, anders würde eine fleckige Färbung verursacht. Das lange Verbleiben in der Entparaffinierungslösung wirkte sich dagegen nicht negativ auf das Gewebe aus [71]. Rehydriert wurde anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest.

Bestandteile	Menge
NaH ₂ PO ₄	0,69g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	3,56g
H ₂ O	225ml

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Formalinlösung nach Lilie (4% FA)

Bestandteile	Menge
Haematoxylin	1g
Aqua dest.	1l
KJO ₃ zur künstlichen Reifung, oxidiert Haematoxylin zu Haematein	0,2g
Aluminium-Kaliumsulfat Beize, kurz erwärmen oder über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen	50g
Chloralhydrat Stabilisator	50g
Citronensäure kurz aufkochen oder über mehrere Tage stehen lassen	1g

Tabelle 3.5: Zusammensetzung Meyers Haematoxylin

Substanz	Dauer
1. Entparaffinieren in Xylol	mind. 15min
2. Entparaffinieren in Xylol	mind. 15min
3. Entparaffinieren in Xylol	mind. 15min
4. Ethanol 99,5%	1min
5. Ethanol 99,5%	1min
6. Ethanol 96%	1min
7. Ethanol 70%	1min
8. Abspülen mit H ₂ O	3min
9. Kernfärbung: Mayers Haemalaunlösung	1min
10. Abspülen mit H ₂ O	einige s
11. Differenzieren in HCl-Alkohol	2 – 3* kurz eintauchen
12. Abspülen mit H ₂ O	einige s
13. Unter fließendem Wasser bläuen	1min
14. Plasmafärbung: Eosin 0,1%+1ggt Eisessig	1min
15. Differenzieren in Ethanol 70%	5min
16. Ethanol 96%	1min
17. Ethanol 99,5%	1min
18. Xylol	1min
19. Xylol	2min
20. Eindecken mit Entellan	

Tabelle 3.6: Durchführung der Haemalaun-Eosin-Färbung

3.8 Probenvorbereitung für die Vasodilator stimulierten Phosphoprotein-Western-Blots

Nach einstündiger Inkubation der Gefäßsegmente im Organbad mit und ohne $15\mu M$ Fibrinogen erfolgte die Zugabe von $0,1nM$ Bradykinin. Nach einer Wartezeit von zwei Minuten wurden die Segmente in flüssigem Stickstoff gefroren. Die gefrorenen Proben wurden mit $2ml$ Tris Puffer ($5mmol$) und dem in Tabelle 3.7 beschriebenen Proteinase-Inhibitor-Cocktail homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert.

3.9 Proteinbestimmung (Bio-Rad-Assay)

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels der photometrischen Methode nach Bradford. Die Bindung des verwendeten Farbstoffes Coomassie Brillant Blau an Proteine verschiebt das Absorptionsmaximum von $465nm$ auf $595nm$ und ermöglicht so eine

Bestandteile	Menge
Leupeptin	1mg
Antipain	1mg
Aprotinin	1mg
Benzamidin	1mg
In 1ml Aqua dest. auflösen	

Tabelle 3.7: Proteaseinhibitormix von Sigma

Quantifizierung der Proteinkonzentration. Dieses Verfahren bietet sowohl durch seine Unempfindlichkeit gegenüber störenden Ionen und Reduktionsmitteln als auch durch sein monochromatisches Messprinzip Vorteile im Vergleich zu anderen Verfahren. Da die Farbreaktion je nach Proteinzusammensetzung unterschiedlich ausfällt, erfolgte zunächst die Eichung mit bovinem Serumalbumin (BSA). Zur Proteinbestimmung wurden eine 96 Wellplatte, Bradford-Reagenz (1x, Tab. 3.8), Eppendorf Feinpipetten sowie Standardproteinlösung BSA ($0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gebraucht. In einer 96 Wellplatte wurde wie folgt pipettiert:

μg	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0
μl	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

Das BIO-RAD Farbreagenz wurde 1 : 5 verdünnt und jeweils $200\mu\text{l}$ /Well zu der Standardreihe zugegeben. Als Blank diente Tris-Lösung. Es war zu beachten, dass die Regression nicht unter 0,99 lag. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 595nm .

Bestandteile	Menge
Coomassie Blue G250	40mg
Phosphorsäure 85%	20ml
Ethanol 96%	10ml
Aqua dest	

Tabelle 3.8: Zusammensetzung Bradford-Reagenz

3.10 Vasodilator-stimulierte-Phosphoprotein-Western-Blots

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western-Blot. Das Prinzip des Western-Blots beruht darauf, dass Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine

Membran transferiert, geblottet und dort durch Antikörperbindung und anschließende Detektion nachgewiesen werden. Der Name Western-Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik Edwin Southern zurück, der 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern-Blot eingeführt hat [37, 49, 103]. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von RNA-Fragmenten Northern-Blot und das Proteinblotting als Western-Blot bezeichnet. Das Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein (VASP) ist ein in vitro Substrat für die cAMP-abhängige (PKA) und die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) [29, 102]. VASP spielt unter anderem eine Rolle in der Regulation zytoskeletischer Dynamik und Zellmigration und besitzt drei identifizierte Phosphorylationsseiten, Serine157, Serine239 sowie Threonine278 [29, 114]. Serin239 (Ser239) ist die bevorzugte Seite für Phosphorylierung durch die PKG und wird mit der durch NO-vermittelten Wachstumsinhibition in Verbindung gesetzt [29, 58]. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, anti-VASP P-Ser239 (16C2) (1:2500) erfolgte über Nacht in 3% Milch/Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST). Anschließend wurde vierfach, jeweils fünf Minuten, mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, anti-mouse (1:5000) erfolgte für eine Stunde in 3% Milch/TBST mit anschließender vierfacher Waschung mit TBST für jeweils 5 Minuten. Für die zweite Versuchsreihe wurde als erster Antikörper anti-VASP (M4) Ser157 dephospho und phospho (1:2500) verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Nach vierfacher Waschung mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper anti-rabbit (1:5000).

Bestandteile	Volumen
Acrylamid-Bisacrylamid 30%	6,3ml
Trenngelpuffer (4 fach)	4,7ml
H ₂ O bidest	7,7ml
APS 10%	180μl
TEMED	18μl

Tabelle 3.9: Trenngel

Bestandteile	Volumen
Acrylamid- Bisacrylamid 30%	2,4ml
Staching buffer	4,0ml
H ₂ O bidest	9,3ml
APS 10%	180μl
TEMED	18μl

Tabelle 3.10: Sammelgel

Bestandteile	Menge [g]
SDS	2,0
Tris	90,82

Tabelle 3.11: Trenngelpuffer (vierfach), 500ml, pH 8,8

Bestandteile	Menge [g]
SDS	1,0
Tris	15,14

Tabelle 3.12: Sammelgelpuffer (zehnfach), 500ml, pH 6,8

Bestandteile	Konzentrationen [mM]
Tris	50
DTTx	5
PMSF	100

Tabelle 3.13: Zusammensetzung des Lysis-Puffers

Bestandteile	Menge
NaCl	0,15M
Tris	20mM
Tween 20	0,1%

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des TBST-Puffers, pH 7,6

Bestandteile	Menge
Tris	0,25M
Glycin	2M
SDS	1%

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Tank-Puffers

Bestandteile	Menge
Tris	25mM
Glycin	200mM
(V/V) Methanol	20%

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Western-Blot-Puffers, pH 8,5

3.11 Western-Blots zum Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren

Nachgewiesen wurden die β_3 -Untereinheiten des Integrins $\alpha_v\beta_3$ an Gefäßen mit und ohne Endothel. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelpuffer sowie des Tank-, des TBST- und des Western-Blot-Puffers entsprachen denen für die VASP-Western-Blots (Tab. 3.11, Tab. 3.12, Tab. 3.14, Tab. 3.15, Tab. 3.16). Das Blocken erfolgte über Nacht bei 4°C in 2% Advanced Blocking Agent (Amersham) und TBST. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, Integrin-beta-3 (c-20) (Santa Cruz Biotechnology) (1:500) erfolgte in 2% Advanced Blocking Agent (Amersham) und TBST über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde vierfach, jeweils fünf Minuten, mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, AK (donkey-anti-goat IgG, POD-konjugiert, 1:5000) erfolgte ebenfalls in 2% Advanced Blocking Agent (Amersham) und TBST über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit anschließender Waschung wie oben beschrieben.

Bestandteile	Menge
Acrylamid-Bisacrylamid (30%)	4,7ml
Trenngelpuffer (4x)	4,7ml
Aqua bidest	9,3ml
TEMED	18 μ l
APS (10%)	180 μ l

Tabelle 3.17: Zusammensetzung des Trenngels (7,5%) für zwei Gele

Bestandteile	Menge
Acrylamid-Bisacrylamid (30%)	2,4ml
Trenngelpuffer (4x)	4,0ml
Aqua bidest	9,3ml
TEMED	10 μ l
APS (10%)	150 μ l

Tabelle 3.18: Zusammensetzung des Sammelgels (4,5%)

4 Berechnung und Statistik

Die Amplituden der Aufzeichnungen der Organbadsversuche wurden in Millimetern ausgemessen und addiert, die Relaxationen hierzu prozentual angegeben. Die Ergebnisse aller Messungen sind in den Abbildungen als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Messdaten wurden computergestützt mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 3.0 und 4.0 ausgewertet und mit Two way ANOVA oder One way ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet [92].

Ein Sternchen (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an. Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in p angegeben, wobei $p < 0.05$ signifikant (*) und $p < 0.0001$ (***) extrem signifikant bedeutet.

5 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

5.1 Funktionstests

Die Änderungen der Gefäßquerschnitte wurden isotonisch über Spannungsaufnehmer aufgenommen und vom Drucker verstärkt aufgezeichnet. Dabei wurden die vom Vasotonus abhängenden Veränderungen in der Einheit Gramm aufgezeichnet und in Newton umgerechnet. Zur Auswertung wurde eine Nulllinie zwischen dem Tonus am Ende der Äquilibrationsphase, nach dem Nullabgleich, und dem stabilen Tonus am Ende des Versuches nach dem letzten Auswaschvorgang gezogen.

5.1.1 Kaliumchlorid

Die kumulative Zugabe von KCl führte zu einer fortgesetzten Kontraktion der Arterien, die bei 90mmol/l ihr Maximum erreichte. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führte zu keiner weiteren Tonussteigerung. Dargestellt sind die exemplarisch durchgeführten Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 5.1). Die in weiteren Versuchen zu Beginn einer jeden Versuchsreihe durchgeführte Überprüfung der Kontraktilität erfolgte durch zweifache Zugabe von 90mmol/l KCl unterbrochen durch einen Auswaschvorgang, um die Grundspannung wieder herzustellen. Nur Gefäße mit bestehender Kontraktilität wurden für die Versuchsreihen verwendet. Verglichen mit den Zungengefäßen zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Koronararterie einen deutlich flacheren Verlauf mit einem Maximum bei $91,9 \pm 7,03\text{mN}$ im Gegensatz zu $155,49 \pm 11,89\text{mN}$ bei den Zungengefäßen. Die Unterschiede im Kontraktionsverhalten der beiden Arterientypen sind signifikant bei einem Niveau von $p < 0.05$.

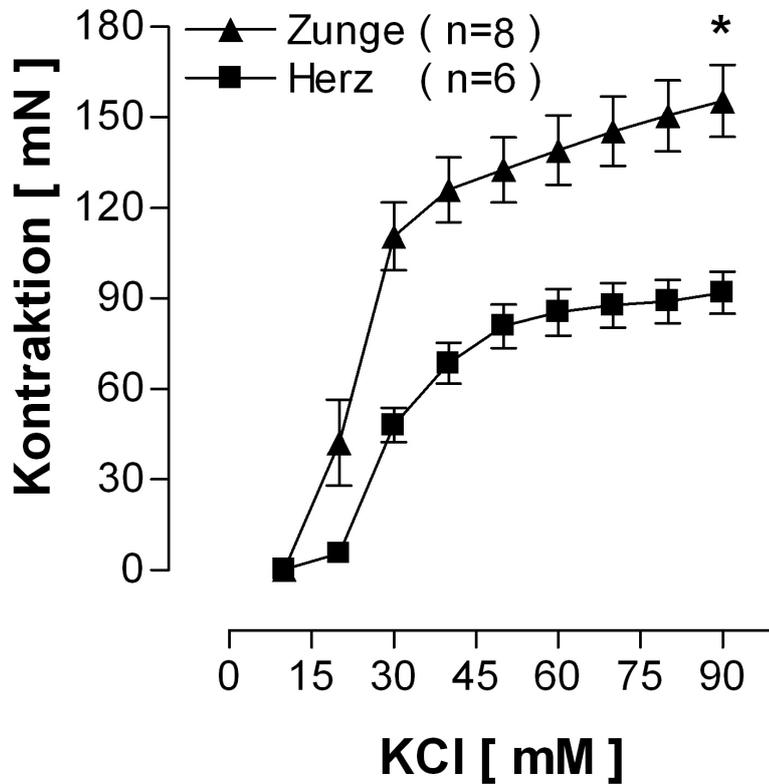


Abb. 5.1: Einfluss steigender K^+ -Konzentration auf die Kontraktionskraft isolierter Arterien vom Schwein. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen

5.1.2 Phenylephrin und Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Als Auslöser einer rezeptorabhängigen Vasokonstriktion wurde der α_1 -Agonist Phenylephrin (PE) untersucht. Die Stimulation erzeugte bei den Aa. lingualis eine starke, konzentrationsabhängige Vasokonstriktion, welche ab einer Konzentration von $10^{-7}M$ im Organbad begann. Das Maximum der Kontraktion von $133,6 \pm 7,79mN$ wurde bei einer Konzentration von $0,01mM$ Phenylephrin im Organbad gesehen (Abb. 5.2). Nach Erreichen des Maximums kam es zum Nachlassen der Kontraktion, eine weitere Erhöhung der Konzentration von Phenylephrin konnte dies nicht verhindern. Hierdurch bildete sich kein stabiles Plateau aus. Die Zugabe steigender Konzentrationen des α -Sympathomimetikums Phenylephrin zeigte keinen Effekt auf den Vasotonus der Koronararterie,

so dass die Vorkontraktionen für die einzelnen Dilationsversuche zur besseren Vergleichbarkeit mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ erfolgten. Hierbei zeigte sich eine deutlich stärkere Kontraktion der *A. lingualis dextra* mit einem Maximum von $159,33 \pm 12,23 \text{ mN}$ bei $0,1 \text{ mM}$ verglichen mit einem Maximum von $50,03 \pm 7,0 \text{ mN}$ bei den Koronargefäßen (Abb. 5.3). Dieser Unterschied war hochsignifikant auf einem Niveau von $p < 0.0001$. Bei den Koronararterien zeigte sich ein langsamer Anstieg der Kontraktion, wohingegen die Zungenarterien einen steilen Anstieg bei einer Konzentration von 10^{-5} M im Organbad aufwiesen.

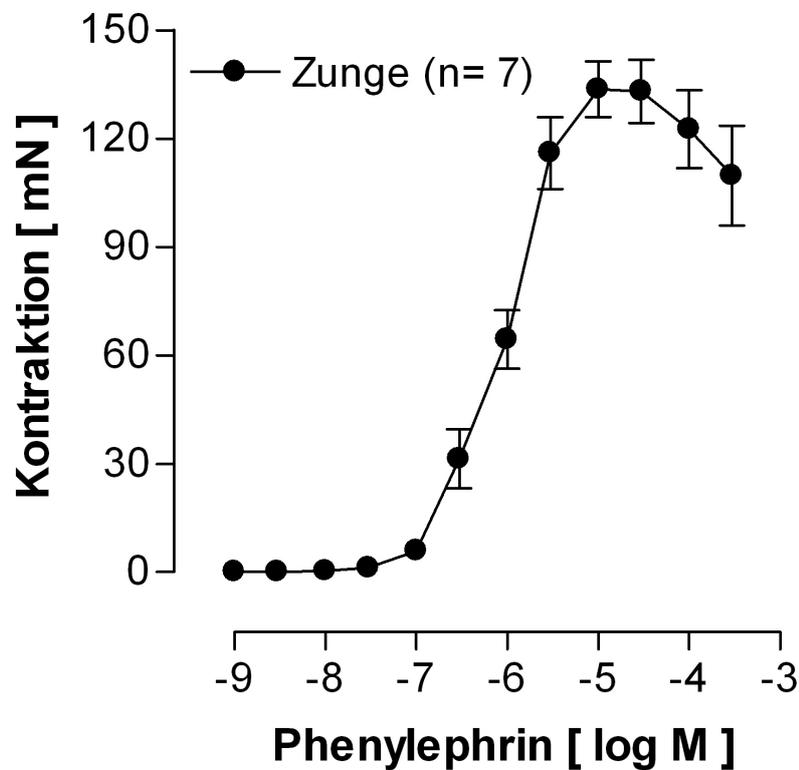


Abb. 5.2: Kontraktion durch Phenylephrin bei intaktem Endothel. Dargestellt sind die Mittelwerte der vaskulären Kraftentwicklung (\pm SEM), *A. lingualis dextra*

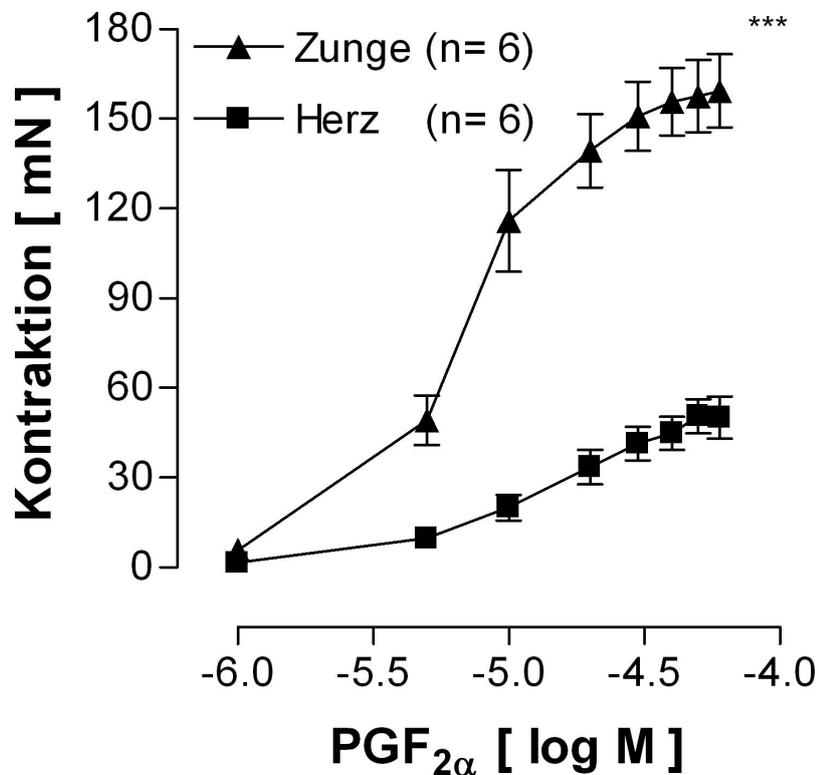


Abb. 5.3: Kontraktion durch PGF_{2α} bei intaktem Endothel. Dargestellt sind die Mittelwerte der vaskulären Kraftentwicklung (\pm SEM), A. lingualis dextra und A. coronaria dextra

Zur Vorkontraktion für die Dilationsversuche wurde eine Konzentration von $5\mu M$ PGF_{2α} im Organbad verwendet, da diese eine fünfundzwanzig- bis vierzigprozentige Kontraktion der beiden Arterientypen einstellte. Die submaximale Kontraktion blieb über vier Stunden stabil.

5.1.3 Acetylcholin und Substanz P

Die durch Acetylcholin bzw. durch Substanz P induzierte Gefäßrelaxation wurde nach Ausmessen jeweils prozentual zur Vorkontraktion angegeben. Die Vorkontraktion erfolgte bei den Aa. lingualis dextrae mit Phenylephrin ($0,2\mu M$) und bei den Aa. coronariae dextrae mittels PGF_{2α} ($8\mu M$).

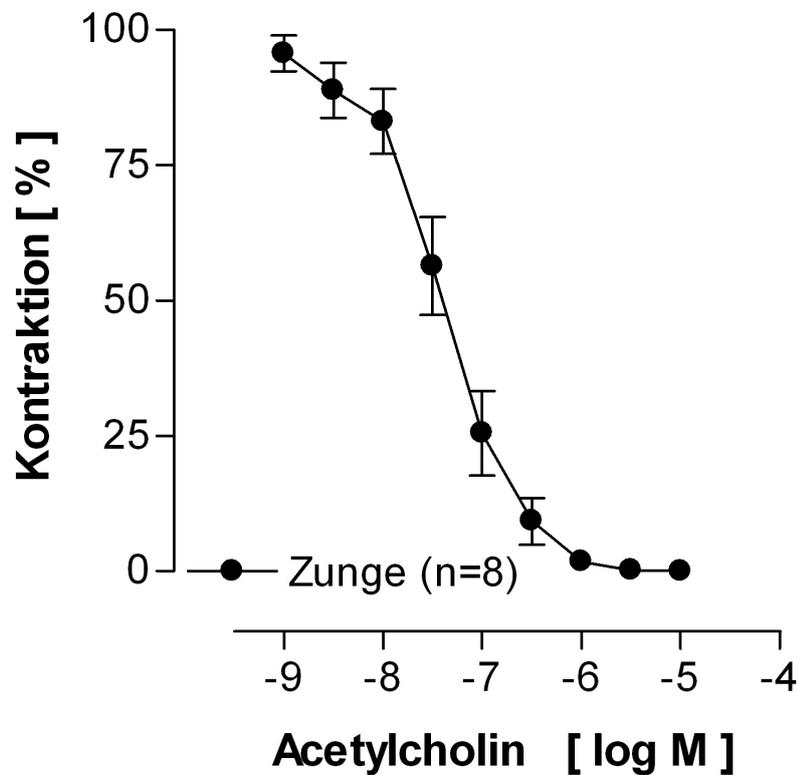
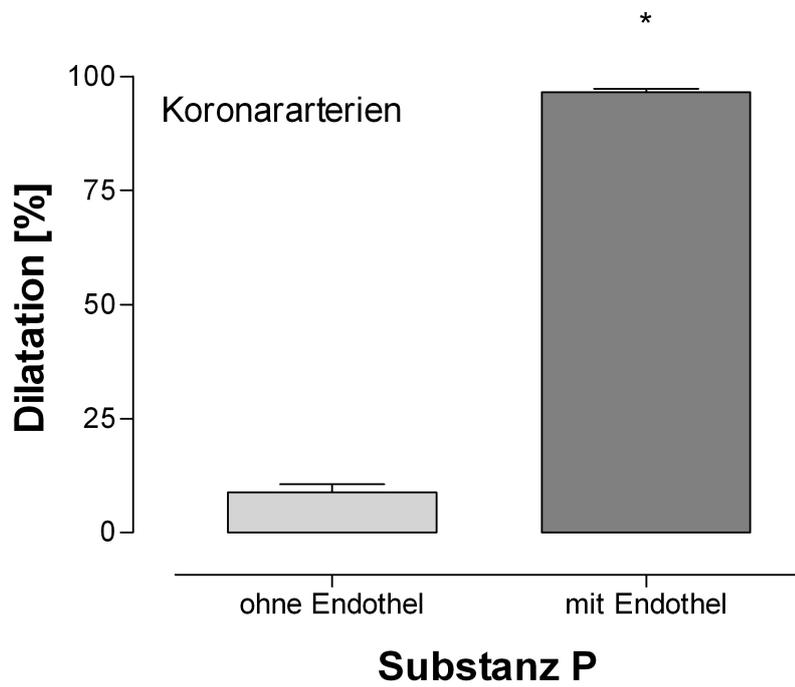
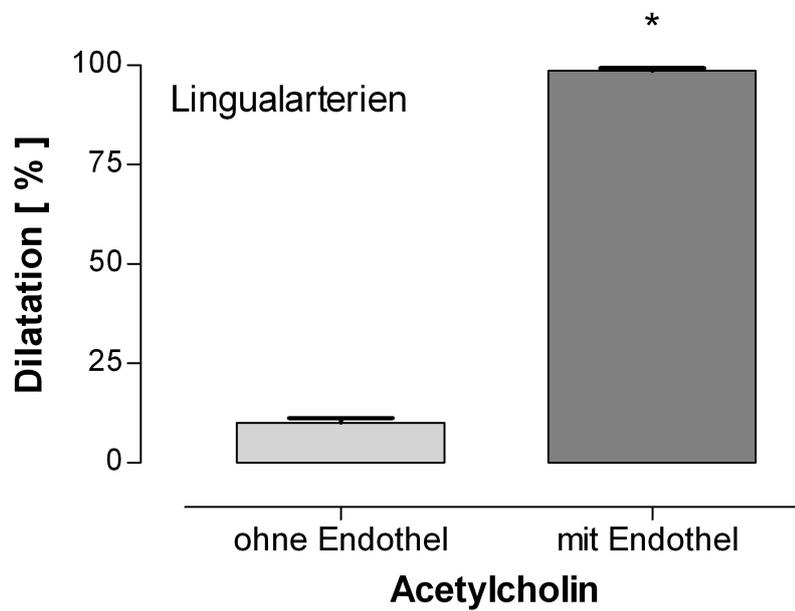


Abb. 5.4: Endothelabhängige Relaxation in Zungenarterien mit intaktem Endothel. Die Relaxationen sind dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch Phenylephrin ausgelösten Vasotonus. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen

Nach Applikation führten sowohl Acetylcholin als auch Substanz P unmittelbar zu einer signifikanten Erweiterung der Gefäße (Abb. 5.4). Die Arterien dilatierten bei den Konzentrations-Wirkungs-Versuchen im Mittel um ein Maximum von 100% der Dilationskapazität. Für die Endotheltests wurde nach Vorkontraktion eine Konzentration von $3nM$ Substanz P bzw. $10\mu M$ Acetylcholin im Organbad verwendet. Nur Gefäße mit annähernd hundertprozentiger Dilation wurden für die Versuche mit intaktem Endothel verwendet. Für die Versuche mit zerstörtem Endothel wurden nur solche Gefäße verwendet, deren Kontraktion nach Zugabe von Substanz P beziehungsweise Acetylcholin noch mindestens 80% der Vorkontraktion betrug (Abb. 5.5(a), 5.5(b)).



(a) Koronararterien mit und ohne Endothel



(b) Lingualarterien mit und ohne Endothel

Abb. 5.5: Ergebnisse der durchgeführten Endothelteste

5.1.4 Bradykinin

Die Versuche mit Bradykinin erfolgten ohne Zugabe von Diclofenac in den Puffer und nach Vorkontraktion mit $5\mu M$ $PGF_{2\alpha}$. Bradykinin führte zu einer dosisabhängigen Dilatation, welche bei einer Konzentration von $30nM$ im Organbad deutlich anstieg. Die Zugabe von $1\mu M$ Bradykinin im Organbad führte zu einer maximalen Dilatation auf $18,33 \pm 3,91\%$ der Vorkontraktion bei den Koronararterien und auf $14,68 \pm 6,29\%$ bei den Zungengefäßen (Abb. 5.6). Hier gab es keinen signifikanten Unterschied in der Reaktion der beiden verwendeten Gefäßtypen.

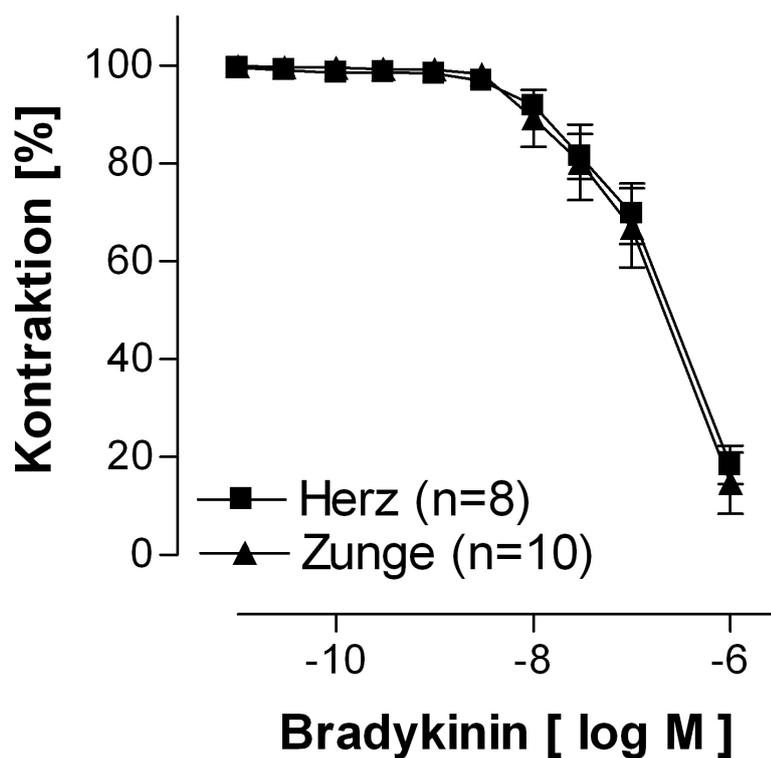


Abb. 5.6: Endothelabhängige Relaxation in Zungenarterien und Koronararterien mit intaktem Endothel. Die Relaxationen sind dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch $PGF_{2\alpha}$ ausgelösten Vasotonus. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen

5.1.5 Fibrinogen

Entschäumer

Sab simplex zeigte in der zur Entschäumung benötigten Konzentration einen dilativen Effekt, vermutlich hervorgerufen durch die weiteren Inhaltsstoffe (Abb. 5.7).

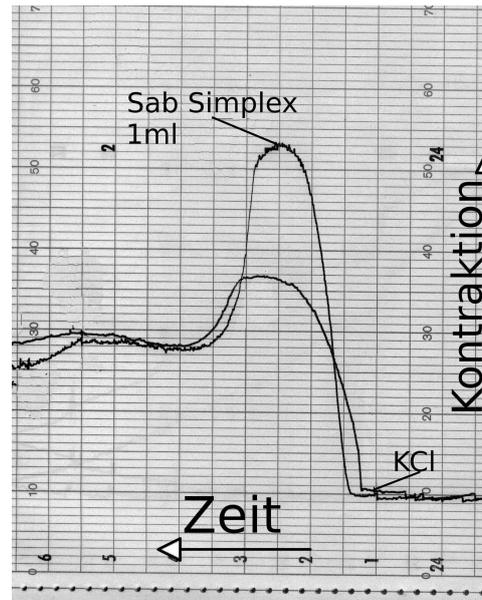


Abb. 5.7: Wirkung von Sab simplex auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung

Antifoam A und Tween 20 zeigten keine eigene Wirkung auf das Gefäßsystem (Abb. 5.8), brachten jedoch keinen ausreichenden entschäumenden Effekt, ebenso die Tenside F68, F87, F108 und F127 allein. Dimethicon zeigte zwar die gewünschte entschäumende Wirkung, doch kam es gehäuft zur Ausbildung eines größeren Tropfens im Organbad. Dieser lagerte sich an dem Gefäßsegment an und machte damit die weitere Versuchsdurchführung unmöglich. Die Zugabe von DMSO ergab in Konzentrationen, welche nicht zu einer Beeinflussung des Vasotonus führten, keine ausreichende entschäumende Wirkung und zeigte bei höheren Konzentrationen eine deutliche Beeinflussung des Vasotonus (Abb. 5.9). Durch die Kombination des Antischaum-Mittels F68 ($0,8\text{mg/ml}$) und Dimethicon ($12\mu\text{M}$) wurde ein ausreichend entschäumender Effekt ohne Beeinflussung des Arterientonus erreicht. Durch die Mischung vor Zugabe ins Organbad konnte die Ausbildung eines größeren Tropfens durch Dimethicon verhindert werden.

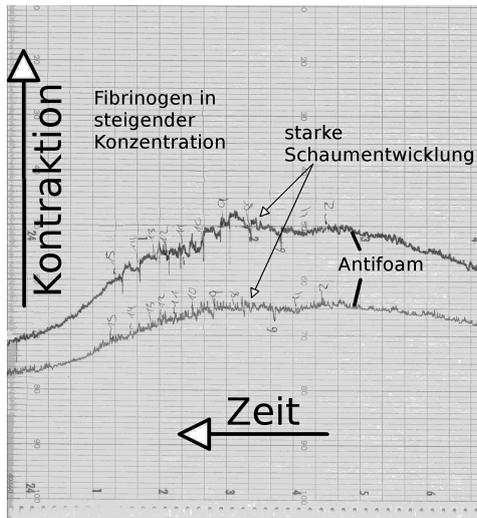


Abb. 5.8: Zugabe von Antifoam auf das vorkontrahierte Gefäß und anschließende Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Fibrinogen. Starke Schaumentwicklung, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung

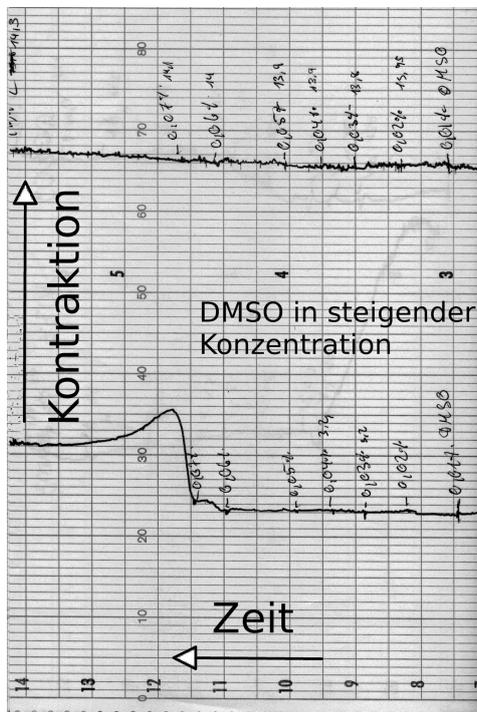


Abb. 5.9: Zugabe von DMSO auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung

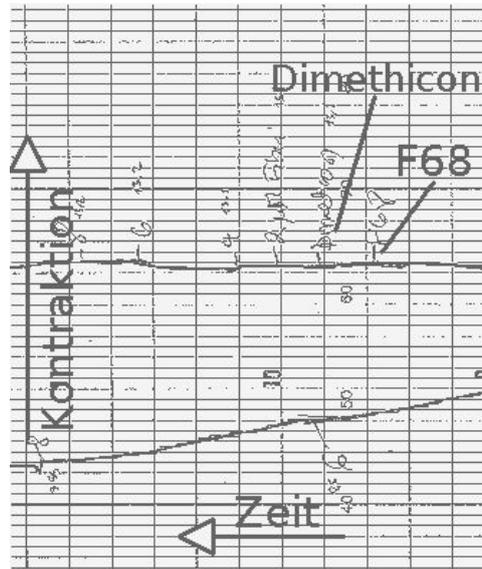


Abb. 5.10: Zugabe von Dimeticon und F68 auf das vorkontrahierte Gefäß, Schreiber-
aufzeichnung während der Untersuchung

Fibrinogen

Fibrinogen führte in steigenden Dosen zu keiner Beeinflussung des Basaltonus der Gefäße (Abb. 5.11). Bei kumulativer Zugabe von Fibrinogen bis zu einer maximalen Konzentration von $15\mu M$ im Organbad zeigte sich in der Reaktion der beiden verschiedenen Arterientypen nach Vorkontraktion ein signifikanter Unterschied. Während die durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ bedingte Kontraktion bei den Zungengefäßen weitgehend konstant blieb, kam es bei den Koronargefäßen zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation. Diese setzte bereits im physiologischen Bereich ($180 - 350mg/dl$) ein und war im supra-physiologischen Bereich ($350 - 400mg/dl$) besonders stark ausgeprägt (Abb. 5.12–5.14).

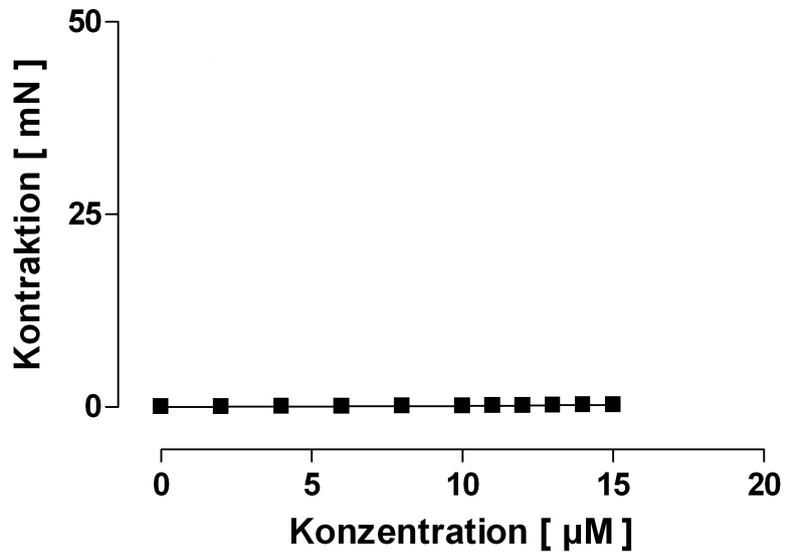


Abb. 5.11: Wirkung von Fibrinogen auf den Basaltonus (\pm SEM), Lingual- und Koronararterien

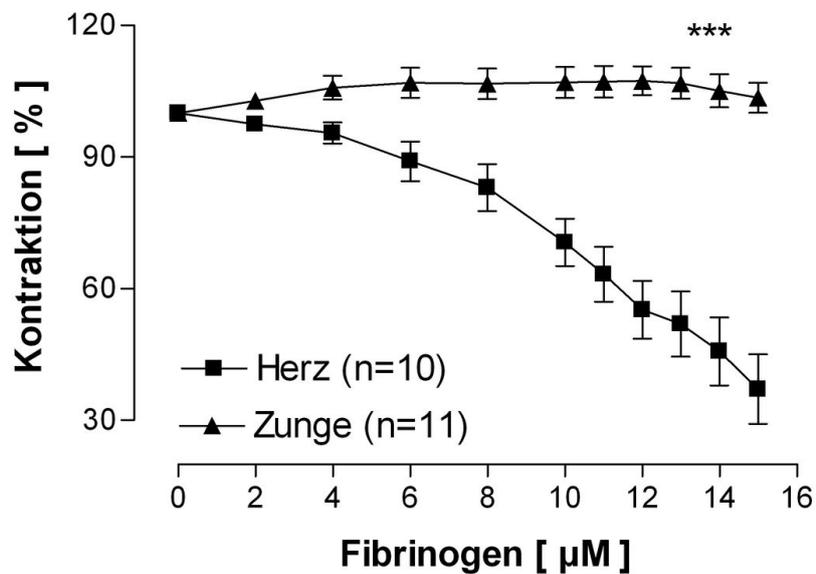


Abb. 5.12: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Zungen- und Koronararterien mit intaktem Endothel. Die Relaxation ist dargestellt als prozentuale Restkontraktion der Gefäßringe bezogen auf den durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Vasotonus. Die Mittelwerte (\pm SEM) sind nach kumulativer Gabe von Fibrinogen für alle Konzentrationen dargestellt

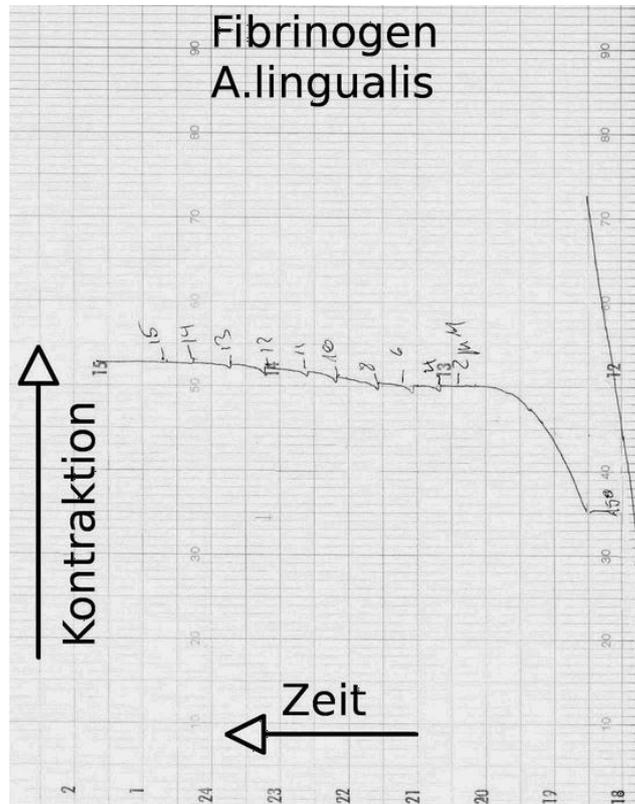


Abb. 5.13: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Zungenarterien mit intaktem Endothel, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung

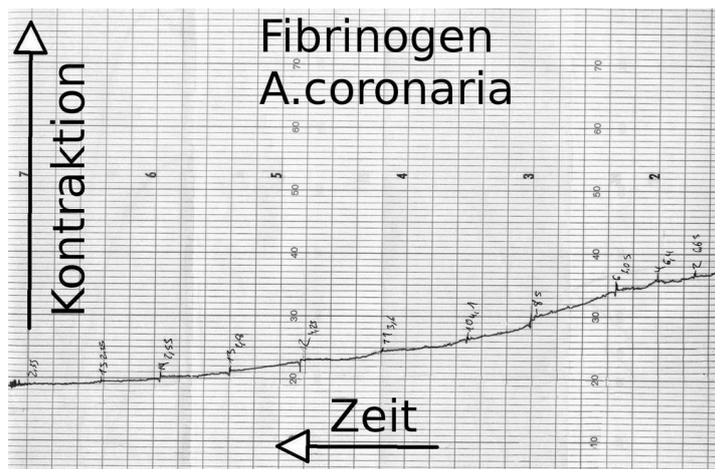


Abb. 5.14: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Koronararterien mit intaktem Endothel, Schreiberaufzeichnung während der Untersuchung

Bei der zur Abklärung des zugrunde liegenden Mechanismus erfolgten Versuchsreihe mit mechanisch zerstörtem Endothel zeigte sich bei den Zungengefäßen keine signifikante Beeinflussung. Bei den Koronararterien war eine signifikante ($p < 0.05$) Abnahme der Fibrinogen-medierten Relaxation besonders im physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationsbereich fest zu stellen. Das Maximum der Relaxation wurde von $42,35 \pm 8,91\%$ der Vorkontraktion bei intaktem Endothel auf $67,61 \pm 7,81\%$ bei zerstörtem Endothel verschoben (Abb. 5.15, 5.16).

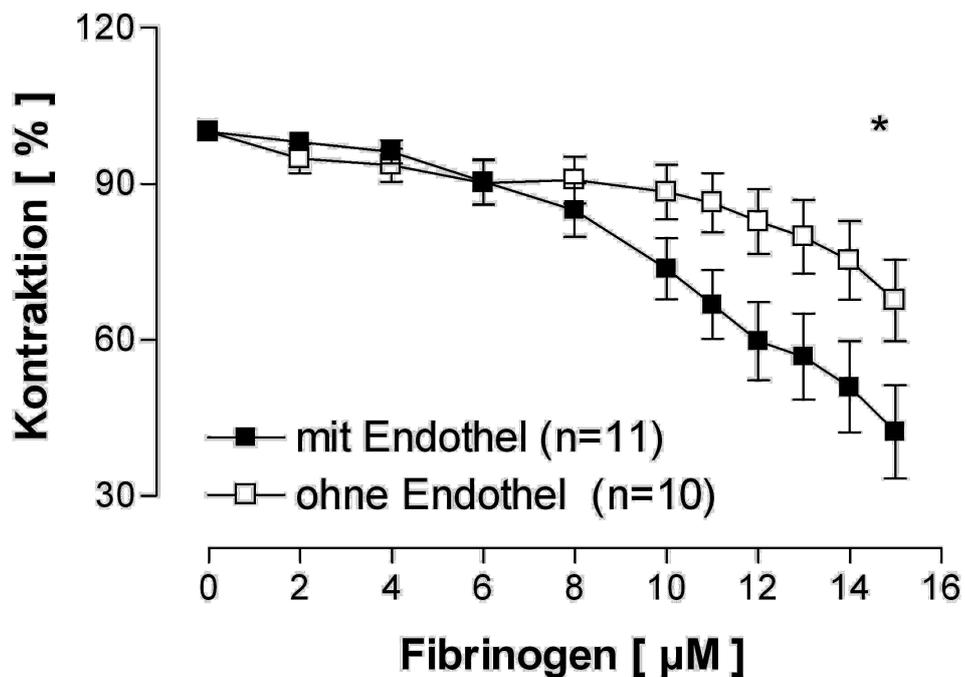


Abb. 5.15: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Koronararterien mit zerstörtem Endothel (\pm SEM), Kontrolle mit Endothel

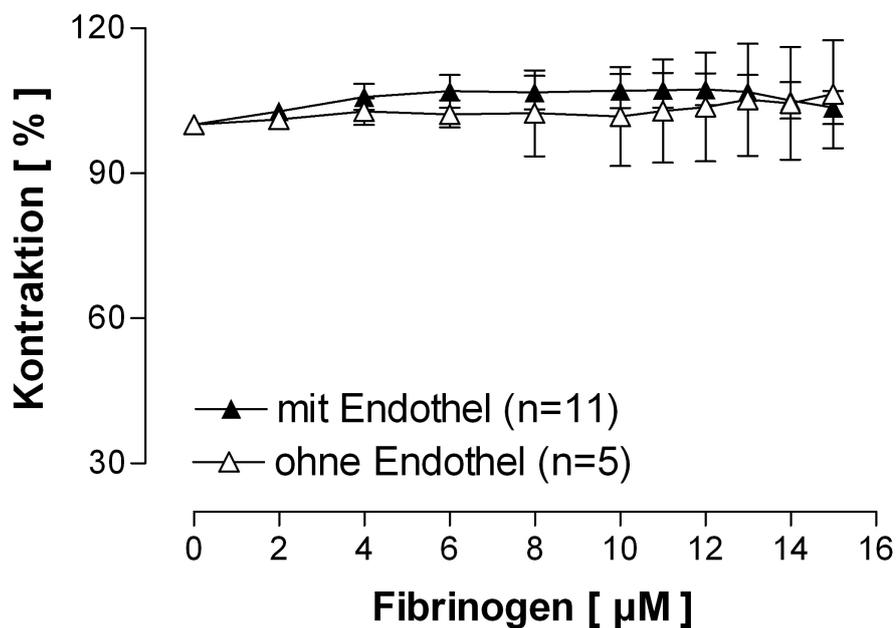


Abb. 5.16: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Zungenarterie mit zerstörtem Endothel (\pm SEM), Kontrolle mit Endothel

N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester

N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) ist ein irreversibler Inhibitor der konstitutiven NO-Synthase sowie ein reversibler Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase. Die Seitenäste der Koronargefäße zeigten bei Blockierung der Stickstoffmonoxid-Synthase durch L-NAME bei hohen Fibrinogen-Konzentrationen eine geringe, nicht signifikante Reduktion des Maximums der Vasodilation von $57,65 \pm 8,91\%$ auf $47,95 \pm 4,81\%$ der Vorkontraktion (Abb. 5.17). Die porcinen Zungengefäße wiesen eine leichte, nicht signifikante Erniedrigung des Vasotonus um $9,47\%$ der Vorkontraktion auf (Abb. 5.18).

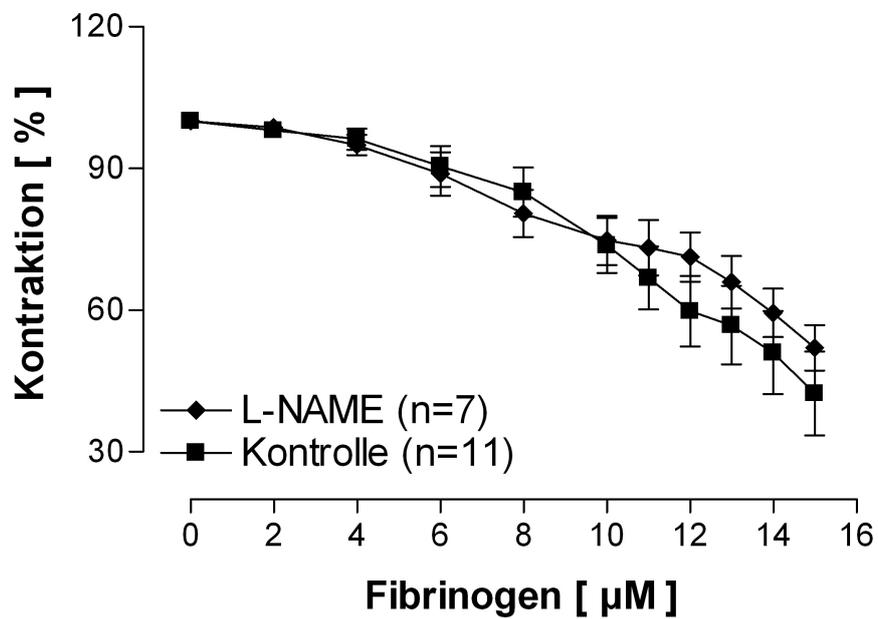


Abb. 5.17: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit L-NAME (\pm SEM)

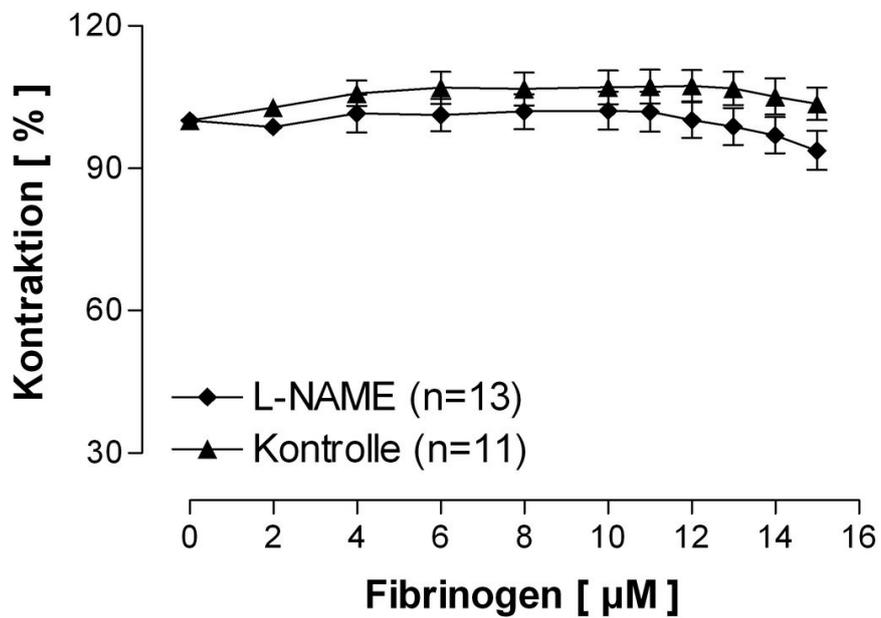


Abb. 5.18: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit L-NAME (\pm SEM)

Glibenclamid

Die Blockierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle durch Glibenclamid führte zu einer signifikanten Reduktion der fibrinogenbedingten Vasodilation ($p < 0.05$). Durch Zugabe von $100\mu M$ Glibenclamid zeigte sich bei den Koronargefäßen eine verzögerte Relaxation mit einer Verschiebung in den supraphysiologischen Bereich. Die Relaxation setzte hier erst bei einer Konzentration von über $10\mu M$ Fibrinogen im Organbad ein. Der größte Unterschied war bei $12\mu M$ Fibrinogen zu erkennen (Koronararterien: $59,76 \pm 7,51\%$, Lingualis: $90,10 \pm 9,51\%$ der Vorkontraktion). Im weiteren Versuch kam es bei den Koronararterien zu einer Annäherung der Kurven mit und ohne Vorinkubation mit Glibenclamid bis zur Endkonzentration von $15\mu M$ Fibrinogen im Organbad (Koronararterien mit Glibenclamid: $42,35 \pm 8,91\%$, ohne Glibenclamid: $53,54 \pm 6,97\%$ der Vorkontraktion, Abb. 5.19).

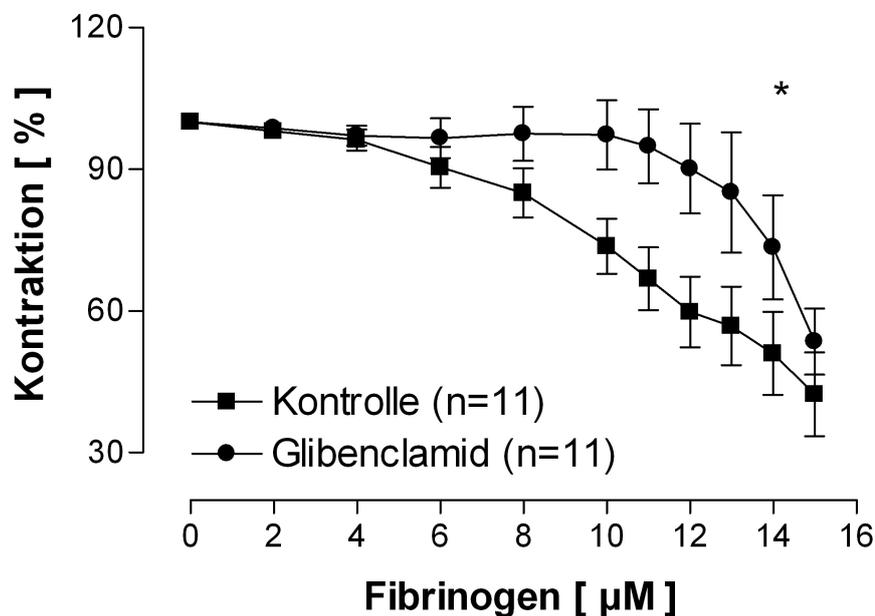


Abb. 5.19: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Glibenclamid (\pm SEM)

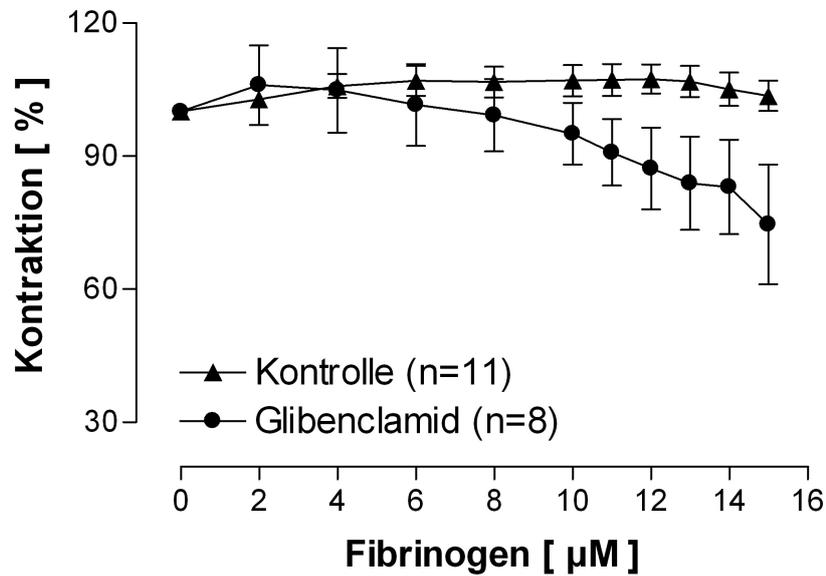


Abb. 5.20: Wirkung von Fibrinogen auf isolierte porcine Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Glibenclamid (\pm SEM)

Dosis-Wirkungs-Kurve von Bradykinin nach Vorinkubation mit Fibrinogen

Eine einstündige Inkubation mit Fibrinogen führte zu einer Linksverschiebung der anschließend durchgeführten Bradykinin Dosis-Wirkungs-Kurve. Die dosisabhängige Bradykininwirkung nach Vorinkubation der Gefäße mit Fibrinogen zeigt eine signifikante Verstärkung der vasodilatativen Eigenschaften des Bradykinins (Abb. 5.21) auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.0001$. Bei den aus der Zunge isolierten Gefäßen zeigte sich keine Beeinflussung der DWK durch Vorinkubation mit Fibrinogen (Abb. 5.22).

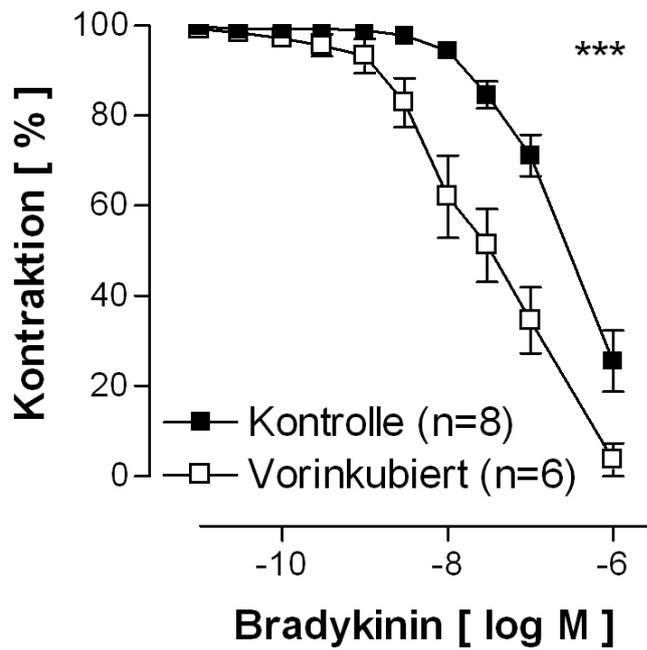


Abb. 5.21: Wirkung von Bradykinin auf isolierte porcine Koronararterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Fibrinogen (\pm SEM)

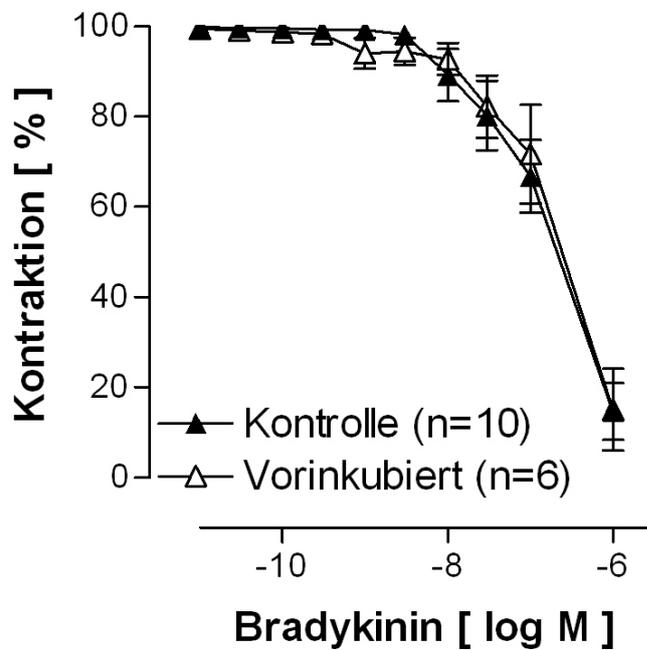


Abb. 5.22: Wirkung von Bradykinin auf isolierte porcine Lingualarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit Fibrinogen (\pm SEM)

Moexipril

Vorinkubation mit Moexipril führte zu einer signifikanten ($p < 0.0001$) Verstärkung der Bradykinin-vermittelten Vasodilation. Das Maximum der Bradykinin-vermittelten Dilation lag bei $29,54 \pm 8,16\%$ der Vorkontraktion bei einer Konzentration von $10^{-6}M$ im Organbad. Durch Vorinkubation wurde der Maximaleffekt bei dieser Konzentration auf $2,04 \pm 1,58\%$ der Vorkontraktion verschoben. Eine zusätzliche Inkubation mit $15\mu M$ Fibrinogen führte zu keiner weiteren Steigerung der Wirkung von Bradykinin (Abb. 5.23).

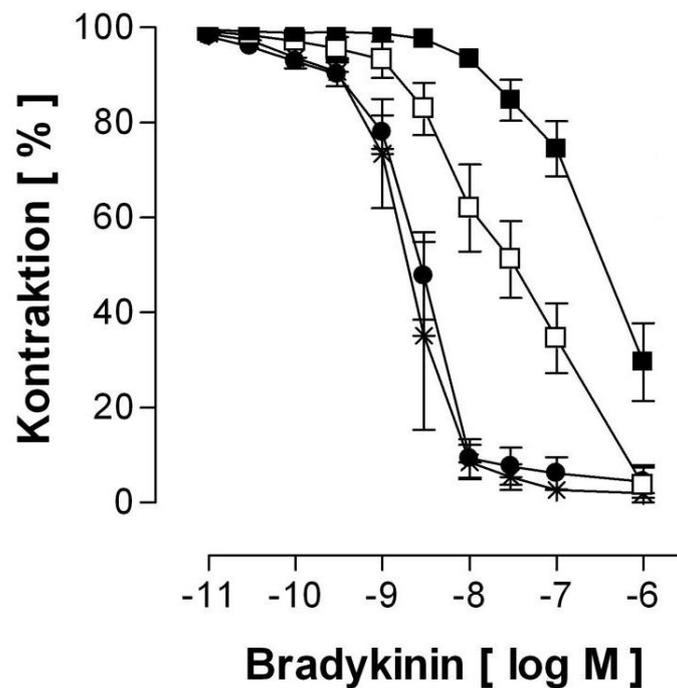


Abb. 5.23: Effekt von Moexipril auf die vasodilatatorische Wirkung von Bradykinin an isolierten porvinen Koronararterien mit intaktem Endothel (\pm SEM, ■ Vehikel, * Moexipril, $p < 0.0001$). Der Effekt von Moexipril ließ sich nach einer einstündigen Vorbehandlung mit Fibrinogen ($15\mu M$) ebenfalls noch nachweisen (□ Fibrinogen, ● Fibrinogen/Moexipril).

5.2 Vasodilator stimulierte Phosphoprotein-Western-Blots

Vor Durchführung der VASP-Western-Blots wurde eine Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Abb. 5.24). Zur Bestätigung der funktionellen Daten und zur Untersuchung, ob die eNOS-abhängige Aktivierung der vaskulären, löslichen Guanylyl-Cyclase durch Bradykinin einer Potenzierung durch bovines Fibrinogen unterliegt, wurden VASP-Western-Blots von Koronargefäßen nach einstündiger Vorinkubation mit bzw. ohne Fibrinogen und anschließender Zugabe von Bradykinin durchgeführt. Es zeigte sich bei Vorinkubation mit Fibrinogen eine verstärkte Phosphorylierung von Ser239 ($p < 0.05$, Abb. 5.25), einem Substrat der Proteinkinase G, während gleichzeitiges Messen der „total VASP“ vergleichbare Ergebnisse nach Vorinkubation mit und ohne Fibrinogen zeigte (Abb. 5.26(a), Abb. 5.26(b)).

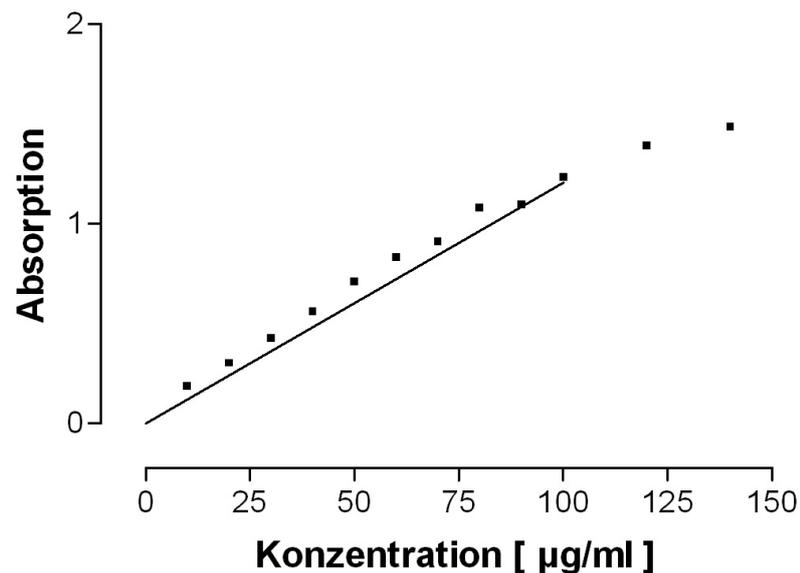


Abb. 5.24: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford

Die NO-abhängige Ser239 Phosphorylierung ohne Fibrinogen wurde als Kontrolle durchgeführt und die Ergebnisse als 100% gesetzt. Nach Inkubation mit Fibrinogen stieg die Phosphorylierung von Ser239 auf $183 \pm 31,01\%$. Bei der Messung der Phosphorylierung von Ser157 wurde ebenfalls die Inkubation ohne Fibrinogen als Kontrolle durchgeführt und die Ergebnisse als 100% gesetzt. Nach Inkubation mit Fibrinogen kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung ($104,52 \pm 8,82\%$).

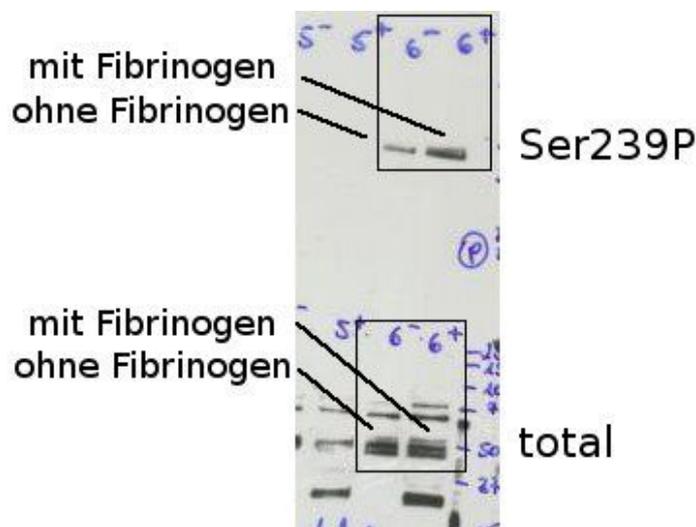
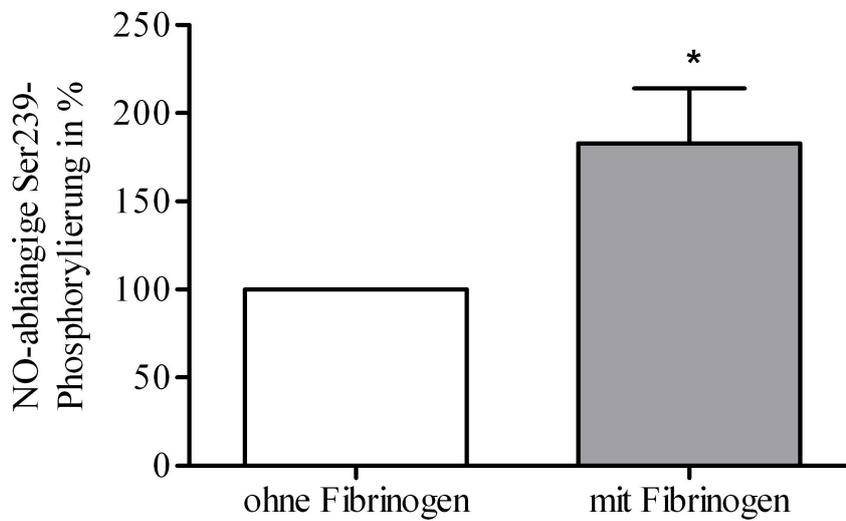
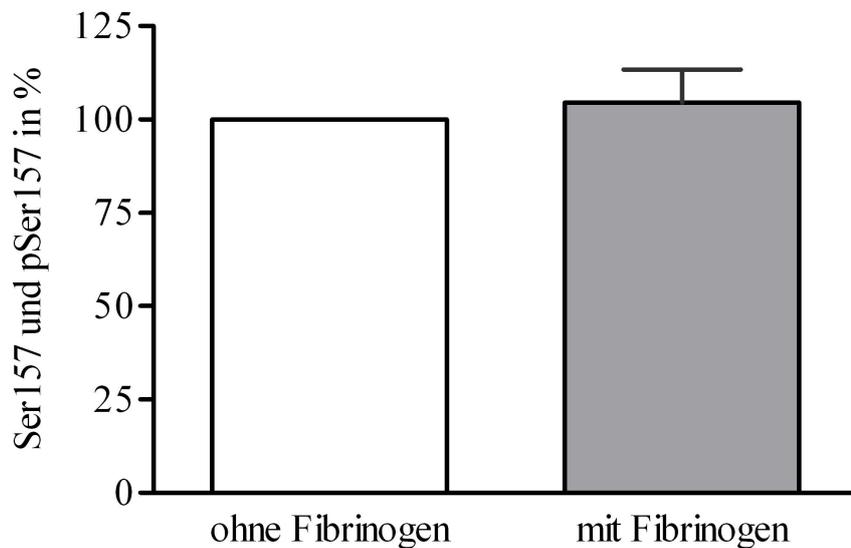


Abb. 5.25: VASP-Westernblot nach einstündiger Vorinkubation mit/ohne Fibrinogen und anschließender Zugabe von Bradykinin. Die Markierungen zeigen die Ergebnisse der Proben 6⁻ (ohne Fibrinogen) und 6⁺ (mit Fibrinogen). Die Untersuchung erfolgte an isolierten porvinen Koronararterien



(a) Einfluss von Fibrinogen auf die NO-abhängige Bradykinin-vermittelte Ser239 Phosphorylierung. VASP-Western-Blots nach Vorinkubation mit $15\mu M$ Fibrinogen und anschließender Zugabe von $0,1nM$ Bradykinin. Ergebnisse der Kontrolle ohne Fibrinogen wurden als 100% gesetzt



(b) Einfluss von Fibrinogen auf die Ser157 Phosphorylierung durch Bradykinin. VASP-Western-Blots nach Vorinkubation mit $15\mu M$ Fibrinogen und anschließender Zugabe von $0,1nM$ Bradykinin. Ergebnisse der Kontrolle ohne Fibrinogen wurden als 100% gesetzt

Abb. 5.26: Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin-vermittelte Phosphorylierung von Ser239. Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein-Western-Blots nach Inkubation mit bzw. ohne Fibrinogen. Zur Kontrolle wurden VASP-Western-Blots zur Überprüfung der Phosphorylierung der Seite Ser157 durchgeführt

5.3 Histologische Bilder

Die angefertigten histologischen Bilder wurden 40 bis 200 fach vergrößert abgebildet. Betrachtet man den histologischen Querschnitt beider Gefäßsegmente, erkennt man die stark ausgeprägte Muskelschicht der Zungenarterien (Abb. 5.27–5.29). Die aus den Herzen isolierten Arterien zeigten eine deutlich schwächer ausgeprägte Muskelschicht (Abb. 5.30–5.32).

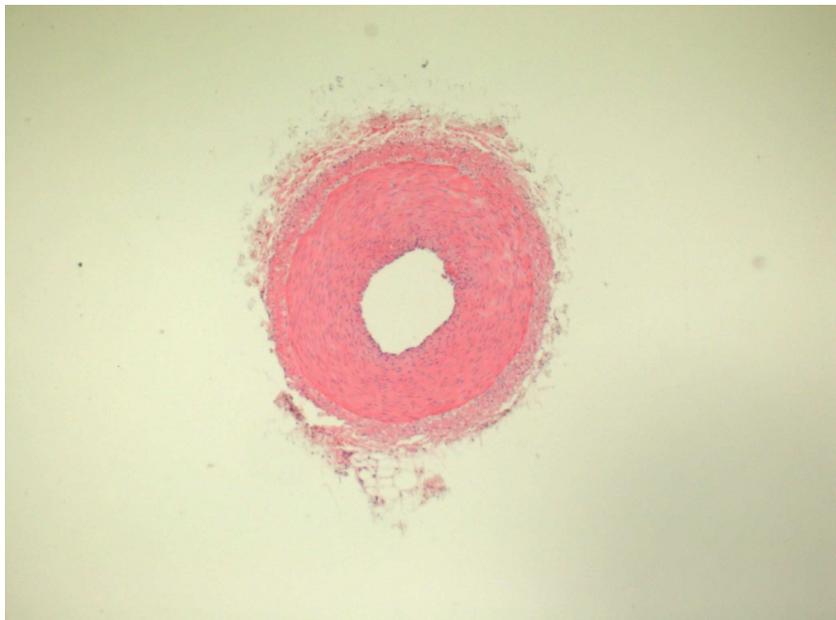


Abb. 5.27: A. lingualis, 40 fache Vergrößerung

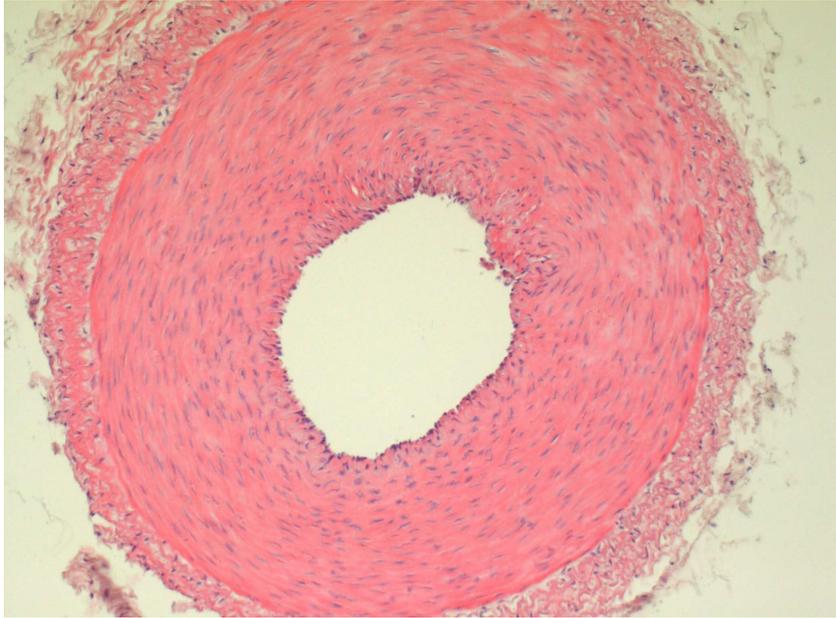


Abb. 5.28: *A. lingualis*, 100 fache Vergrößerung

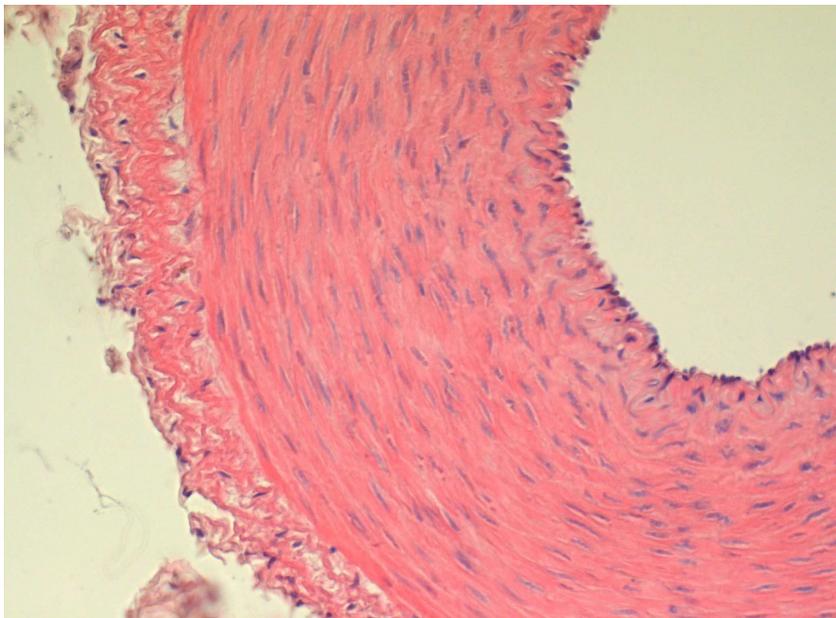


Abb. 5.29: *A. lingualis*, 200 fache Vergrößerung

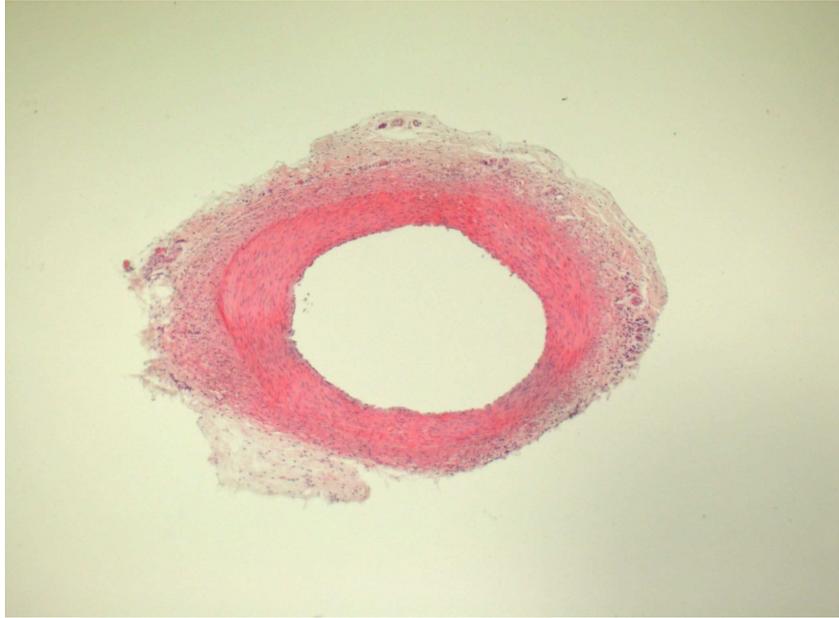


Abb. 5.30: Seitenast der Koronararterie, 40 fache Vergrößerung

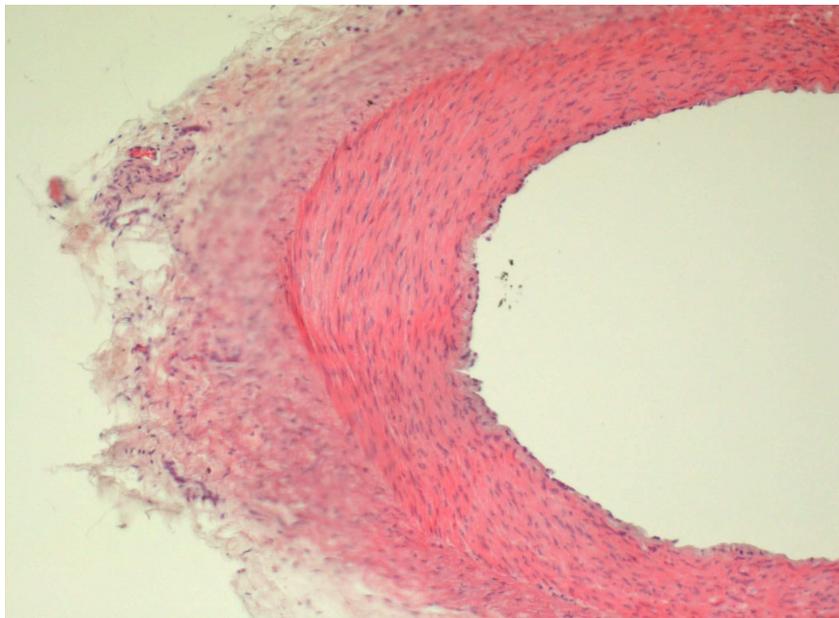


Abb. 5.31: Seitenast der Koronararterie, 100 fache Vergrößerung

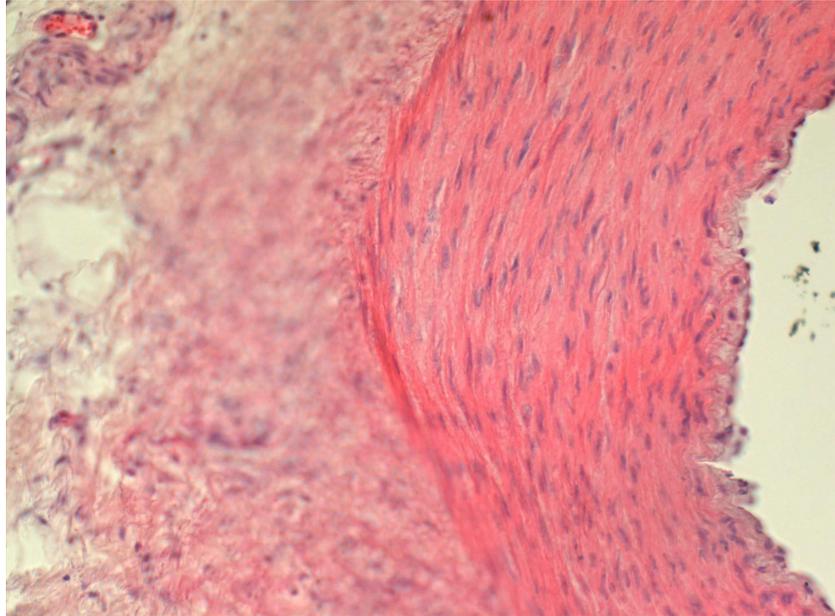


Abb. 5.32: Seitenast der Koronararterie, 200 fache Vergrößerung

5.4 Immunhistochemie

Die Mediadicke der Arterienringe wurde mit und ohne Vorinkubation mit Fibrinogen gemessen (Abb. 5.34–5.37). Bei den Segmenten der A. coronaria dextra zeigte sich eine signifikante Steigerung der Mediadicke nach Vorinkubation mit Fibrinogen ($p < 0.001$). Die aus den Zungen isolierten Arteriensegmente zeigten hingegen vor Inkubation eine signifikant dickere Media als nach Inkubation mit Fibrinogen. Die Unterschiede sind somit zwar hochsignifikant, verlaufen aber in entgegengesetzte Richtungen (Abb. 5.33).

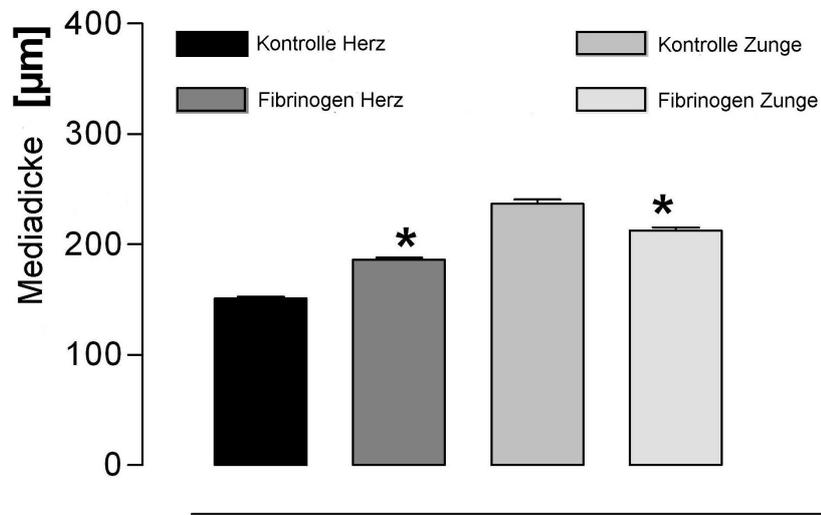


Abb. 5.33: Mediadicke der isolierten Koronar- und Zungenarterien mit intaktem Endothel nach Vorinkubation mit und ohne Fibrinogen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), One way ANOVA, $p < 0.01$

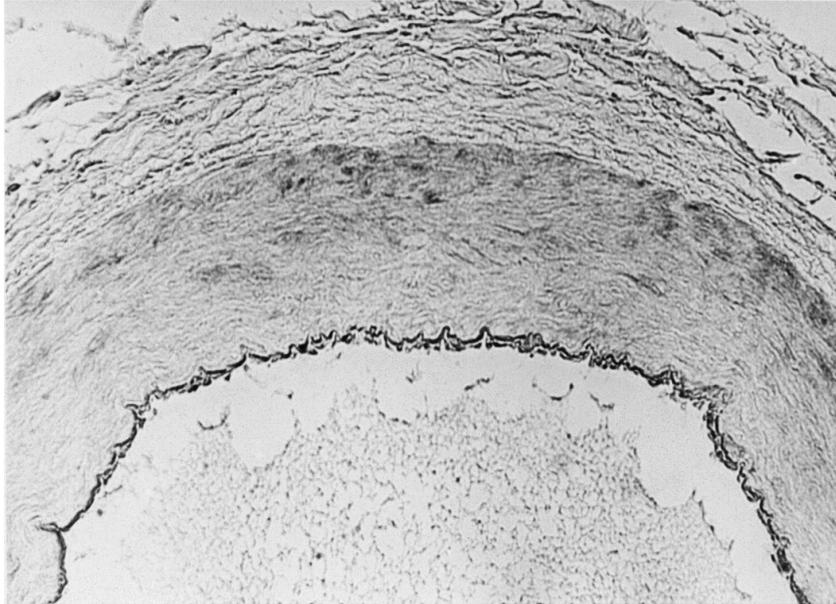


Abb. 5.34: Immunhistochemische Aufnahme, Seitenast der A. coronaria dextra nach Inkubation mit Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]

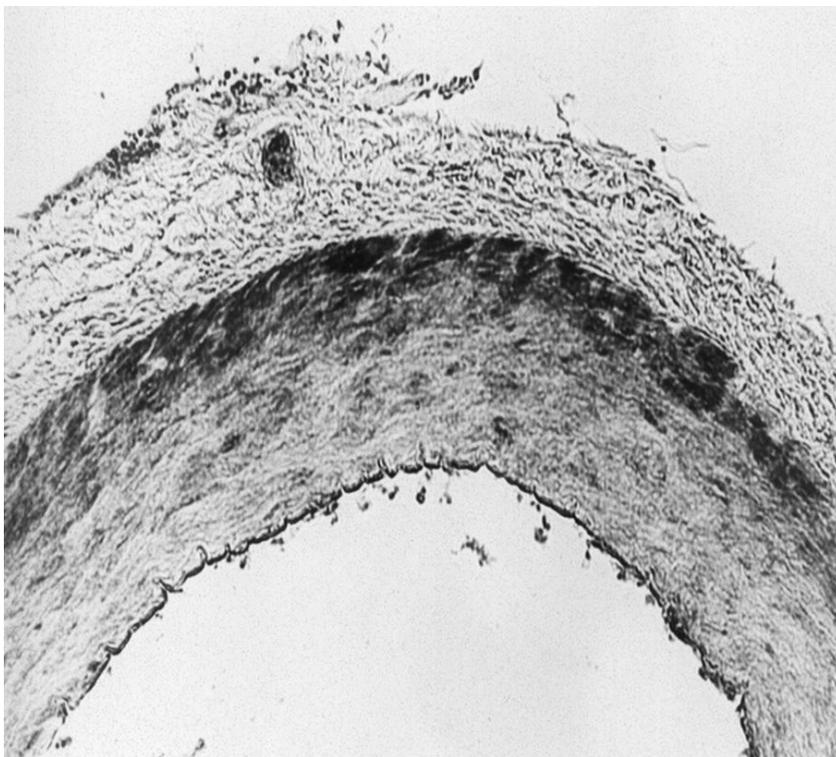


Abb. 5.35: Immunhistochemische Aufnahme, Seitenast der A. coronaria dextra nach Inkubation ohne Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]

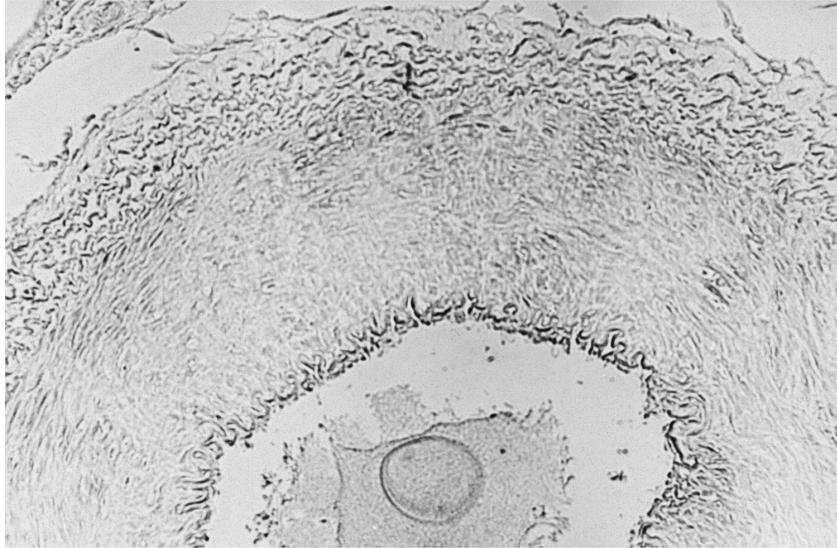


Abb. 5.36: Immunhistochemische Darstellung der *A. lingualis dextra* nach Inkubation mit Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]

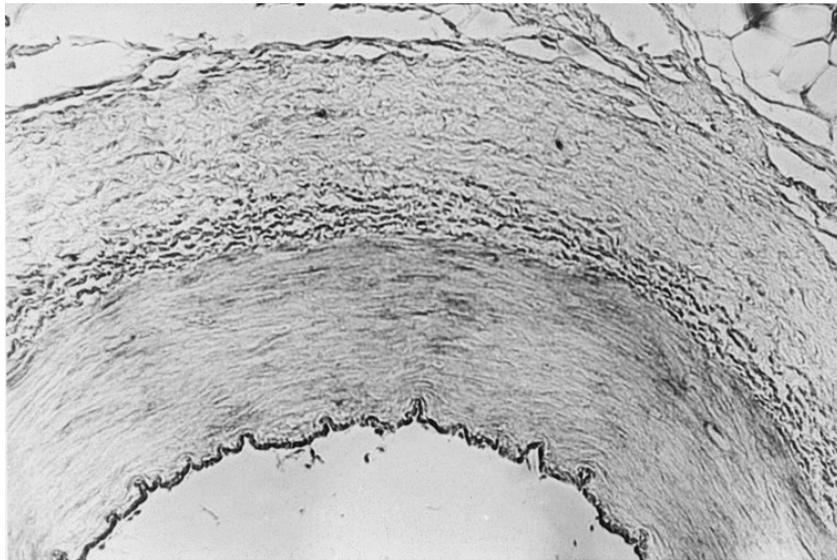


Abb. 5.37: Immunhistochemische Darstellung der *A. lingualis dextra* nach Inkubation ohne Fibrinogen, 220 fache Vergrößerung. Angefertigt durch [1]

5.5 Integrinexpression

Zur Darstellung der Expression der β_3 -Untereinheit wurden Western-Blots angefertigt. Die Ergebnisse für die Koronararterien wurden als 100% gesetzt. Hierbei zeigten sich signifikante ($p < 0.01$) Unterschiede bei den beiden verwendeten Arterientypen. Bei den Zungengefäßen betrug die Expression $57,02 \pm 21,39\%$ (Abb. 5.38). Dieser Unterschied war auch nach Zerstörung des Endothels signifikant ($p < 0.01$, Abb. 5.39). Eine Endothelabhängigkeit konnte auch im direkten Vergleich der Arterientypen mit und ohne Endothel nicht nachgewiesen werden.



Abb. 5.38: Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra und der A. coronaria dextra, Ergebnisse der Koronarien sind als 100% gesetzt, $p < 0.01$

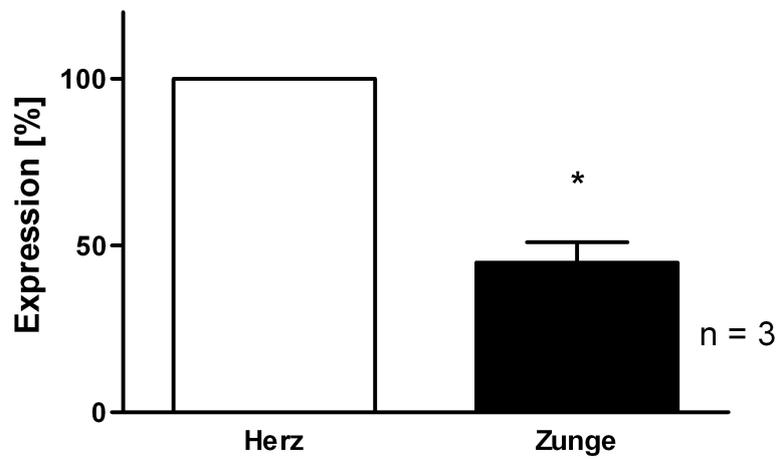


Abb. 5.39: Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra und der A. coronaria dextra bei mechanisch zerstörtem Endothel, Ergebnisse der Koronarien sind als 100% gesetzt, $p < 0.01$

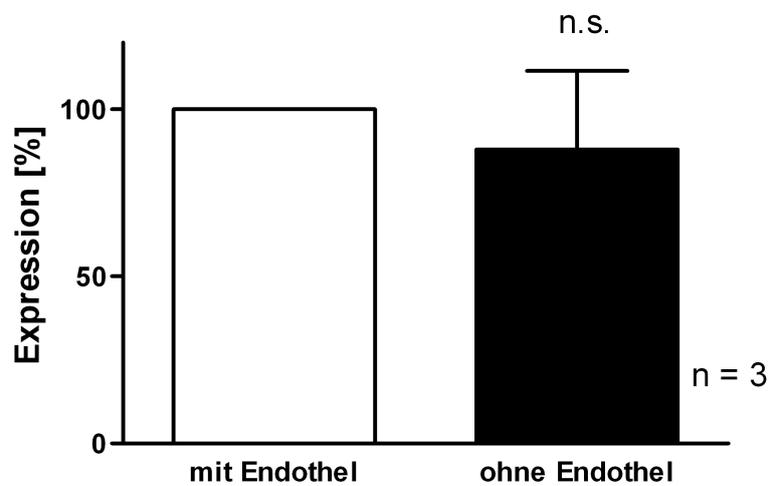


Abb. 5.40: Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Segmenten der A. lingualis dextra mit und ohne Endothel, n.s.

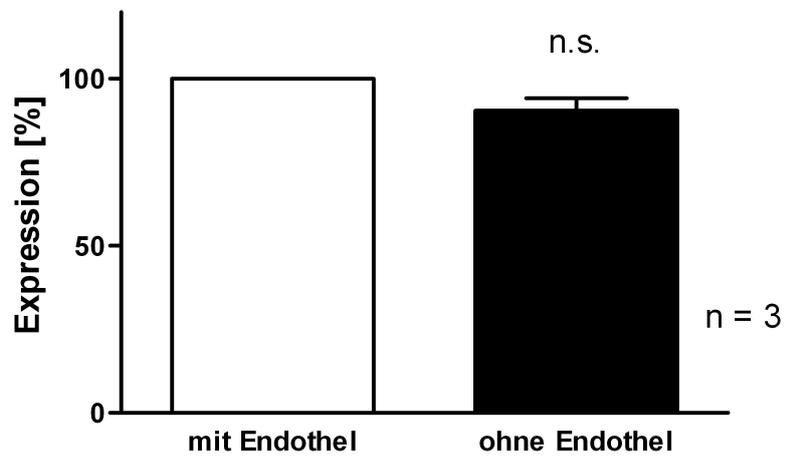


Abb. 5.41: Vergleich der Expression der β_3 -Untereinheit in Seitenästen der A. coronaria dextra mit und ohne Endothel, n.s.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie des nicht allergischen Angioödems zu erlangen.

Es konnte gezeigt werden, dass Fibrinogen eine direkte vasoaktive Wirkung besitzt. Steigende Konzentrationen des Akute-Phase-Proteins führten zu einer signifikanten Vasodilatation an vorkontrahierten, isolierten, porvinen Segmenten der *A. coronaria dextra*. Dieser Effekt ist nur teilweise vom Endothel abhängig und wird über unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Muskelstarke Arterien vom Leitungstyp wie die hier modellhaft verwendeten Segmente der *A. lingualis dextra* weisen hingegen keine Veränderung des Vasotonus durch Fibrinogen auf.

Da erhöhte Bradykininwerte für die Entstehung des ACEH induzierten, nicht allergischen AÖ verantwortlich sein sollen, wurde eine mögliche Wechselwirkung der beiden Substanzen untersucht. Eine Vorinkubation mit Fibrinogen in unphysiologisch hohen Dosen ($> 10,5\mu M$) führte zu einer Wirkungsverstärkung der dilativen Eigenschaften von Bradykinin. Dieser Effekt ist ähnlich der Wirkungsverstärkung durch den ACEH Moexipril.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen deuten an, dass die Wechselwirkung von Fibrinogen und Bradykinin zu einer Verstärkung der NO-Wirkung führt. Die in den durchgeführten Untersuchungen gewonnenen Daten lassen vermuten, dass Fibrinogen an der Entstehung des nicht allergischen Angioödems beteiligt sein kann.

In der Literatur sind keine Untersuchungen im Organbad mit Fibrinogen an Arterien, speziell kleinlumigen, mit Ausnahme von Publikationen aus der Forschungsgruppe vorhanden.

6.1 Generelle Charakterisierung

Im Rahmen der generellen Charakterisierung der verwendeten Gefäße erwiesen sich die aus der Zunge isolierten Arterien als signifikant kontraktionsstärker als die Seitenäste der rechten Koronararterien. Dies zeigte sich sowohl in den Versuchen mit dem Phos-

pholipase C und Adenylatzyklaseaktivator Prostaglandin $F_{2\alpha}$ als auch in den Versuchen mit Kaliumchlorid. Des Weiteren bestanden Unterschiede in der Reaktion auf das α -Sympathomimetikum Phenylephrin. Im Gegensatz zu den Zungenarterien zeigten die Koronararterien keine Reaktion auf steigende Konzentrationen von Phenylephrin. Hieraus resultierten die unterschiedlichen Endotheltests für beide Gefäßtypen. In dieser Arbeit wurden somit zwei verschiedene Arterientypen untersucht.

Die direkte Reaktion auf den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin zeigte bei beiden Arterientypen vergleichbare Kurvenverläufe. Somit gibt es vermutlich keine Unterschiede in der Ausprägung der an der bradykininvermittelten Vasodilation beteiligten Rezeptoren.

6.2 Histologische Bilder

Die histologischen Bilder wurden nach einer Formalin-Fixierung nach Lillie mit Haemalaun-Eosin-Färbung angefertigt. Die Schnitte charakterisierten die Lingualarterien als Gefäße mit einer stark ausgeprägten Muskelschicht. Die Koronargefäße zeigten eine deutlich schmalere Muskelschicht. Die histologischen Schnitte geben somit eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Kontraktionsverhalten der verwendeten Gefäßtypen in den Organbadversuchen. Die Segmente der Koronararterien dienen als Modell für Endgefäße, wohingegen die Segmente der *A. lingualis dextra* am ehesten einem Modell für Leitungsgefäßen entsprechen.

6.3 Versuche mit Fibrinogen

6.3.1 Basaltonus

Die kumulative Zugabe von Fibrinogen bis zu einer maximalen Konzentration von $15\mu M$ im Organbad führte zu keiner signifikanten Veränderung des Basaltonus der verwendeten Arterien. Es gab keine Unterschiede in der Reaktion der beiden verwendeten Gefäßtypen, weshalb auf weitere Versuche zum Basaltonus wie etwa eine vorherige Inkubation mit Glibenclamid oder N_{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester oder Versuche mit zerstörtem Endothel verzichtet wurde.

6.3.2 Überprüfung der Endothelabhängigkeit der direkten vasoaktiven Wirkung von Fibrinogen

Fibrinogen vermittelte Vasodilation bei intaktem Endothel

In den Versuchen wurden Konzentrationen von 0 bis $15\mu M$ verwendet. Beim Menschen existiert physiologisch keine Konzentration von $0\mu M$ Fibrinogen. Da der menschliche Organismus physiologischerweise Konzentrationen von $4,8$ bis $10,5\mu M$ Fibrinogen im Blut aufweist, müsste es bereits beim gesunden Menschen einen Effekt von Fibrinogen geben. Die Wirkung von Fibrinogen wurde bisher lediglich im subphysiologischen bis maximal niedrig-physiologischen Bereich untersucht [45, 54]. Bei Patienten mit ACEH-induziertem Angioödem zeigen sich jedoch deutlich über den physiologischen Bereich erhöhte Fibrinogenwerte [9]. Eine maximale Dilation von über 50% bei $15\mu M$ ausgehend von der submaximalen Vorkontraktion kann in vivo auf Grund der physiologischen Ausgangskonzentration nicht erreicht werden. Zudem besteht in vivo zwar ein Grundtonus der Gefäße aber keine Vorkontraktion, wie hier verwendet. Hierdurch stellt sich die Frage, ob erhöhte Fibrinogenkonzentrationen überhaupt in vivo den Vasotonus signifikant beeinflussen und so an der Entstehung des nicht allergischen Angioödems beteiligt sein können. Vergleicht man den dilativen Effekt von Fibrinogen in einer mittleren physiologischen Konzentration von $8\mu M$ mit der maximal getesteten Konzentration von $15\mu M$, einer Konzentration, wie sie bei Patienten mit ACEH-induzierten AÖ vorkommt, zeigt sich eine signifikante Steigerung ($p < 0.05$) der Wirkung (Abb. 6.1). Konzentrationen, wie sie beim ACEH-induzierten, nicht allergischen Angioödem vorkommen, könnten somit auch in vivo noch einen Effekt auf Gefäße aufweisen, da die Vasodilation durch Fibrinogen besonders stark in Konzentrationen über $10\mu M$ im Organbad und somit im supraphysiologischen Bereich ausgeprägt war. Hicks et al. zeigten in subphysiologischen Dosen ($< 5\mu M$) eine Vasodilation mit einem Maximum von $63 \pm 3.1\%$ bei $1.8\mu M$ Fibrinogen mit anschließender Konstriktion an mit KCl bzw. Phenylephrin submaximal vorkontrahierter, humaner V. saphena magna [54]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Konstriktion an den verwendeten porvinen Arterien nachgewiesen werden, weder in den von Hicks et al. beschriebenen Konzentrationen noch in höheren Konzentrationsbereichen.

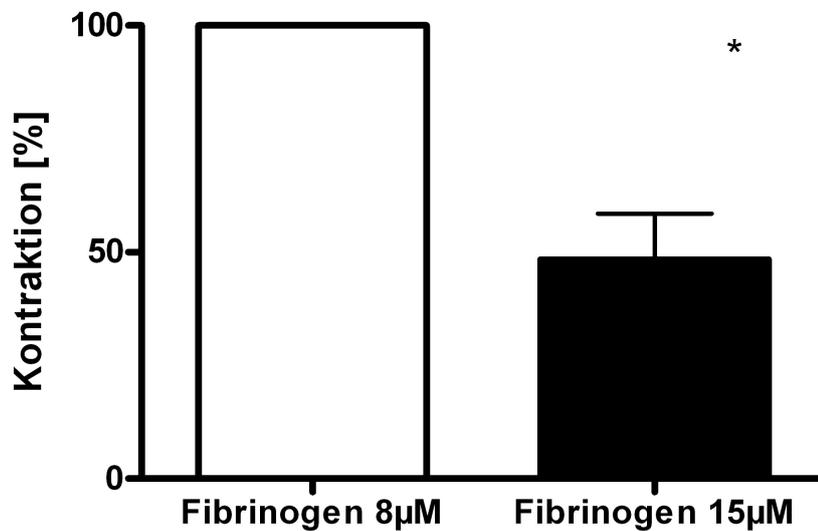


Abb. 6.1: Vergleich der dilativen Eigenschaften von Fibrinogen bei einer mittleren physiologischen Konzentration von $8\mu M$ mit dem maximal untersuchten Effekt bei $15\mu M$. Der dilatative Effekt von $8\mu M$ Fibrinogen wurde als 100% gesetzt

Fibrinogen in einer Konzentration bis $15\mu M$ im Organbad wies auf die porvinen Koronargefäße einen rein dilativen Effekt auf. Bei den aus der Zunge isolierten Arterien kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung des Vasotonus durch Zugabe von Fibrinogen nach Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Arterientypen zeigten folglich deutlich unterschiedliche Reaktionen. Golledge et al. wiesen im Organbad ebenfalls eine relaxierende Wirkung von Fibrinogen (bis $3\mu M$) an humaner V. saphena magna nach. Durch vorübergehende Exposition mit arteriellen Flussbedingungen konnte der dilatative Effekt von Fibrinogen verstärkt werden [45]. Somit konnte ein Unterschied zwischen Venen und Arterien und auch zwischen verschiedenen Arterientypen festgestellt werden. Dies legt nahe, dass die Wirkung von Fibrinogen abhängig von Gefäßaufbau und strukturellen Anforderungen wie sie in vivo bestehen, ist.

Weder bei Hicks et al. [54] noch bei Golledge et al. [45] finden sich Angaben zur Größe oder zur genauen Charakterisierung der verwendeten Venensegmente. Hierdurch und durch die unterschiedliche Herkunft der verwendeten Gefäße ergibt sich eine Einschränkung der Vergleichbarkeit der Studien mit den hier durchgeführten Untersuchungen. Möglicherweise wurden unterschiedlich große Segmente und Durchmesser verwendet.

Beim ACEH-induzierten Angioödem zeigt sich besonders eine Beteiligung des Mund-

bereichs inklusive der Zunge. Es finden sich jedoch keine signifikante Änderung des Vasotonus der Zungenarterien durch Fibrinogen, weder in den Versuchen nach Vorkontraktion, noch auf den Basaltonus. Sollte Fibrinogen tatsächlich an der Entstehung des nicht allergischen Angioödems beteiligt sein, wäre eine Reaktion der Zungengefäße auf Fibrinogen zu erwarten gewesen. Jedoch sind die gewählten, aus der Zunge isolierten Arterien nicht der Ort der Ödementstehung. In der Pathophysiologie der Ödementstehung spielen vielmehr kleinere Gefäße eine entscheidende Rolle [84]. Leitungsarterien wie die als Modell gewählte A. lingualis dextra könnten somit unbeteiligt an der Entstehung sein und nur Transportgefäße darstellen. In diesem Fall sollten Untersuchungen an kleineren Gefäßsegmenten der Zunge wie etwa an Seitenästen neue Ergebnisse liefern.

Eine mögliche Erklärung für die voneinander abweichenden Reaktionsweisen wären Unterschiede in der Expression eines an der Vermittlung der durch Fibrinogen bewirkten Vasodilation beteiligten Rezeptors. Untersuchungen einer weiteren Doktorandin der Arbeitsgruppe legen nahe, dass Fibrinogen über $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren zur Vasodilation führt [11]. Geht man davon aus, dass Fibrinogen über diesen Rezeptor zur Entstehung des AÖ beiträgt, sollte dieser nicht oder vermindert in den muskelstarken Lingualgefäßen exprimiert sein. Zur Klärung, ob das unterschiedliche Verhalten der Gefäße durch Unterschiede in der Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors begründet sein könnte, wurden Western-Blots angefertigt. Mittels diesen konnte gezeigt werden, dass der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren bei den aus der Zunge isolierten Gefäßsegmenten signifikant ($p < 0.01$) geringer exprimiert ist, als bei den Koronararterien. Dieses Ergebnis kann das fehlende Ansprechen der A. lingualis dextra auf Fibrinogen erklären.

Effekt von Fibrinogen bei zerstörtem Endothel

Zur weiteren Abklärung des an der fibrinogenvermittelten Vasodilation beteiligten Mechanismus wurde der Einfluss des Endothels erforscht. Die an der Entstehung von Ödemen beteiligten Widerstandsgefäße und Kapillaren weisen ebenso wie die hier modelhaft verwendeten Arterien eine Endothelschicht auf. In der vorliegenden Untersuchung konnte eine teilweise Endothelabhängigkeit nachgewiesen werden, jedoch war die fibrinogenvermittelte Vasodilation nicht vollständig durch Zerstörung des Endothels inhibierbar. Dies könnte daran liegen, dass das Endothel durch die mechanische Manipulation nicht komplett geschädigt wurde. Eine hundertprozentige Zerstörung war auf Grund der Schonung

der Muskulatur nicht möglich. Die Überprüfung der endothelialen Funktion zu Beginn einer jeden Versuchsreihe mit Substanz P bzw. Acetylcholin zeigte eine Zerstörung des Endothels von mindestens 80%. Die Wirkung scheint nur zum Teil endothelabhängig zu sein, da auch bei achzigprozentiger Zerstörung ein deutlicherer Effekt zu erwarten gewesen wäre.

Ziel der Untersuchung mit N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) war es, durch kompetitive Hemmung der NO-Synthese mit der dem L-Arginin ähnlichen Aminosäure die endogene NO-Freisetzung zu reduzieren und hierdurch eine Beteiligung der endothelialen NO-Synthase nachzuweisen. Durch die Blockade der NO-Synthese kann man indirekt auf die Wirkung von NO schließen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die NO-Synthase nur einen geringen Einfluss in der Vermittlung der Vasodilation durch Fibrinogen hat und andere endotheliale Mechanismen beteiligt sein müssen. Endothelzellen können als Antwort auf zum Beispiel chemische oder physikalische Reize mit einer Freisetzung von NO oder Prostaglandinen reagieren. Ebenfalls möglich ist eine NO und Prostaglandin unabhängige Hyperpolarisation (EDH, endothelium derived hyperpolarization) und anschließende Dilation der glatten Muskelzellen. Fibrinogen scheint somit über verschiedene endotheliale Mechanismen zu wirken.

6.3.3 Einfluss von ATP-abhängigen Kaliumkanälen auf die Fibrinogen vermittelte Vasodilation nach submaximaler Vorkontraktion mit Prostaglandin F_{2α}

Verantwortlich für die Konstriktion oder Dilation eines Gefäßes ist die glatte Muskulatur. Diese befindet sich in der Tunica media der Blutgefäße. Glatte Muskelzellen besitzen im Gegensatz zum Skelettmuskel nur einen mittigen Zellkern, sind klein und spindelförmig. Sie enthalten mehr Aktin als Skelettmuskulatur. Die Kontraktion und Dilation der Muskelzellen wird unter anderem über die [Ca²⁺]_i Konzentration kontrolliert. Eine Konzentrationserhöhung kann durch Calciumeinstrom aus dem Zytosol in die Muskelzelle über spannungsabhängige Kanäle erfolgen, welche je nach Membranpotential geöffnet oder geschlossen sind. In glatten Gefäßmuskelzellen sind ATP-abhängige Kaliumkanäle an der Aufrechterhaltung des basalen Tonus beteiligt (Abb. 6.2) [39]. Durch ATP-abhängige Kaliumkanäle kommt es zu einer Koppelung des Membranpotentials der Zelle an deren metabolischen Status [72]. ATP-abhängige Kaliumkanäle sind octamäre Proteinkomplexe bestehend aus vier Untereinheiten (Kir6.x) umgeben

von vier Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten (SUR.x) [40, 72, 109]. Deren Öffnung führt zu einer Erhöhung der Kaliumpermeabilität und damit zu einer Annäherung des Membranpotentials an das Kaliumgleichgewichtspotential. Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid schließen ATP-abhängige Kaliumkanäle und führen so über die Öffnung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen zur Konstriktion. In der hier durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die fibrinogenvermittelte Vasodilatation zum Teil abhängig von K_{ATP} -Kanälen ist. Der Effekt von Glibenclamid zeigte sich als von der Fibrinogenkonzentration abhängig. Bei Konzentrationen von $10 - 13\mu M$ war der Effekt am deutlichsten ausgeprägt, hier kam es zu einer beinahe vollständigen Aufhebung der Vasodilatation, die sich bei Konzentrationen über $13\mu M$ verringerte. Somit war der Einfluss der K_{ATP} -Kanäle in Konzentrationen wie sie beim Gesunden vorkommen und im leicht supraphysiologischen Bereich am stärksten. In pathologisch hohen Konzentrationen zeigte sich zwar noch eine deutliche Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, eine vollständige Aufhebung der Wirkung war hier jedoch nicht nachweisbar. Dies könnte an der Affinität von Glibenclamid zum Rezeptor liegen, möglicherweise ist diese bei hohen Fibrinogenkonzentrationen nicht stark genug, um eine sichere Blockierung der K_{ATP} -Kanäle zu gewährleisten. Da Fibrinogen über verschiedene Mechanismen zu einer Vasodilatation zu führen scheint, ist es weiterhin möglich, dass in höheren Konzentrationen von Fibrinogen andere Mechanismen überwiegen. In der Literatur wird ebenfalls eine Reduktion der fibrinogenvermittelten Vasodilatation durch Zugabe des K_{ATP} -Kanal Blockers Glibenclamid beschrieben [45, 54]. Golledge et al. zeigten in ihrer Untersuchung eine Aufhebung der Wirkung von Fibrinogen (bis $3\mu M$) durch Glibenclamid ($25\mu M$) [45]. Die von Hicks et al. beschriebene Verringerung der fibrinogenvermittelten Dilation von maximal $63 \pm 3\%$ auf maximal 20% durch den K_{ATP} -Blocker ($30\mu M$) war deutlich ausgeprägter als in dieser Untersuchung an porvinen Arterien gezeigt [54]. Unklar bleibt, ob es sich hierbei um einen speziesspezifischen oder um einen durch verschiedene Gefäßtypen bedingten Effekt handelt.

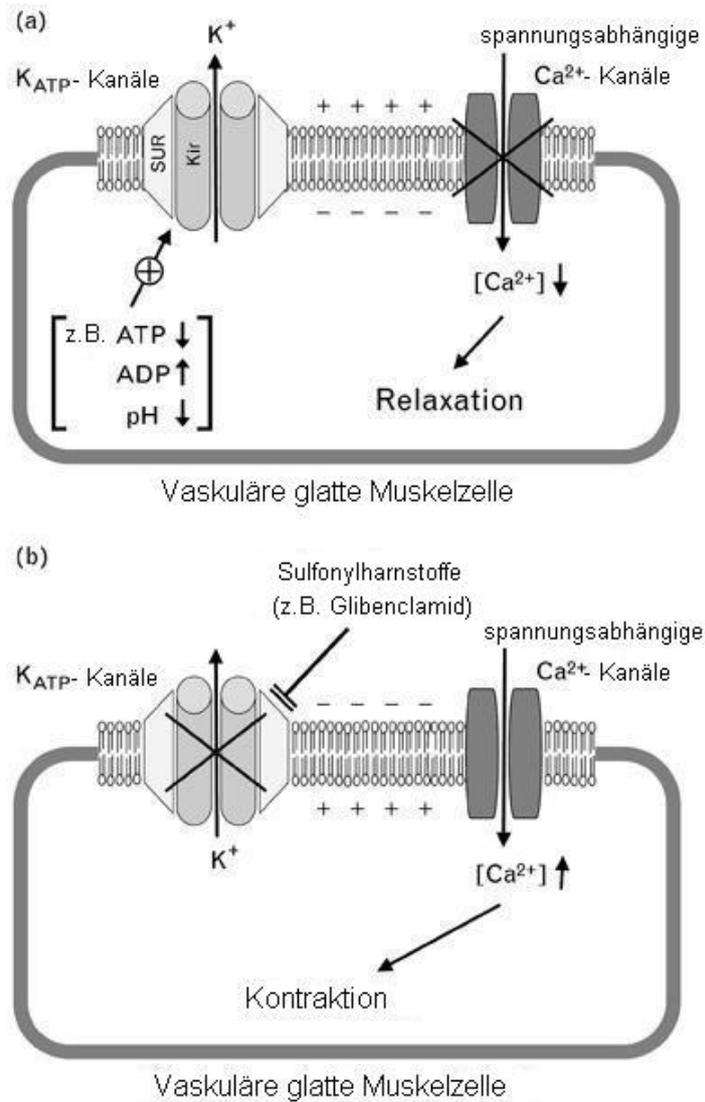


Abb. 6.2: Schematische Darstellung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen in vaskulärer glatter Muskulatur modifiziert nach [72]

6.4 Wechselwirkung von Fibrinogen und Bradykinin

Zu den biologischen Aufgaben des Bradykinins gehören sowohl die Kontraktion als auch die Dilation von glatter Muskulatur des Intestinal-, Urogenital- und Respirationstraktes. Des Weiteren nimmt Bradykinin Einfluß auf den epithelialen Ionentransport, die Durchblutung und den Blutdruck. Verglichen mit Histamin führt Bradykinin zu einer

zehnfachen Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität [19]. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung von Flüssigkeit im Interstitium und damit zum Ödem. Bradykinin wirkt über endotheliale, G-Protein gekoppelte B₁- und B₂-Rezeptoren. Letztere sind an der Vermittlung von Algesie, Inflammation und peripherer Vasodilation beteiligt [19, 48, 70]. Durch Aktivierung der B₂-Rezeptoren kommt es über eine Tyrosin-Phosphorylierung zur Aktivierung der Phospholipase C. Diese Signalkaskade führt letztendlich zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums und so zur Freisetzung von NO, Prostaglandin I₂ und EDHF [24]. Die Kinasenaktivierung durch Erhöhung des Calciums im Zytosol führt zur Kontraktion der Zelle und im Weiteren zur Hyperpermeabilität [105, 107]. Zudem liegt der Verdacht nahe, dass dieser Rezeptor an dem durch ACEH bedingten Effekt auf die endotheliale Funktion beteiligt ist [34, 70].

Erhöhte Bradykininwerte werden in der Literatur als mögliche Ursache der Entstehung des ACE-Hemmer-induzierten Angioödems beschrieben [36, 61, 68, 95]. Unklar ist jedoch, wie diese erhöhten Bradykininwerte bei einigen Patienten zum Auftreten eines AÖ führen sollen, bei anderen hingegen nicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkung von Fibrinogen und Bradykinin bezüglich der vasodilatativen Wirkung von Bradykinin, einem streng endothelabhängigen Effekt, untersucht. Diese wurde durch Fibrinogen erhöht. Die Wirkung von Bradykinin ist streng endothelabhängig. Die an der Entstehung eines Ödems beteiligten Widerstandsgefäße und Kapillaren verfügen ebenso wie die hier modellhaft verwendeten Arteriensegmente der A. coronaria dextra über eine Endothelschicht. Somit ist hier eine ähnliche Wirkung anzunehmen. Offen bleibt, über welchen Mechanismus Fibrinogen zu einer Wirkungsverstärkung von Bradykinin führt. Eine Erhöhung der Rezeptorexpression wäre ebenso denkbar wie eine Erhöhung der Sensitivität der Rezeptoren für Bradykinin oder eine Addition der Einzelwirkungen. Das Fehlen einer Reaktion der Zungengefäße auf Fibrinogen bei gleicher Reaktion auf Bradykinin wie die Koronarien lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass an der Wirkungsverstärkung von Bradykinin durch Fibrinogen allein B₂-Rezeptoren beteiligt sind. Zur weiteren Abklärung in wie weit der beobachtete Effekt der Wirkungsverstärkung durch einen ACEH beeinflusst wird, wurden Versuche mit dem ACEH Moexipril durchgeführt. Durch die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms steht pro Zeiteinheit mehr aktive Substanz zur Verfügung. Der ACE-Hemmer Moexipril verstärkte in den Versuchen nach Vorinkubation die vasodilatorischen Eigenschaften von Bradykinin. In wie fern die Wirkung von ACEH selbst in vivo an der Entstehung des Angioödems beteiligt ist, bleibt offen, denn AÖ entstehen häufig erst nach mehrjähriger Therapiedauer. Wei-

terhin zeigen Fallberichte Patienten, die erst nach Absetzen des ACEH ein Angioödem entwickelten. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Patientenberichten um Sekundärereignisse bei unerkanntem Vorereignis. In der Literatur wird ein direkter Einfluß von ACEH auf Bradykinin beschrieben. Mancini et al. zeigten in der TREND-Studie (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction), einer doppelblinden, prospektiven Studie an 129 Patienten mit koronarer Sklerose, dass die Hemmung des ACE mit Quinapril bei normotensiven Patienten die endotheliale Dysfunktion vermindert [79]. Durch Erhöhung der endothelialen, bradykininvermittelten NO-Produktion bzw. eine Verminderung des vaskulären oxidativen Stresses und hierdurch bedingte, verminderte Inaktivierung von NO soll eine Verbesserung der endothelialen Funktion durch ACEH bewirkt werden. Der in der Behandlung von Patienten festgestellte positive Effekt der ACE-Hemmung zeigte sich an Gesunden und an Patienten mit chronischen Herzfehlern durch Untersuchungen mit HOE-140, einem selektiven B₂-Rezeptor Antagonist, als B₂-Rezeptor abhängig [70]. Betrachtet man Abbildung 5.23, scheint Fibrinogen einen ähnlichen Effekt wie der ACEH Moexipril zu bewirken. Sollte Fibrinogen eine ähnliche Wirkweise auf Bradykinin aufweisen, könnte dies durch pro Zeiteinheit mehr zur Verfügung stehendes Bradykinin bedingt sein. Ebenfalls denkbar ist eine additive Wirkung der beiden Substanzen oder eine Erhöhung der Anzahl bzw. der Sensitivität der beteiligten Rezeptoren durch Fibrinogen. Der Effekt von Moexipril war auch nach einer einstündigen Vorinkubation mit Fibrinogen (15µM) noch nachweisbar, diese brachte aber keine weitere Steigerung der durch Moexipril gezeigten Wirkung.

6.5 Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein-Western-Blots

Untersuchungen der Forschungsgruppe zeigten an isolierten porvinen Segmenten der A. lingualis dextra und der A. coronaria dextra keine Unterschiede in der Bradykininwirkung bei Verwendung des Cyclooxygenasehemmers Diclofenac im Organbad verglichen mit Versuchen ohne Diclofenac. Da Bradykinin somit überwiegend über den NO-Weg zu wirken scheint, wurden VASP-Western-Blots zur molekularbiologischen Untersuchung angefertigt. Nach Vorinkubation mit Fibrinogen (15µM) und anschließender Zugabe von Bradykinin zeigte sich bei den VASP-Western-Blots der Koronararterien eine stärkere Phosphorylierung der Ser239 als ohne Vorinkubation mit Fibrinogen. Dies spricht für eine Steigerung der Aktivierung des NO-Wegs. Die hier dargestellten Unterschiede in der Phosphorylierung legen die Vermutung nahe, dass Fibrinogen die bradykininvermittelte

Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase verstärkt und somit auch in vivo eine Potenzierung der Bradykininwirkung bedingen könnte.

6.6 Immunhistochemie

Die Unterschiede in der Mediadicke vor und nach Inkubation mit Fibrinogen sind hochsignifikant ($p < 0.001$), zeigen sich aber als für beide Arterientypen gegenläufig. Während bei den Koronararterien nach Inkubation höhere Werte für die Mediadicke nachweisbar waren, zeigten die Lingualgefäße vor Inkubation mit Fibrinogen höhere Werte als nach Inkubation. Dies lässt einen unspezifischen Effekt, möglicherweise einen Messartefakt, vermuten. Auf Grund der Integrität der Gefäßwand und durch die Enge des Gefäßlumens muss davon ausgegangen werden, dass es von der luminalen Seite der Gefäße zu keinem Eindringen des Fibrinogens gekommen sein könnte. Unterschiede zwischen den beiden Arterientypen und zwischen den Arterien mit und ohne Vorinkubation mit Fibrinogen könnten durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen zum Zeitpunkt der Inkubation bedingt sein. Es ist möglich, dass es sich bei den beobachteten Ergebnissen um ein Kunstprodukt handelt.

6.7 Mechanismus der fibrinogenvermittelten Vasodilation und der Wechselwirkung mit Bradykinin

Der genaue Mechanismus, über den Fibrinogen zur Dilation führt, bleibt ungeklärt. Eine endotheliale Beteiligung konnte ebenso wie eine Beteiligung von ATP abhängigen Kaliumkanälen nachgewiesen werden. Untersuchungen der Forschungsgruppe konnten ein Mitwirken des vaskulären Integrins $\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin) zeigen, welches auf verschiedenen Zellen wie Osteoklasten, Endothelzellen, glatter Muskulatur und Thrombozyten exprimiert wird [33, 69]. Die Vasodilation wurde durch Abciximab ($4\mu M$), einem Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörper gegen das humane IIB 3 Integrin, inhibiert. Mittels Western-Blots wurde die Existenz der Untergruppe β_3 des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in humaner Arteria mamaria interna und in porvinen Koronargefäßen mit und ohne Endothel nachgewiesen. Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die bidirektional vitale Signale vermitteln und eine Verbindung des Zytoskeletts mit Matrixproteinen oder anderen Zellen schaffen. Das heterodimere Glykoprotein $\alpha_v\beta_3$ bestehen aus einer α -Untereinheit, die

nichtkovalent mit einer β -Untereinheit assoziiert ist (Abb. 6.3) [118]. Dieses Integrin ist auf Endothelzellen, glatter Muskulatur sowie auf Thrombozyten nachweisbar [106].

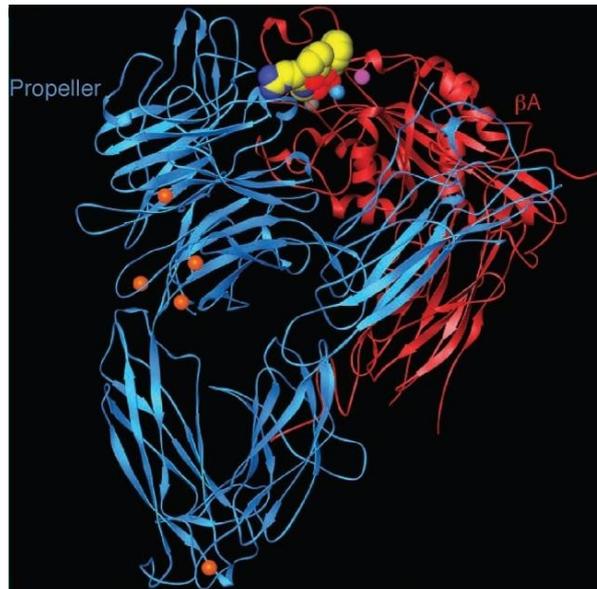


Abb. 6.3: Struktur von $\alpha_v\beta_3$ -RGD-Mn aus [118]

Fibrinogen besitzt drei potentielle Integrin-Bindungsstellen, hiervon befinden sich zwei in Form von RGD (Arginin-Glycin-Asparagin)-Sequenzen auf der $A\alpha$ -Kette und eine dritte Bindungsstelle ohne RGD-Sequenz auf der γ -Kette. Fibrinogen bindet bevorzugt über die RGD-Sequenz der $A\alpha$ -Kette an $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren [27, 106]. Die Signaltransduktion erfolgt durch Assoziation mit Adapterproteinen und regulatorischen Proteinen, welche eine Verbindung mit dem Zytoskelett und zytoplasmatischen Kinasen ermöglicht.

An der direkten vasoaktiven Wirkung von Fibrinogen scheinen somit mehrere Mechanismen beteiligt zu sein, wobei der Nachweis der Integrinbeteiligung einen Anhalt für die beteiligte Signalkaskade gibt. Der genaue Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Bradykinin und Fibrinogen bleibt ebenfalls offen. Eine Addition der Einzelwirkungen, eine Erhöhung der Bradykinin-Konzentration oder eine direkte Wirkung von Fibrinogen an B_2 -Rezeptoren ist möglich.

6.8 Beteiligung von Fibrinogen an der Entstehung des nicht allergischen Angioödems

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen von Forschungen zur Klärung des ACEH-induzierten Angioödems durchgeführt. Ödeme entstehen durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks z.B. bei Herzinsuffizienz oder lokaler, venöser Druckerhöhung. Weitere Ursachen einer Ödementstehung können eine Erniedrigung des onkotischen Drucks z.B. bei Reduktion der Proteinsynthese sowie eine Mangelernährung sein. Ebenfalls können eine Steigerung des osmotischen Drucks, Abflußbehinderungen in den Lymphgefäßen oder eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität beteiligt sein. Das Starling-Gesetz fasst diese, den Filtrationsdruck beeinflussenden Faktoren zusammen. Nach diesem ist der effektive Filtrationsdruck P_{eff} gleich der Differenz von hydrostatischem Druck (P) und osmotischem Druck (π) innerhalb (i) und ausserhalb (o) des Gefäßes [67]:

$$P_{eff} = (P_i - P_o) - (\pi_i - \pi_o)$$

Im Gleichgewichtszustand kommt es zu einer Aufhebung der durch die Druckdifferenzen entstehenden Flüsse. Veränderungen der Variablen führen zu Verschiebungen der Flüssigkeitsverteilung zwischen vaskulärem und interstitiellem Raum. Das Endothel trennt das Blut vom Gewebe und stellt eine selektive Barriere dar, welche unter anderem am Austausch von Flüssigkeiten und Blutbestandteilen beteiligt ist. Bei Störungen der Barrierefunktion kann es zu einer Leckage von Makromolekülen kommen und so zur Ödementstehung. Der Austausch kann über transzelluläre bzw. parazelluläre Wege erfolgen. An der Entstehung des nicht allergischen Angioödems sollen vor allem permeabilitätssteigernde Effekte verantwortlich sein. In dieser Arbeit wurde jedoch lediglich der Effekt von Fibrinogen auf die vasodilatatorischen Eigenschaften des Bradykinins und die direkte vasoaktive Wirkung von Fibrinogen untersucht. Eine Beeinflussung des für die Entstehung eines Ödems ursächlichen Effekts der Permeabilitätssteigerung durch Bradykinin wurde ursächlich nicht ergründet.

Die hier modellhaft durchgeführten Versuche zur Änderung des Vasotonus durch Fibrinogen zeigten eine konzentrationsabhängige Vasodilatation bei Segmenten der A. coronaria dextra. Bei den muskelstarken Lingualarterien zeigte sich keine Beeinflussung des Vasotonus durch Fibrinogen. Berücksichtigt man die Ergebnisse von Golledge et al., Hicks et al. und Bas et al., scheint die Wirkung von Fibrinogen entscheidend von der Gefäßpro-

vinz abhängig zu sein [11, 45, 54]. Bei den hier verwendeten Gefäßen handelt es sich um ein tierisches Modell. Speziesunterschiede wurden nicht berücksichtigt. Jedoch konnte in weiteren Untersuchungen aus der Forschungsgruppe gezeigt werden, dass der vasodilatative Effekt von Fibrinogen auch qualitativ an humanen Gefäßen nachweisbar ist [11].

Weiterhin wurde in dieser Untersuchung die Wechselwirkung von Fibrinogen mit Bradykinin erprobt. In den modellhaft durchgeführten Versuchen zeigte Fibrinogen eine deutliche Verstärkung der vasoaktiven Wirkung von Bradykinin. Möglicherweise verstärkt Fibrinogen auf gleichem Weg auch die permeabilitätssteigernden Eigenschaften von Bradykinin und führt so zur Entstehung des nicht allergischen Angioödems.

Bei der Entstehung des ACEH-induzierten Angioödems scheinen mehr Faktoren als nur die reine Konzentrationserhöhung von Bradykinin beteiligt zu sein, denn diese ist bei fast allen Patienten unter ACEH-Therapie nachweisbar, Angioödeme treten aber nur selten auf. Fibrinogen, welches im akuten Intervall erhöht nachweisbar ist, zeigte in den durchgeführten Organbadversuchen eigene vasoaktive Eigenschaften ebenso wie eine Wirkungsverstärkung der dilatativen Eigenschaften von Bradykinin. Dies lässt vermuten, dass es auch in vivo durch Fibrinogen alleine und in der Kombination mit Bradykinin zu Effekten kommen kann, die die Entstehung eines nicht allergischen Angioödems hervorrufen oder begünstigen. Ungeklärt bleibt weiterhin, warum beim ACEH-induzierten Angioödem vor allem Lippen, Zunge und Pharynx betroffen sind und nur in selteneren Fällen das subkutane Fettgewebe und innere Organe wie der Gastrointestinaltrakt. Eine Hypothese hierzu wäre neben einer hohen Dunkelziffer bei Auftreten von Beschwerden und Schwellungen nach langer Einnahmedauer mögliche Konzentrationsunterschiede von Bradykinin im Blut. Das Angiotensin-Converting-Enzym ist vor allem in den Alveolen der Lunge lokalisiert. Eine Hemmung des Enzyms führt somit zu einer besonders starken Erhöhung der Bradykininkonzentration in der Lunge. Auf Grund der arteriellen Versorgung des menschlichen Körpers und der kurzen Halbwertszeit von Bradykinin könnte es sein, dass herznahe Bereiche wie etwa Hals und Kopf eine höhere Konzentration von Bradykinin im arteriellen Blut enthalten als herzfernere Bereiche wie Abdomen und untere Extremitäten.

Die Ergebnisse, besonders die Wirkungsverstärkung von Bradykinin durch Fibrinogen, legen nahe, dass Fibrinogen an der Entstehung des ACEH-induzierten, nicht allergischen Angioödems beteiligt sein kann. In weiteren Untersuchungen ist zu klären, ob Fibrinogen gegebenenfalls als prognostischer Risikofaktor in der klinischen Kontrolle von Patienten unter ACEH-Therapie zu sehen ist.

7 Zusammenfassung

Hintergrund der Untersuchung ist die Klärung der Pathophysiologie des Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACEH)-induzierten, nicht allergischen Angioödems (AÖ), einer akut und mitunter ohne Vorwarnung auftretenden, ödematösen Schwellung subkutaner und submuköser Gewebsschichten. Bisher wurden erhöhte Bradykininspiegel, welche bei allen Patienten unter der ACEH-Therapie auftreten, verantwortlich gemacht. Voruntersuchungen zeigten bei Patienten mit ACEH-induzierten AÖ im symptomatischen Intervall erhöhte Plasmakonzentrationen an Fibrinogen ($14 \pm 0,91 \mu M$). Zur Einschätzung der ätiologischen Bedeutung wurden die vasomotorischen Eigenschaften von Fibrinogen in subphysiologischen¹, physiologischen², supraphysiologischen³ sowie pathologisch hohen⁴ Konzentrationen in einem in vitro Modell aus isolierten porvinen Arterien in Organbädern untersucht. Hierzu wurden kleinlumige Segmente der stark muskulären A. lingualis sowie Seitenäste der A. coronaria als arterieller Endast präpariert.

Fibrinogen zeigte eine direkte vasoaktive Wirkung und führte zu einer dosisabhängigen Vasodilation an der A. coronaria dextra. Diese war besonders stark im supraphysiologischen Bereich und durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Die Wirkung ist zum Teil abhängig von K_{ATP} -Kanälen und vom Endothel. Dabei hat die endotheliale NO-Freisetzung nur einen geringen Einfluss. Auf die stark muskulären Zungenarterien zeigte Fibrinogen keine Wirkung. Dieser Arterientyp zeigte in Western-Blots eine geringere Expression des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors, welcher an der Vermittlung der vasoaktiven Wirkung beteiligt zu sein scheint. Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass Fibrinogen die vasodilative Wirkung des Bradykinins in porvinen, kleinlumigen Seitenästen der Koronararterien potenziert. Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen legen eine Verstärkung des NO-Wegs durch Fibrinogen nahe.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Fibrinogen an der Entstehung des ACEH-induzierten, nicht allergischen AÖ beteiligt sein kann.

¹bis $5 \mu M$

² $5 - 11 \mu M$

³ $11 - 13 \mu M$

⁴ $13 - 15 \mu M$

8 Abstract

During acute interval patients with angiotensin-converting-enzyme-inhibitor (ACEi) induced, non allergic angiooedema have an increased plasma concentration of fibrinogen ($14 \pm 0.91\mu M$). The vascular activity of fibrinogen and its interaction with bradykinin were investigated in small porcine coronary arteries (diameter: $0.8 - 1.4mm$, length : $4 - 5mm$). Therefor pieces of the distal first side branch of right coronary artery and pieces of the right lingual artery were dissected. With those series of tests in special organbathes as well as molecular biological analysis were performed. Fibrinogen ($1-15\mu M$) induced a concentration depending vasodilation in precontracted coronary arteries. This effect was clearliest in concentrations higher than physiological and was partly endothelium dependent ($E + 75 \pm 21\%$ vs. $E - 86 \pm 9\%$, $n=9$, $p < 0.0001$, Two-Way-Anova). Blocking NO with L-NAME showed no significant change. Preincubation with potassium channel blocker glibenclamide ($100\mu M$) significantly inhibited fibrinogen induced vasodilatation over the full cocentration range (max: $11.3 \pm 4.6\%$, $P < 0.0001$). The concentration dependent bradykinin effect was done after one hour preincubation with $15\mu M$ fibrinogen. Here arised a significant increase of the vasodilator potency of bradykinin ($Fib + 66 \pm 36\%$ vs. $Fib - 76 \pm 30\%$). Fibrinogen increased the bradykinin induced, NO-dependent phosphorylation of Ser239. We could verify this effect via VASP western blots ($Fib - 100\%$, $Fib + 183 \pm 31\%$).

Synopsis: Fibrinogen dilatates small porcine coronary arteries concentration dependent. This effect is partly dependent of endothelium. The endothelial NO-release has just a smal influence. Fibrinogen dependent vasodilation depends on endothelial, ATP-controlled potassium channels. Fibrinogen increases the vasodilative effect of bradykinins in small arteries and increases bradykinin induced VASP phosphorylation. Fibrinogen might be involved in the developement of the ACEi induced, non allergic angiooedema.

9 Anhang

9.1 Formeln

Die Formeln wurden erstellt mit [89].

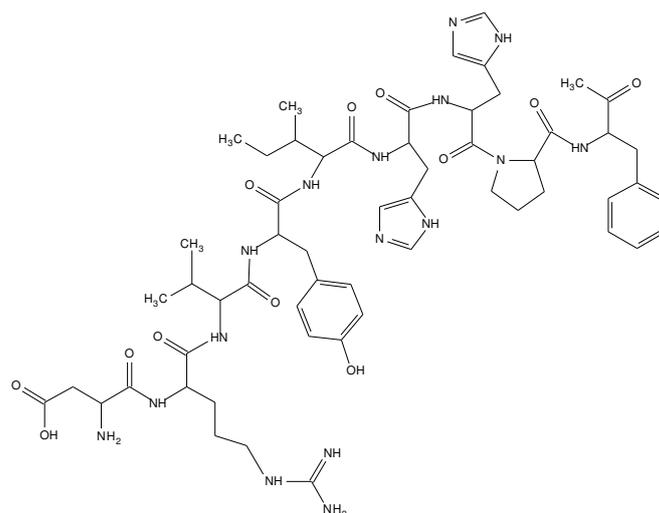


Abb. 9.1: Strukturformel Angiotensin

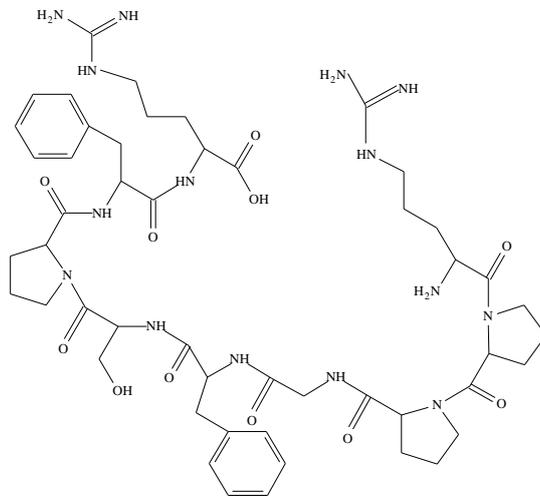


Abb. 9.2: Strukturformel Bradykinin

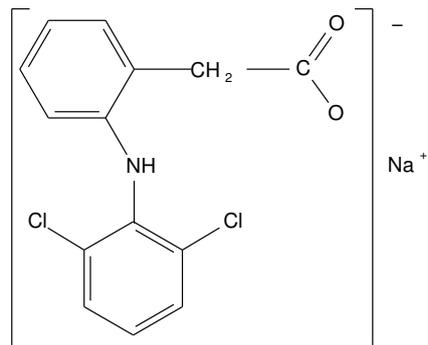


Abb. 9.3: Strukturformel Diclofenac-Natrium

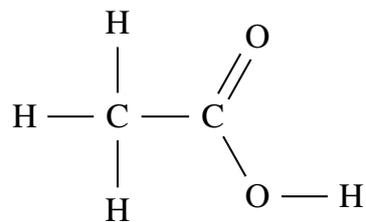


Abb. 9.4: Strukturformel Essigsäure

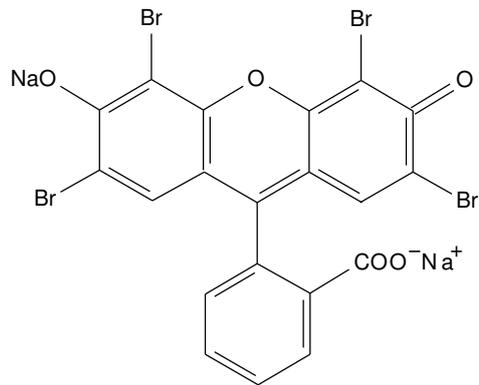


Abb. 9.5: Strukturformel Eosin

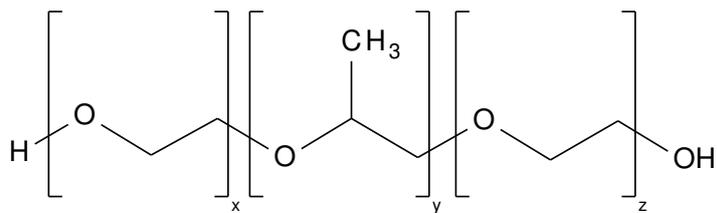


Abb. 9.6: Strukturformel F68

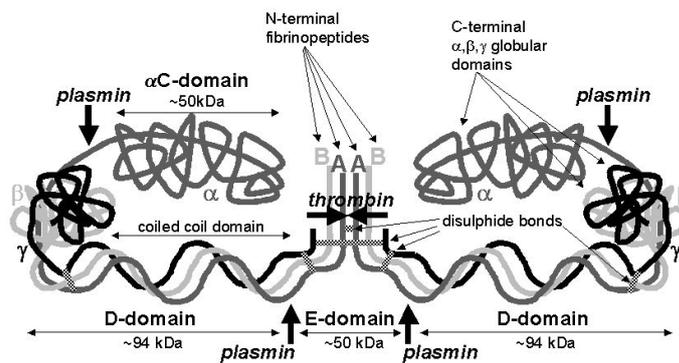


Abb. 9.7: Strukturformel Fibrinogen aus [90]

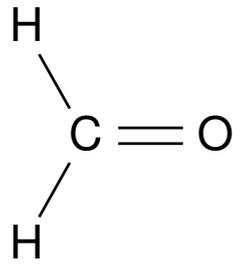


Abb. 9.8: Strukturformel Formalin

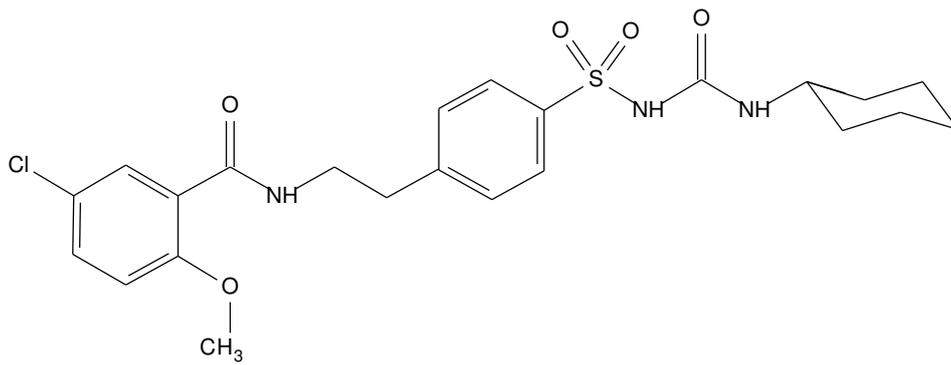


Abb. 9.9: Strukturformel Glibenclamid

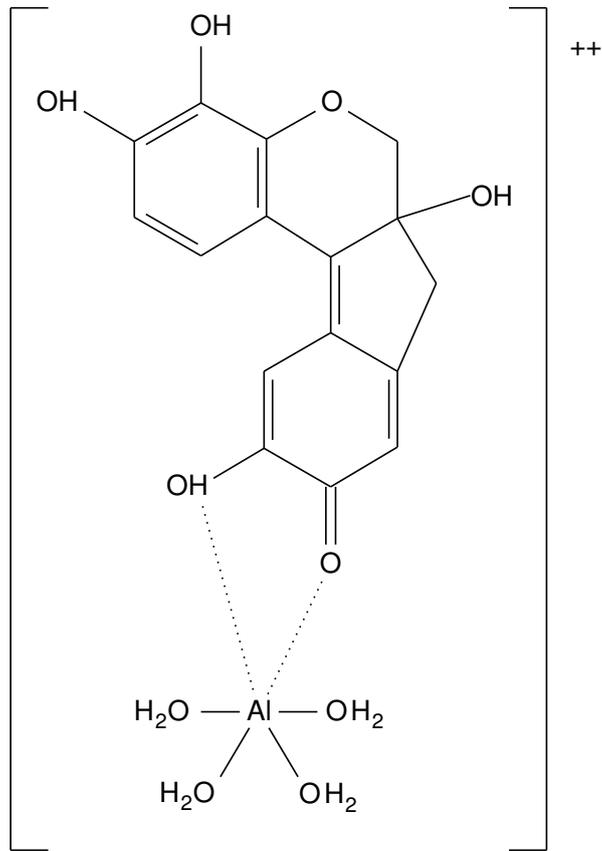


Abb. 9.10: Strukturformel Haemalaun

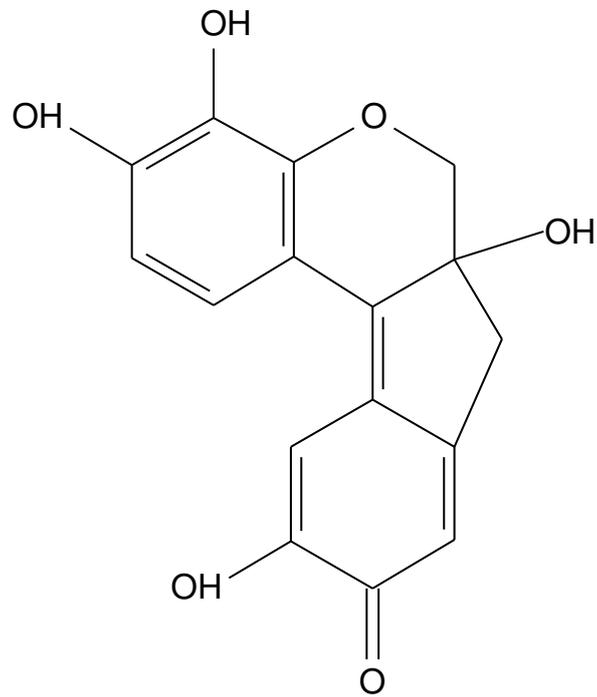


Abb. 9.11: Strukturformel Haematein

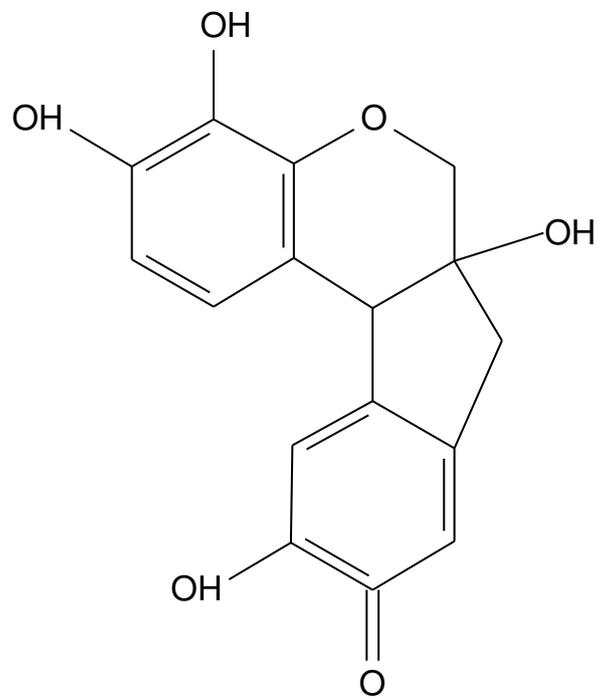


Abb. 9.12: Strukturformel Haematoxylin

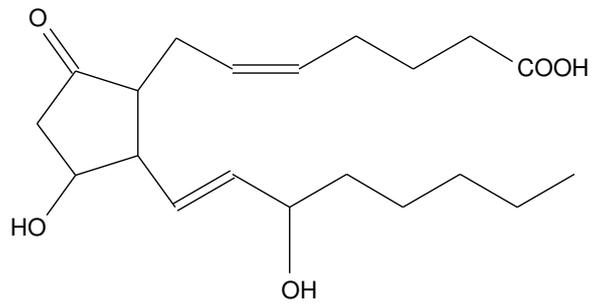


Abb. 9.13: Strukturformel Prostaglandin F_{2α}

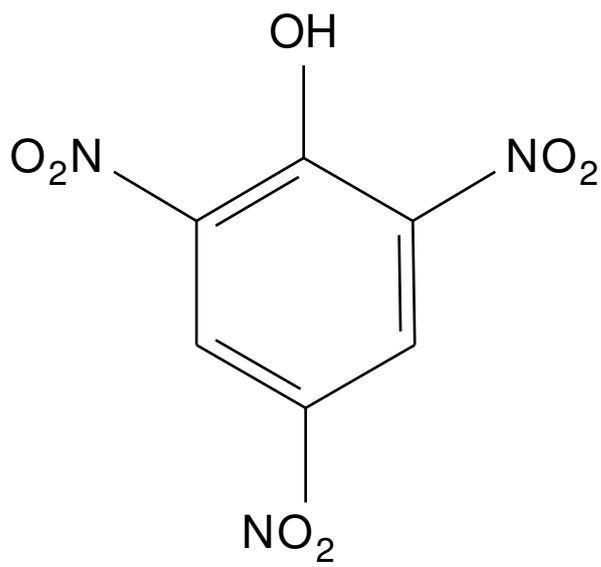


Abb. 9.14: Strukturformel Pikrinsäure

9.2 Publikationen & Kongressbeiträge

15.-17. März 2005	Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) Vortrag
4.-8. Mai 2005	76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.
24.-25. Juni 2005	Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Posterpräsentation und Vortrag
6.-7. Oktober 2005	10. NO-Forum Posterpräsentation und Vortrag
14.-15. Oktober 2005	15. Jahrestreffen - AG Klinische Immunologie Allergologie und Umweltmedizin der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie Vortrag
3.-4. März 2007	Angioödem 2007 Posterpräsentation
13.-15. März 2007	Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) Vortrag
April 2008	Potential Role of Vasomotor Effects of Fibrinogen in Bradykinin-Induced Angioedema. Journal of Allergy and Clinical Immunology [11]

10 Literaturverzeichnis

- [1] *Anatomisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Fachbereich Histologie*
- [2] ABDI, R. ; DONG, V. M. ; LEE, C. J. ; NTOSO, K. A.: Angiotensin II receptor blocker-associated angioedema: on the heels of ACE inhibitor angioedema. In: *Pharmacotherapy* 22 (2002), Sep, Nr. 9, S. 1173–1175
- [3] ADAM, A. ; CUGNO, M. ; MOLINARO, G. ; PEREZ, M. ; LEPAGE, Y. ; AGOSTONI, A. : Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. In: *Lancet* 359 (2002), Jun, Nr. 9323, S. 2088–2089
- [4] AGOSTONI, A. ; CICARDI, M. : Drug-induced angioedema without urticaria. In: *Drug Saf* 24 (2001), S. 599–606
- [5] AIKEN, J. ; ET AL.: Prostaglandines. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 6 (1984), S. 413–420
- [6] ANDERSON, M. W. ; DESHAZO, R. D.: Studies of the mechanism of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-associated angioedema: the effect of an ACE inhibitor on cutaneous responses to bradykinin, codeine, and histamine. In: *J Allergy Clin Immunol* 85 (1990), May, Nr. 5, S. 856–858
- [7] BANERJEE, A. K. ; PEARSON, J. ; GILLILAND, E. L. ; GOSS, D. ; LEWIS, J. D. ; STIRLING, Y. ; MEADE, T. W.: A six year prospective study of fibrinogen and other risk factors associated with mortality in stable claudicants. In: *Thromb Haemost* 68 (1992), Sep, Nr. 3, S. 261–263
- [8] BAS, M. ; ADAMS, V. ; SUVORAVA, T. ; NIEHUES, T. ; HOFFMANN, T. K. ; KOJDA, G. : Nonallergic angioedema: role of bradykinin. In: *Allergy* 62 (2007), Aug, Nr. 8, 842–856. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01427.x> – DOI 10.1111/j.1398-9995.2007.01427.x

- [9] BAS, M. ; KOJDA, G. ; BIER, H. ; HOFFMANN, T. K.: [ACE inhibitor-induced angioedema in the head and neck region. A matter of time?]. In: *HNO* 52 (2004), Oct, Nr. 10, 886–890. <http://dx.doi.org/10.1007/s00106-003-1017-5>. – DOI 10.1007/s00106-003-1017-5
- [10] BAS, M. ; HOFFMANN, T. K. ; KOJDA, G. : Evaluation and management of angioedema of the head and neck. In: *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14 (2006), Jun, Nr. 3, 170–175. <http://dx.doi.org/10.1097/01.moo.0000193202.85837.7d>. – DOI 10.1097/01.moo.0000193202.85837.7d
- [11] BAS, M. ; KIRCHHARTZ, N. ; HOCHFELD, J. ; TÜLLMANN, C. ; KUMPF, S. ; SUVORAVA, T. ; OPPERMAN, M. ; HAFNER, D. ; BIER, H. ; HOFFMANN, T. K. ; BALZ, V. ; KOJDA, G. : Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. In: *J Allergy Clin Immunol* 121 (2008), Apr, Nr. 4, 969–75.e2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.071>. – DOI 10.1016/j.jaci.2008.01.071
- [12] BÖCKER, H. Denk ; BÖCKER (Hrsg.): *Pathologie*. Urban & Fischer, 2004
- [13] BODELSSON, G. ; STJERNQUIST, M. : Endothelium-dependent relaxation to substance P in human umbilical artery is mediated via prostanoid synthesis. In: *Hum Reprod* 9 (1994), Apr, Nr. 4, S. 733–737
- [14] BOLTON, T. B.: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. In: *Physiol Rev* 59 (1979), Jul, Nr. 3, S. 606–718
- [15] BOOTLE-WILBRAHAM, C. A. ; TAZZYMAN, S. ; MARSHALL, J. M. ; LEWIS, C. E.: Fibrinogen E-fragment inhibits the migration and tubule formation of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. In: *Cancer Res* 60 (2000), Sep, Nr. 17, S. 4719–4724
- [16] BOOTLE-WILBRAHAM, C. A. ; TAZZYMAN, S. ; THOMPSON, W. D. ; STIRK, C. M. ; LEWIS, C. E.: Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. In: *Angiogenesis* 4 (2001), Nr. 4, S. 269–275
- [17] BOTS, M. L. ; ELWOOD, P. C. ; NIKITIN, Y. ; SALONEN, J. T. ; CONCALVES, A. F. ; INZITARI, D. ; SIVENIUS, J. ; TRICHOPOULOU, A. ; TUOMILEHTO, J.

- ; KOUDSTAAL, P. J. ; GROBBEE, D. E.: The EUROSTROKE cohorts: a short description and data analytical approach. In: *J Epidemiol Community Health* 56 Suppl 1 (2002), Feb, S. i2–i7
- [18] BOTS, M. L. ; ELWOOD, P. C. ; SALONEN, J. T. ; CONCALVES, A. F. ; SIVENIUS, J. ; CARLO, A. D. ; NIKITIN, Y. ; BENETOU, V. ; TUOMILEHTO, J. ; KOUDSTAAL, P. J. ; GROBBEE, D. E.: Level of fibrinogen and risk of fatal and non-fatal stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe. In: *J Epidemiol Community Health* 56 Suppl 1 (2002), Feb, S. i14–i18
- [19] BREIL, I. ; KOCH, T. ; GOLDBERG, S. ; NEUHOF, H. ; ACKERN, K. van: Influence of B2 receptor antagonists on bradykinin-induced vasodilation and edema formation in isolated rabbit hindlimbs. In: *Inflamm Res* 44 (1995), May, Nr. 5, S. 212–216
- [20] BROWN, N. J. ; RAY, W. A. ; SNOWDEN, M. ; GRIFFIN, M. R.: Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema. In: *Clin Pharmacol Ther* 60 (1996), Jul, Nr. 1, 8–13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9236\(96\)90161-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9236(96)90161-7). – DOI 10.1016/S0009-9236(96)90161-7
- [21] BROWN, N. J. ; SNOWDEN, M. ; M.R., G. : Recurrent angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. In: *JAMA* 278 (1997), S. 232–233
- [22] BROWN, N. J. ; STATON, C. A. ; RODGERS, G. R. ; CORKE, K. P. ; UNDERWOOD, J. C. E. ; LEWIS, C. E.: Fibrinogen E fragment selectively disrupts the vasculature and inhibits the growth of tumours in a syngeneic murine model. In: *Br J Cancer* 86 (2002), Jun, Nr. 11, 1813–1816. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6600320>. – DOI 10.1038/sj.bjc.6600320
- [23] BUCZKO, W. : Effect of fibrinogen degradation products on the rat blood vessels. In: *Acta Physiol Pol* 28 (1977), Nr. 2, S. 153–159
- [24] BUSSE, R. ; FLEMING, I. : Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. In: *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003), Jan, Nr. 1, S. 24–29
- [25] BYRD, J. B. ; ADAM, A. ; BROWN, N. J.: Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. In: *Immunol Allergy Clin North Am* 26 (2006),

Nov, Nr. 4, 725–737. <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2006.08.001>. – DOI 10.1016/j.iac.2006.08.001

- [26] BYRNE, T. J. ; DOUGLAS, D. D. ; LANDIS, M. E. ; HEPPELL, J. P.: Isolated visceral angioedema: an underdiagnosed complication of ACE inhibitors? In: *Mayo Clin Proc* 75 (2000), Nov, Nr. 11, S. 1201–1204
- [27] BYZOVA, T. V. ; RABBANI, R. ; D'SOUZA, S. E. ; PLOW, E. F.: Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. In: *Thromb Haemost* 80 (1998), Nov, Nr. 5, S. 726–734
- [28] CHASE, M. P. ; FIARMAN, G. S. ; SCHOLZ, F. J. ; MACDERMOTT, R. P.: Angioedema of the small bowel due to an angiotensin-converting enzyme inhibitor. In: *J Clin Gastroenterol* 31 (2000), Oct, Nr. 3, S. 254–257
- [29] CHEN, L. : Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Regulates Proliferation and Growth Inhibition by Nitric Oxide in Vascular Smooth Muscle Cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (2004), S. 1403–1408
- [30] CHESTER, A. H. ; O'NEIL, G. S. ; TADJKARIMI, S. ; PALMER, R. M. ; MONCADA, S. ; YACOUB, M. H.: The role of nitric oxide in mediating endothelium dependent relaxations in the human epicardial coronary artery. In: *Int J Cardiol* 29 (1990), Dec, Nr. 3, S. 305–309
- [31] CHIU, A. G. ; KROWIAK, E. J. ; DEEB, Z. E.: Angioedema associated with angiotensin II receptor antagonists: challenging our knowledge of angioedema and its etiology. In: *Laryngoscope* 111 (2001), Oct, Nr. 10, S. 1729–1731
- [32] CHRYSANT, S. G. ; CHRYSANT, G. S.: Pharmacological profile and clinical use of moexipril. In: *Expert Rev Cardiovasc Ther* 1 (2003), Sep, Nr. 3, 345–352. <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.1.3.345>. – DOI 10.1586/14779072.1.3.345
- [33] COLLER, B. S. ; SHATTIL, S. J.: The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIbbeta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. In: *Blood* 112 (2008), Oct, Nr. 8, 3011–3025. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-06-077891>. – DOI 10.1182/blood-2008-06-077891

- [34] CRUDEN, N. L. M. ; WITHEROW, F. N. ; WEBB, D. J. ; FOX, K. A. A. ; NEWBY, D. E.: Bradykinin contributes to the systemic hemodynamic effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Jun, Nr. 6, 1043–1048. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000129331.21092.1d>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000129331.21092.1d
- [35] DEAN, D. E. ; SCHULTZ, D. L. ; POWERS, R. H.: Asphyxia due to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor mediated angioedema of the tongue during the treatment of hypertensive heart disease. In: *J Forensic Sci* 46 (2001), Sep, Nr. 5, S. 1239–1243
- [36] DECARIE, A. ; ADAM, A. ; COUTURE, R. : Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9] BK in carrageenan-induced edema. In: *Peptides* 17 (1996), S. 1009–1015
- [37] DEMIDOV, V. V.: 65th birthday of Edwin M. Southern, molecular biology and biotechnology mastermind. In: *Drug Discov Today* 8 (2003), Aug, Nr. 15, S. 666–667
- [38] DUPASQUIER, E. : [A rare clinical form of angioneurotic edema caused by enalapril: acute abdomen]. In: *Arch Mal Coeur Vaiss* 87 (1994), Oct, Nr. 10, S. 1371–1374
- [39] FAROUQUE, H. M. O. ; WORTHLEY, S. G. ; MEREDITH, I. T. ; SKYRME-JONES, R. A. P. ; ZHANG, M. J.: Effect of ATP-sensitive potassium channel inhibition on resting coronary vascular responses in humans. In: *Circ Res* 90 (2002), Feb, Nr. 2, S. 231–236
- [40] FUJITA, A. ; KURACHI, Y. : Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. In: *Pharmacol Ther* 85 (2000), Jan, Nr. 1, S. 39–53
- [41] FURCHGOTT, R. F. ; CHERRY, P. D. ; ZAWADZKI, J. V. ; JOTHIANANDAN, D. : Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2 (1984), S. S336–S343

- [42] FURCHGOTT, R. : The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. In: *Trends Pharmacol Sci* 2 (1981), S. 173–176
- [43] GE, M. ; RYAN, T. J. ; LUM, H. ; MALIK, A. B.: Fibrinogen degradation product fragment D increases endothelial monolayer permeability. In: *Am J Physiol* 261 (1991), Oct, Nr. 4 Pt 1, S. L283–L289
- [44] GIBBS, C. ; LIP, G. ; BEEVERS, D. : Angioedema due to ACE inhibitors: increased risk in patients of African origin. In: *Br J Clin Pharmacol* 48 (1999), S. 861–865
- [45] GOLLEDGE, J. ; TURNER, R. ; HARLEY, S. ; SPRINGALL, D. ; POWELL, J. : Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. In: *J. Clin. Invest.* 99 (1997), S. 2719–2726
- [46] GRANT, N. N. ; DEEB, Z. E. ; CHIA, S. H.: Clinical experience with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. In: *Otolaryngol Head Neck Surg* 137 (2007), Dec, Nr. 6, 931–935. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2007.08.012>. – DOI 10.1016/j.otohns.2007.08.012
- [47] GÖRING, H.-D. : [In memory of the 160(th) birthday and the 80(th) anniversary of the death of Heinrich Irenäus Quincke, as well as of his description of angioedema 120 years ago]. In: *Hautarzt* 53 (2002), Dec, Nr. 12, 822–825. <http://dx.doi.org/10.1007/s00105-002-0428-7>. – DOI 10.1007/s00105-002-0428-7
- [48] HALL, J. M.: Bradykinin receptors. In: *Gen Pharmacol* 28 (1997), Jan, Nr. 1, S. 1–6
- [49] HARDING, A. : Sir Edwin Southern: scientist as problem solver. In: *Lancet* 366 (2005), Dec, Nr. 9501, 1919. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67775-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67775-6). – DOI 10.1016/S0140-6736(05)67775-6
- [50] HARLEY, S. L. ; STURGE, J. ; POWELL, J. T.: Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (2000), Mar, Nr. 3, S. 652–658

- [51] HELLEBRAND, M.-C. ; KOJDA, G. ; HOFFMANN, T. K. ; BAS, M. : [Angioedema due to ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists]. In: *Hautarzt* 57 (2006), Sep, Nr. 9, 808–810. <http://dx.doi.org/10.1007/s00105-005-1046-y>. – DOI 10.1007/s00105-005-1046-y
- [52] HERRICK, S. ; BLANC-BRUDE, O. ; GRAY, A. ; LAURENT, G. : Fibrinogen. In: *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999), Jul, Nr. 7, S. 741–746
- [53] HICKS, R. C. ; ELLIS, M. ; MIR-HASSEINE, R. ; HIGMAN, D. J. ; NOTT, D. ; GREENHALGH, R. M. ; POWELL, J. T.: The influence of fibrinogen concentration on the development of vein graft stenoses. In: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9 (1995), May, Nr. 4, S. 415–420
- [54] HICKS, R. C. ; GOLLEDGE, J. ; MIR-HASSEINE, R. ; POWELL, J. T.: Vasoactive effects of fibrinogen on saphenous vein. In: *Nature* 379 (1996), Feb, Nr. 6568, 818–820. <http://dx.doi.org/10.1038/379818a0>. – DOI 10.1038/379818a0
- [55] HICKS, R. C. ; MOSS, J. ; HIGMAN, D. J. ; GREENHALGH, R. M. ; POWELL, J. T.: The influence of diabetes on the vasomotor responses of saphenous vein and the development of infra-inguinal vein graft stenosis. In: *Diabetes* 46 (1997), Jan, Nr. 1, S. 113–118
- [56] HOWES, L. G. ; CHRISTIE, N. : Angiotensin receptor antagonists and ACE inhibitors. In: *Aust Fam Physician* 27 (1998), Oct, Nr. 10, S. 914–7, 919–21
- [57] HOWES, L. G. ; TRAN, D. : Can angiotensin receptor antagonists be used safely in patients with previous ACE inhibitor-induced angioedema? In: *Drug Saf* 25 (2002), Nr. 2, S. 73–76
- [58] IBARRA-ALVARADO, C. ; GALLE, J. ; MELICHAR, V. O. ; MAMEGHANI, A. ; SCHMIDT, H. H. H. W.: Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. In: *Mol Pharmacol* 61 (2002), Feb, Nr. 2, S. 312–319
- [59] IGNARRO, L. J. ; BUGA, G. M. ; WOOD, K. S. ; BYRNS, R. E. ; CHAUDHURI, G. : Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Dec, Nr. 24, S. 9265–9269

- [60] IRONS, B. K. ; KUMAR, A. : Valsartan-induced angioedema. In: *Ann Pharmacother* 37 (2003), Nr. 7-8, S. 1024–1027
- [61] JACKSON, E. K. ; LAURENCE L. BRUNTON, P. (Hrsg.): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGRAW-HILL, Medical Publishing Division, 2006
- [62] JANDL, J. : *Blood: Textbook of Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1996
- [63] KAPLAN, A. P. ; GREAVES, M. W.: Angioedema. In: *J Am Acad Dermatol* 53 (2005), Sep, Nr. 3, 373–88; quiz 389-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2004.09.032>. – DOI 10.1016/j.jaad.2004.09.032
- [64] KARABUCAK, B. ; WALSCH, H. ; JOU, Y. ; SIMCHON, S. ; KIM, S. : The role of endothelial nitric oxide in the substance P induced vasodilation in bovine dental pulp. In: *Journal of Endodontics* 31 (2005), S. 733–736
- [65] KITAMURA, Y. ; OKAMURA, T. ; KANI, K. ; TODA, N. : Nitric oxide-mediated retinal arteriolar and arterial dilatation induced by substance P. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (1993), Sep, Nr. 10, S. 2859–2865
- [66] KLEDE, M. ; CLOUGH, G. ; LISCHETZKI, G. ; SCHMELZ, M. : The effect of the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine-methyl ester on neuropeptide-induced vasodilation and protein extravasation in human skin. In: *J Vasc Res* 40 (2003), S. 105–114
- [67] KLINKE, R. ; SILBERNAGEL, S. ; KLINKE, S. (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, 1994
- [68] KOJDA, G. ; BEHNE, M. ; HAFNER, D. ; WILHELM, D. ; KOJDA, G. (Hrsg.): *Pharmakologie Toxikologie Systematisch 2ed.* UNI-MED Ag, 2002
- [69] KOKUBO, T. ; UCHIDA, H. ; CHOI, E. T.: Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. In: *J Vasc Surg* 45 Suppl A (2007), Jun, A33–A38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2007.02.069>. – DOI 10.1016/j.jvs.2007.02.069
- [70] LANDMESSER, U. ; DREXLER, H. : Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide. In: *J Hypertens*

- Suppl* 24 (2006), Mar, Nr. 1, S39–S43. <http://dx.doi.org/10.1097/01.hjh.0000220405.38622.23>. – DOI 10.1097/01.hjh.0000220405.38622.23
- [71] LANG, G. : *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer Vienna, 2006. – 159–236 S.
- [72] LANGE, M. ; MORELLI, A. ; WESTPHAL, M. : Inhibition of potassium channels in critical illness. In: *Curr Opin Anaesthesiol* 21 (2008), Apr, Nr. 2, 105–110. <http://dx.doi.org/10.1097/ACO.0b013e3282f3ad74>. – DOI 10.1097/ACO.0b013e3282f3ad74
- [73] LEVENSON, J. ; GIRAL, P. ; MEGNIEN, J. L. ; GARIEPY, J. ; PLAINFOSSE, M. C. ; SIMON, A. : Fibrinogen and its relations to subclinical extracoronary and coronary atherosclerosis in hypercholesterolemic men. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997), Jan, Nr. 1, S. 45–50
- [74] LEVENSON, J. ; GIRAL, P. ; RAZAVIAN, M. ; GARIEPY, J. ; SIMON, A. : Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (1995), Sep, Nr. 9, S. 1263–1268
- [75] LÖFFLER, G. ; PETRIDES, E. ; HEINRICH, P. ; LÖFFLER, G. (Hrsg.) ; PETRIDES, E. (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 2004
- [76] LO, S. K. ; VECCHIO, P. J. D. ; LUM, H. ; MALIK, A. B.: Fibrin contact increases endothelial permeability to albumin. In: *J Cell Physiol* 151 (1992), Apr, Nr. 1, 63–70. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1041510111>. – DOI 10.1002/jcp.1041510111
- [77] LOMINADZE, D. ; TSAKADZE, N. ; SEN, U. ; FALCONE, J. C. ; D'SOUZA, S. E.: Fibrinogen and fragment D-induced vascular constriction. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (2005), Mar, Nr. 3, S. H1257–H1264
- [78] LORD, S. T.: Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. In: *Curr Opin Hematol* 14 (2007), May, Nr. 3, 236–241. <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280dce58c>. – DOI 10.1097/MOH.0b013e3280dce58c
- [79] MANCINI, G. B. ; HENRY, G. C. ; MACAYA, C. ; O'NEILL, B. J. ; PUCILLO, A. L. ; CARERE, R. G. ; WARGOVICH, T. J. ; MUDRA, H. ; LÜSCHER, T. F. ; KLIBANER, M. I. ; HABER, H. E. ; UPRICHARD, A. C. ; PEPINE, C. J. ; PITT, B. :

Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. In: *Circulation* 94 (1996), Aug, Nr. 3, S. 258–265

- [80] MARESCA, G. ; BLASIO, A. D. ; MARCHIOLI, R. ; MINNO, G. D.: Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999), Jun, Nr. 6, S. 1368–1377
- [81] McDOWELL, S. E. ; COLEMAN, J. J. ; FERNER, R. E.: Systematic review and meta-analysis of ethnic differences in risks of adverse reactions to drugs used in cardiovascular medicine. In: *BMJ* 332 (2006), May, Nr. 7551, 1177–1181. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.38803.528113.55>. – DOI 10.1136/bmj.38803.528113.55
- [82] MEADE, T. W. ; NORTH, W. R. ; CHAKRABARTI, R. ; STIRLING, Y. ; HAINES, A. P. ; THOMPSON, S. G. ; BROZOVIEĆ, M. : Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. In: *Lancet* 1 (1980), May, Nr. 8177, S. 1050–1054
- [83] MESSERLI, F. H. ; NUSSBERGER, J. : Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. In: *Lancet* 356 (2000), Aug, Nr. 9230, 608–609. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02596-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02596-4). – DOI 10.1016/S0140-6736(00)02596-4
- [84] MICHALK, E. Dietrich; S. Dietrich; Schönau ; MISCHALK (Hrsg.): *Differentialdiagnose Pädiatrie*. Elsevier, 2004
- [85] MONTALESCOT, G. ; COLLET, J. P. ; CHOUSSAT, R. ; THOMAS, D. : Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease. In: *Eur Heart J* 19 Suppl H (1998), Jul, S. H11–H17
- [86] MOSESSON, M. W.: Fibrinogen and fibrin structure and functions. In: *J Thromb Haemost* 3 (2005), Aug, Nr. 8, 1894–1904. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x
- [87] MUELLER-ECKHARDT, V. Christian; K. Christian; Kiefel: *Transfusionsmedizin Grundlagen - Therapie - Methodik*. Springer, 2004

- [88] MURAD, F. ; LEITMAN, D. C. ; BENNETT, B. M. ; MOLINA, C. ; WALDMAN, S. A.: Regulation of guanylate cyclase by atrial natriuretic factor and the role of cyclic GMP in vasodilation. In: *Am J Med Sci* 294 (1987), Sep, Nr. 3, S. 139–143
- [89] N.N.: *Chemtool*. <http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/~martin/chemtool/>
- [90] N.N.: *Fibrinogen*. <http://www.pathologyoutlines.com/coagulation.html>
- [91] N.N.: *Fibrinogen*. <http://www.sigmaaldrich.com>
- [92] N.N.: *GraphPad Prism*. <http://www.graphpad.com/prism/>
- [93] N.N.: *Homepage Deutsche HAE-Vereinigung*. <http://www.schwellung.de>
- [94] N.N.: *Pharmazeutische-Zeitung*. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/fileadmin/nrf/PDF/1-Poloxamere.pdf>
- [95] NUSSBERGER, J. ; CUGNO, M. ; CICARDI, M. : Bradykinin-mediated angioedema. In: *N Engl J Med* 347 (2002), Aug, Nr. 8, 621–622. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200208223470820>. – DOI 10.1056/NEJM200208223470820
- [96] OUDIT, G. ; GIRGRAH, N. ; ALLARD, J. : ACE inhibitor-induced angioedema of the intestine: Case report, incidence, pathophysiology, diagnosis and management. In: *Can J Gastroenterol* 15 (2001), Dec, Nr. 12, S. 827–832
- [97] PALMER, R. M. ; FERRIGE, A. G. ; MONCADA, S. : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. In: *Nature* 327 (1987), Nr. 6122, 524–526. <http://dx.doi.org/10.1038/327524a0>. – DOI 10.1038/327524a0
- [98] PYLYPCHUK, G. B.: ACE inhibitor- versus angiotensin II blocker-induced cough and angioedema. In: *Ann Pharmacother* 32 (1998), Oct, Nr. 10, S. 1060–1066
- [99] SCARABIN, P.-Y. ; ARVEILER, D. ; AMOUYEL, P. ; SANTOS, C. D. ; EVANS, A. ; LUC, G. ; FERRIÈRES, J. ; JUHAN-VAGUE, I. ; MYOCARDIAL INFARCTION, P. E. S.: Plasma fibrinogen explains much of the difference in risk of coronary heart disease between France and Northern Ireland. The PRIME study. In: *Atherosclerosis* 166 (2003), Jan, Nr. 1, S. 103–109

- [100] SCHILLINGER, M. ; EXNER, M. ; MLEKUSCH, W. ; RUMPOLD, H. ; AHMADI, R. ; SABETI, S. ; WAGNER, O. ; MINAR, E. : Fibrinogen predicts restenosis after endovascular treatment of the iliac arteries. In: *Thromb Haemost* 87 (2002), Jun, Nr. 6, S. 959–965
- [101] SCHUSTER, C. ; REINHART, W. H. ; HARTMANN, K. ; KUHN, M. : [Angioedema induced by ACE inhibitors and angiotensin II-receptor antagonists: analysis of 98 cases]. In: *Schweiz Med Wochenschr* 129 (1999), Mar, Nr. 9, S. 362–369
- [102] SIESS, W. : Cross-talk of cGMP- and cAMP-signaling pathways in human platelets. In: *inside blood* 101 (2003), June, Nr. 11, S. 4230
- [103] SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J Mol Biol* 98 (1975), Nov, Nr. 3, S. 503–517
- [104] SPAHN, T. ; GROSSE-THIE, W. ; MUELLER, M. : Endoscopic Visualization of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor-induced Small Bowel Angioedema as a Cause of Relapsing Abdominal Pain using Double-balloon Enteroscopy. In: *Dig Dis Sci* (2008), Mar. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-007-9877-2>. – DOI 10.1007/s10620-007-9877-2
- [105] STEVENS, T. ; GARCIA, J. G. ; SHASBY, D. M. ; BHATTACHARYA, J. ; MALIK, A. B.: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (2000), Sep, Nr. 3, S. L419–L422
- [106] STOUFFER, G. A. ; SMYTH, S. S.: Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Nov, Nr. 11, 1971–1978. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000093470.51580.0F>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000093470.51580.0F
- [107] SURAPISITCHAT, J. ; JEON, K.-I. ; YAN, C. ; BEAVO, J. A.: Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. In: *Circ Res* 101 (2007), Oct, Nr. 8, 811–818. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.154229>. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.107.154229

- [108] TAGAWA, T. ; MOHRI, M. ; TAGAWA, H. ; ET AL: Role of nitric oxide in substance P-induced vasodilation differs between the coronary and forearm circulation in humans. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 29 (1997), S. 546–543
- [109] TERAMOTO, N. : Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. In: *J Physiol* 572 (2006), May, Nr. Pt 3, 617–624. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.105973>. – DOI 10.1113/jphysiol.2006.105973
- [110] VAVARICKA, S. ; BALLMER, P. ; HALLER, A. : Angioödem der Zunge nach ACE-Hemmer-Therapie. In: *Schweiz Med Forum* 6 (2002), S. 131–
- [111] VLEEMING, W. ; ET AL.: ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management. In: *Drug Saf* 18 (1998), S. 171–188
- [112] WALDFAHRER, F. ; IRO, H. : Rezidivierende Angioödeme durch C1-Inhibitor-Mangel- Erstickungsrisiko: "Differentialdiagnostische Ergänzung". In: *Deutsches Ärzteblatt* 36 (1997), S. A–2265/B–1933/C–1816
- [113] WALDFAHRER, F. ; LEUWER, A. ; KRAUSE, J. ; IRO, H. : Schweres oropharyngeales Angioödem durch ACE-Hemmer. In: *HNO* 43 (1995), S. 35–38
- [114] WALTER, U. : Functional role of cGMP-dependent VASP phosphorylation in vascular cells. In: *BMC Pharmacology* 5 (2005)
- [115] WILHELMSSEN, L. : Synergistic effects of risk factors. In: *Clin Exp Hypertens A* 12 (1990), Nr. 5, S. 845–863
- [116] WILHELMSSEN, L. ; SVÄRDSUDD, K. ; KORSAN-BENGTSEN, K. ; LARSSON, B. ; WELIN, L. ; TIBBLIN, G. : Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. In: *N Engl J Med* 311 (1984), Aug, Nr. 8, S. 501–505
- [117] XIE, L. : Role of intracellular calcium and tyrosine phosphorylation in adhesion of cultured vascular smooth muscle cells to fibrinogen. In: *Cardiovasc Res* 39 (1998), S. 475–484
- [118] XIONG, J.-P. ; STEHLE, T. ; ZHANG, R. ; JOACHIMIAK, A. ; FRECH, M. ; GOODMAN, S. L. ; ARNAOUT, M. A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. In: *Science* 296

(2002), Apr, Nr. 5565, 151–155. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069040>.
– DOI 10.1126/science.1069040