

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

# Über die vasomotorischen Wirkungen des Akute-Phase-Proteins Fibrinogen auf humane arterielle Gefäße

- eine experimentelle Studie -

## Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

Vera Susanne Ennekes

2012

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

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

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Kojda

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Heiß

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Bradykinin-induzierte Angioödeme.....	9
1.2 Fibrinogen .....	14
<b>2 Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1 Untersuchungsobjekte und Präparation .....	18
3.1.1 Arteria umbilicalis .....	18
3.1.2 Arteria mammaria interna.....	18
3.2 Bezug der verwendeten Chemikalien.....	20
3.3 Pufferlösungen .....	20
3.3.1 PBS-Puffer .....	20
3.3.2 HEPES-Puffer .....	21
3.4 Versuchsaufbau .....	21
3.4.1 Apparatur und Instrumente .....	21
3.4.2 Nährmedium im Organbad .....	23
3.5 Versuchsablauf .....	23
3.5.1 Kalibrierung .....	24
3.5.2 Einhängen .....	24
3.5.3 Äquilibrierung .....	25
3.5.4 Kontraktionstest .....	25
3.5.5 Endotheltest .....	26
3.5.5.1 A. umbilicalis .....	26
3.5.5.2 A. mammaria interna .....	26
3.5.6 Dosis-Wirkungs-Kurven .....	27

3.5.7	Kaliumchlorid.....	27
3.5.8	Phenylephrin .....	27
3.5.9	Serotonin.....	27
3.5.10	Prostaglandin F <sub>2α</sub> .....	27
3.5.11	Acetylcholin .....	28
3.5.12	Bradykinin .....	28
3.5.13	Fibrinogen .....	28
<b>4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
5.1	Kaliumchlorid.....	30
5.2	Phenylephrin .....	30
5.3	Serotonin.....	31
5.4	Prostaglandin F <sub>2α</sub> .....	32
5.5	Acetylcholin .....	33
5.6	Endotheltests .....	34
5.6.1	A. umbilicalis .....	35
5.6.2	A. mammaria interna.....	36
5.7	Bradykinin .....	37
5.8	Fibrinogen .....	38
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>40</b>
6.1	A. umbilicalis .....	40
6.2	A. mammaria interna.....	41
6.3	Bradykinin .....	42
6.4	Fibrinogen .....	45
6.5	Abciximab.....	48

6.6	Weiterführende Untersuchungen .....	49
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Georg Kojda für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Laborräume, die stetige konstruktive Kritik, die Korrektur dieser Dissertation und den geduldigen Rat in allen Fragen, die die Arbeit an dieser aufwarf.

Herrn Doktor med. Murat Bas danke ich für den Kontakt zur Arbeitsgruppe sowie für viele nützliche Hinweise.

Ich danke den Mitarbeitern der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf sowie dem Team der Universitätsklinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie Düsseldorf für das hilfsbereite Engagement bei der Bereitstellung der benötigten Gefäße.

Den Mitarbeitern der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie und insbesondere Herrn Ing. grad. Jürgen Springer danke ich für stets rasche Hilfe bei Problemen im Laboralltag.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den kollegialen Umgang.

Herrn Daniel Estévez Prado danke ich für seinen fachmännischen Rat, besonders bei der Bildver- und -bearbeitung, sowie für seine unterstützenden Worte.

Herrn Doktor med. Heiko Hang danke ich herzlich für den ebenso beharrlichen wie freundschaftlichen Nachdruck, mit dem er die Fertigstellung dieser Dissertation begleitet hat, und die vielen motivierenden Gespräche.

Herrn Elvis Čelebić danke ich vor allem für seine treue Freundschaft, seine Unterstützung in allen Lebenslagen und seinen unerschütterlichen Glauben an mich. Aber auch für seinen unermüdlichen Rat und seine stets umgehende Hilfe bei technischen Problemen möchte ich ihm von Herzen danken.

Außerdem gilt mein Dank in ganz besonderem Maße meinen lieben Eltern, die mich stets so liebevoll auf meinem Weg begleitet, mir das Medizinstudium und damit auch diese Dissertation in jeder Hinsicht erst ermöglicht haben und mir immer eine unverzichtbare Stütze waren und bleiben werden.

# Abkürzungsverzeichnis

µ	Mikro
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AAE	Acquired Angioedema, erworbene Angioödem
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme, Angiotensin-Konversions-Enzym
ACEH	Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer
ACh	Acetylcholin
ANOVA	Analyse of Variance
AÖ	Angioödem
Aqua dest.	Aqua destillatum
AT	Angiotensin
AT <sub>1</sub>	Angiotensin Typ 1-Rezeptor
AT <sub>2</sub>	Angiotensin Typ 2-Rezeptor
AT-II	Angiotensin II
bzw.	beziehungsweise
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid-dihydrat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
D	Dalton
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
E.	Endothel
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor, endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor
EDRF	Endothelium Dependent Relaxing Factor, endothelabhängiger relaxierender Faktor
engl.	englisch
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HAE	Hereditary Angioedema, hereditäres Angioödem
HCI	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HSVECs	Human Saphenous Vein Endothelial Cells, humane Endothelzellen der V. saphena magna
HUA	Human Umbilical Artery, Arteria umbilicalis
IAE	Idiopathic Angioedema, idiopathisches Angioödem
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IMA	Internal Mammary Artery, Arteria mammaria interna
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

$\text{KHCO}_3$	Kaliumhydrogencarbonat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
l	Liter
log	Logarithmus
L-NAME	$\text{N}_{\omega}\text{-Nitro-L-Arginin-Methylester}$
m	milli
M	Molar
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumsulfat-heptahydrat
min	Minute
N	Newton
n	nano
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid
$\text{O}_2$	Sauerstoff
p.i.	per inhalationem
PAE	Pseudoallergic Angioedema, pseudoallergisches Angioödem
PBS	Phosphate buffered saline
$\text{pCO}_2$	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PhE	Phenylephrin
PIGF	Placental Growth Factor
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie
R.	Ramus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAE	Renin-Angiotensin-Aldosterone-Blocker induced Angioedema, Renin-Angiotensin-Aldosteron-Blocker induziertes Angioödem
rh	rekombinanter humaner
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwertes
sFlt1	fms-like Tyrosinkinase 1
SMC	human vascular Smooth Muscle Cells, humane glatte Gefäßmuskelzellen
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Bradykinin-induzierte Angioödeme

Angiotensin-Converting-Enzyme-(ACE) Hemmer gehören zu den am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln bei der Therapie der arteriellen Hypertonie [10]; [77]. ACE, ein Glykoprotein, ist hauptsächlich an der luminalen Gefäßwand sowie in Alveolen lokalisiert und spaltet vom carboxyterminalen Ende des biologisch unwirksamen Angiotensin I ein Dipeptid ab, wodurch Angiotensin II entsteht. Angiotensin II wirkt sowohl durch direkte Interaktion mit der Gefäßmuskulatur als auch durch Aktivierung des adrenergen Systems vasokonstriktorisch und steigert die Aldosteronsekretion, wodurch es zur Natrium- und Wasserretention führt. ACE wird allgemeiner auch noch Dipeptidylcarboxypeptidase oder Kininase II genannt, da ACE nicht nur spezifisch Angiotensin umsetzt, sondern durch Dipeptid-Abspaltung auch Bradykinin inaktiviert. Bei ACE-Inhibition kommt es zu einer Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und damit zu einer Senkung des Vasotonus, einer Minderung der Natriumretention und in der Folge zur erwünschten Blutdrucksenkung. Aber auch Bradykinin wird nun nicht mehr ausreichend abgebaut (Abb. 1.3). Bei Akkumulation in der Bronchialschleimhaut kann es daher auch relativ häufig als unerwünschte Wirkung zum trockenen Reizhusten kommen [43]; [47]; [54]; [83]. Weitere bekannte, häufigere Nebenwirkungen der ACE-Hemmer (ACEH) sind Schwindel, Schwächegefühl, Hyperkaliämie, Kopfschmerzen und Übelkeit [119]; [129]; [140]; [180].

Eine sehr ernste und unter Umständen lebensbedrohliche, wenn auch seltene Komplikation der Medikation mit ACEH ist das Angioödem (AÖ). Unter einem Angioödem versteht man generell eine Schwellung der Subkutis bzw. der Submukosa der Haut und Schleimhäute. Eine Analyse von Fallberichten aus den Jahren 1980 – 1997 zeigte eine Inzidenz von 0,1 – 0,2 % des AÖ aller Patienten mit ACEH-Einnahme [195]. Diese Zahlen finden sich mehrfach in der Literatur, mit Hinweisen auf Unterschiede zwischen den Geschlechtern und ethnischen Gruppen [35]; [60]; [83]; [109]; [135]; [153]. Andere Untersuchungen gehen von einer etwas höheren Inzidenz von bis zu 0,7 % aus [47]; [155]. Der Schweregrad des Ödems

variert dabei von einer diskreten Schwellung von Augenlidern, Zunge oder Lippen wie in Abb. 1.1 a) und b) bis zur massiven Schwellung der Schleimhaut im Bereich von Zungengrund und Kehlkopf mit kompletter Verlegung der Atemwege [15]; [46]; [57]; [66]; [153]. Auch Ödeme des Gastrointestinaltrakts und der Genitalregion wurden beschrieben [68]; [115]; [136]. Das Ödem persistierte dabei unterschiedlich lange und rezidierte in einigen Fällen [10]; [15]; [31]; [162].

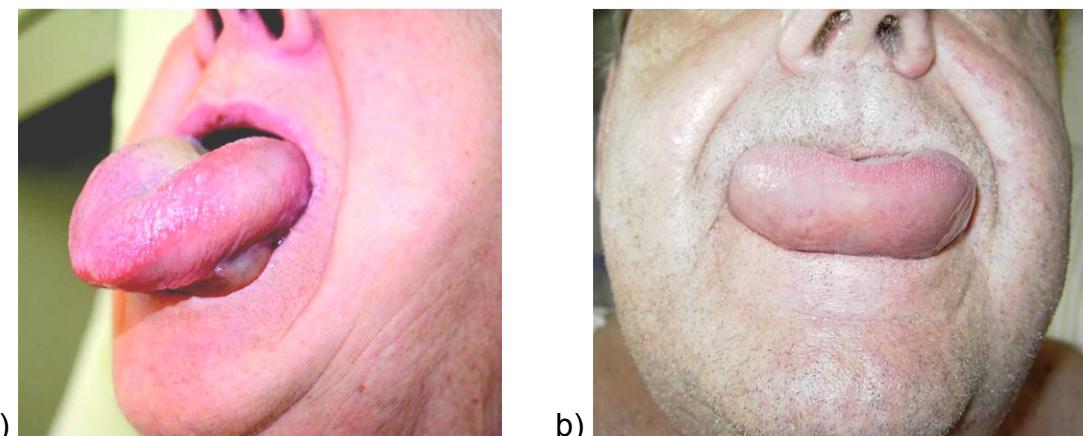


Abb. 1.1 a) und b): Patienten mit massiver Zungenschwellung aus a) [12] und b) [13]

Abb. 1.2 zeigt den zeitlichen Ablauf des Auftretens eines ACEH-induzierten AÖ nach Beginn der Medikation. Man sieht deutlich, dass das AÖ erst mit einer gewissen zeitlichen Latenz auftritt, was eine Ätiologie aufgrund einer reinen Unverträglichkeitsreaktion oder eines allergischen Geschehens unwahrscheinlich macht.

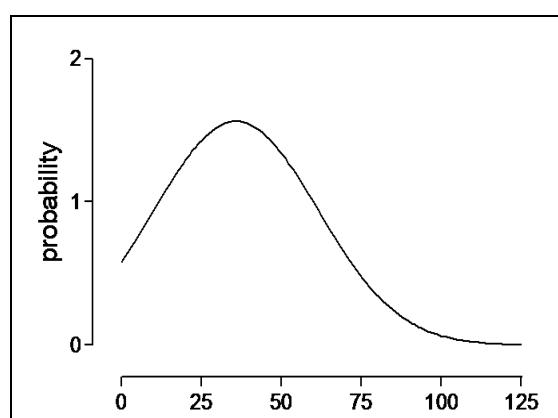


Abb. 1.2: Erstmanifestation des ACEH-induzierten AÖ nach Beginn der Medikation in Monaten aus [11]

Außerdem verdeutlicht die Grafik die besondere klinische Herausforderung, einen Zusammenhang zwischen einem auftretenden AÖ und einer bereits länger bestehenden ACEH-Therapie herzustellen [3]; [15]; [109]; [162]; [169]. Anamnestische Fragen nach neu begonnenen Arzneimitteltherapien greifen hier zu kurz.

Das Krankheitsbild des AÖ wurden erstmals 1882 durch Quincke beschrieben [64]. Generell kann man allergische, das heißt Immunglobulin E-vermittelte, und nicht-allergische AÖ unterscheiden. Eine Sonderrolle bei den nicht-allergischen AÖ nimmt das hereditäre AÖ als einzige angeborene Form ein, wobei man noch zwei weitere Typen unterscheidet.

<b>Formen des nicht-allergischen Angioödems</b>				
<b>IAE</b>	<b>PAE</b>	<b>RAE</b>	<b>HAE</b>	<b>AAE</b>
<b>Induktoren</b>				
unbekannt	Medikamente z.B. NSAR	Medikamente: ACEH, AT1- Blocker	C1-Esterase- Inhibitor- Mangel	erworbene Lymphome
<b>Mediatoren</b>				
unbekannt	Cysteinyl- Leukotriene	Bradykinin	Bradykinin	Bradykinin
<b>Medikamentöse Behandlung</b>				
Kortikosteroide Epinephrin p.i.	Kortikosteroide Epinephrin p.i.	bisherige Optionen: C1-Esterase-Inhibitoren, Epinephrin p.i., Kortikosteroide; neue Medikamente: Icatibant, Ecallantide, rhC1- Esterase-Inhibitoren		

Tab. 1.1: Formen des nicht-allergischen Angioödems, übersetzt aus [10] (IAE: idiopathisches AÖ, PAE: pseudoallergisches AÖ, RAE: RAAS-Blocker-induziertes AÖ, AAE: acquired = erworbene AÖ, rh = rekombinanter humaner)

Beim hereditären AÖ (HAE) Typ I liegt eine verminderte Sekretion des C1-Esteraseinhibitors (C1-INH) vor, bei Typ II, der häufiger auftritt, wird ein funktionell inaktiver C1-INH synthetisiert. Mediator dieses AÖ ist Bradykinin, wie auch bei einer weiteren Form des nicht-allergischen AÖ, dem erworbenen AÖ bei Lymphomen

(Tab. 1.1). Verschiedene Autoren postulierten, dass Bradykinin auch beim ACEH-induzierten AÖ eine zentrale Rolle spielt [3]; [7]; [23]; [35]; [132]; [153]. Bisher standen hauptsächlich ACEH im Fokus der Untersuchungen des RAE, weswegen sich auch der Begriff des ACEH-induzierten AÖ etabliert hatte. Das RAAS kann jedoch neben ACEH auch durch AT<sub>1</sub>-Blocker (Sartane) gehemmt werden. Diese greifen an anderer Stelle ein und blockieren auf diese Weise nicht direkt den Abbau von Bradykinin (Abb. 1.3).

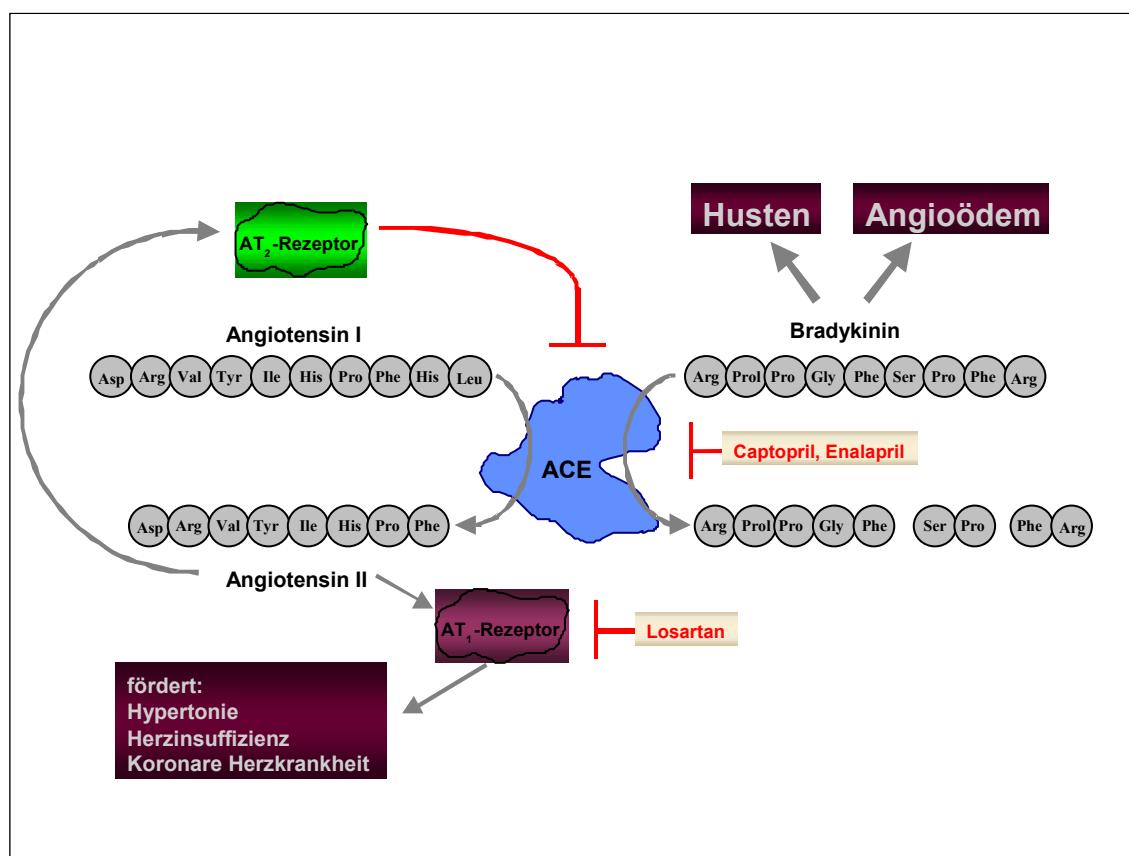


Abb. 1.3: Wirkungsweise der ACEH Captopril und Enalapril sowie des AT<sub>1</sub>-Blockers Losartan. Übersetzt aus [13]

Neuere Studien zeigen allerdings auch nach der Einnahme des AT<sub>1</sub>-Blockers Losartan erhöhte Bradykinin-Spiegel, nicht hingegen bei der Medikation mit Eprosartan [37]. Der Pathomechanismus ist noch nicht abschließend geklärt, diskutiert wird eine Hemmung der ACE durch verstärkte Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors. In der Vergangenheit wurden Sartane nach Auftreten eines ACEH-induzierten AÖ teilweise als alternative Antihypertonika gesehen [79]; [201].

Mittlerweile geht man aber dazu über, von dieser Umstellung abzuraten, da sich auch hier die Berichte über AÖ mehren, teilweise nachdem es bereits unter vorangegangener ACEH-Therapie zu einem AÖ gekommen war [28]; [78]; [155], [199]. Konsequenterweise wurde daher nun der Begriff des RAAS-Blocker-induzierten AÖ (RAE) in der Literatur eingeführt [10]. Der oder die verantwortlichen Mediatoren sind aber weiterhin nicht vollständig bekannt, und es stellt sich die Frage, ob Bradykinin allein die entscheidende Rolle in der Pathogenese des ACEH-induzierten AÖ spielt. Denn es kommt schließlich bei allen Patienten unter ACEH-Einnahme zur Bradykinin-Akkumulation, aber nur bei einem geringen Anteil zur Ausbildung eines AÖ. Auch das Phänomen der zeitlichen Latenz bis zum Auftreten eines AÖ ist dadurch nicht erklärt. Es müssen also Kofaktoren existieren, die es zu identifizieren gilt.

Bei der Untersuchung von Patienten, die aufgrund eines RAE hospitalisiert wurden, wurde zur Evaluierung weiterer prädisponierender Faktoren unter anderem auch der Fibrinogen-Plasmaspiegel bestimmt [15]. Im Vergleich mit Patienten, die aufgrund eines AÖ anderer Genese behandelt wurden, fielen dabei signifikant höhere Werte auf (Abb. 1.4). Eine Leukozytose lag bei diesen Patienten allerdings nicht vor, weswegen der erhöhte Fibrinogen-Plasmaspiegel nicht durch ein infektiöses Geschehen zu erklären war. Auch die Analyse von Komorbiditäten und Komedikation ergab kein richtungsweisendes Muster.

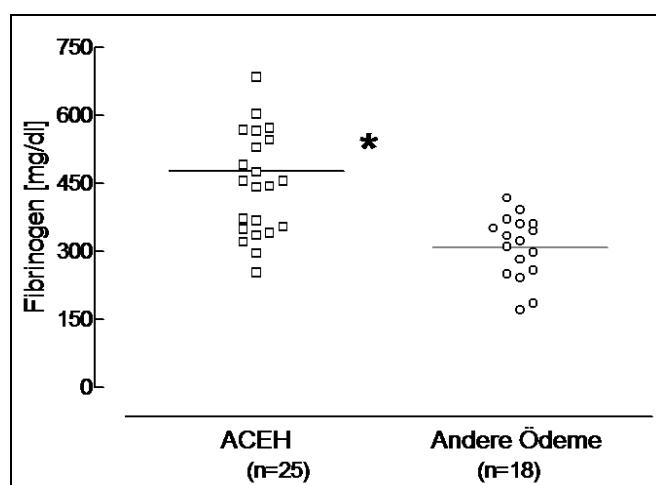


Abb. 1.4: Fibrinogen-Plasmaspiegel bei Patienten mit ACEH-induziertem AÖ und bei Patienten mit Ödemen anderer Genese aus [10]

## 1.2 Fibrinogen

Biochemisch ist Fibrinogen ein großes, dimeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 340 kD und einer Halbwertszeit von 100 Stunden [85]. Es setzt sich aus 3 Paaren von nicht-identischen Polypeptidketten zusammen, der Aα-, Bβ- und γ-Kette, und wird von Hepatozyten Vitamin K-unabhängig synthetisiert. Aus physiologischer Sicht ist es als Faktor I wichtiger Bestandteil des Gerinnungssystems. Es bindet im letzten Schritt, der gemeinsamen Endstrecke von endogener und exogener Gerinnung, an GPIIb/IIIa-Rezeptoren, die als Integrine der Thrombozytenoberfläche aufsitzen [65]. Von der Protease Thrombin wird Fibrinogen dann in eine unlösliche, polymere Faserform, das Fibrin, umgewandelt. Dabei wird von der Aα- und Bβ-Kette je ein Peptid abgespalten, die Fibrinopeptide A und B. Abgebaut wird Fibrin *in vivo* durch Plasmin, wobei lösliche Spaltprodukte gebildet werden. Diese werden wiederum für eine gesteigerte Permeabilität in vorgeschädigtem Gewebe verantwortlich gemacht und tragen zur Granulozyteninvasion im Rahmen von entzündlichen Prozessen bei [173].

Der Normwert für Fibrinogen liegt bei Erwachsenen bei 4,4 – 10,3 µM (180 – 350 mg/dl) [152]. Erhöht ist dieser Wert unter anderem bei akuten („Akute-Phase-Protein“) oder chronischen Entzündungen, und bei Zerstörung der Gewebeintegrität durch Verletzungen und Verbrennungen, nach Operationen sowie im Rahmen von Tumorerkrankungen. Die Einnahme oraler Kontrazeptiva und Steroide können bei der Induktion eines erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegel ebenso eine Rolle spielen wie die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren Zigarettenrauchen, übermäßige Kalorienzufuhr, Diabetes mellitus und zunehmendes Alter [44]; [112]; [118]; [156]. Eine Abnahme ist im Gegenzug unter anderem bei moderatem Alkoholkonsum, bei der Medikation mit Bezafibrat und β-Blockern, aber auch bei regelmäßiger körperlicher Bewegung zu beobachten [73]; [82]; [92]; [94]; [156]; [196]. Diese Beobachtungen wecken eine Assoziation zu kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen und legen nahe, dass Fibrinogen im Zuge arteriosklerotischer Prozesse erhöht oder sogar an der Pathogenese beteiligt und somit ein weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor ist [50]. Wurde zunächst lediglich festgestellt, dass ein erhöhter Fibrinogenwert ein Marker für kardiovaskuläre

Mortalität ist [168], ist in der Folge in der Northwick Park Heart Studie erstmals in einer prospektiven Studie analysiert worden, dass Fibrinogen ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist [91]. Weitere Untersuchungen, unter anderem im Rahmen der Framingham Studie, bestätigen die Rolle des Fibrinogen als Risikofaktor für das Auftreten von Gefäßstenosierungen, rekurrierender Myokardischämien und für Todesfälle aufgrund von koronarer Herzkrankheit (KHK) [18]; [25]; [59]; [88]; [125]; [186]. Kennel stellte darüber hinaus durch seine Beobachtungen fest, dass eine Erhöhung des Fibrinogen-Plasmaspiegels über die Standardabweichung hinaus das Risiko für ein initiales kardiovaskuläres Ereignis um 20 % erhöht [89]. Die Korrelation einer akut hohen Fibrinogen-Konzentration mit dem akuten Koronarsyndrom konstatierten Gil et al. Sie wiesen bei betroffenen Patienten ebenfalls eine Hyperfibrinogenämie nach [61], weswegen Fibrinogen auch als früher Marker myokardialer Ischämie angesehen wird [17]; [149]. In der EUROSTROKE-Studie wurde Fibrinogen als Risikofaktor für Schlaganfälle identifiziert [29]; [104]; [159] und spielt demnach auch bei zerebrovaskulären Erkrankungen eine Rolle [8]; [45].

Während die Rolle des Fibrinogens in Bezug auf das Risiko vaskulärer Erkrankungen bereits Gegenstand intensiver Forschung war, so ist über die direkte vasomotorische Wirkung auf Gefäße bisher wenig bekannt. Eine indirekte Wirkung wurde durch Inkubationsversuche gezeigt. Dabei verstärkte eine Inkubation mit Fibrinogen die Wirkung von Bradykinin, Angiotensin, Acetylcholin und Histamin auf tierische Gefäße [33]; [34] sowie von Serotonin auf humane Basilararterien [51]; [108].

In Bezug auf die Fibrin-Spaltprodukte 6A und 6D wurde an Aorten von Ratten, hinsichtlich des Peptids 6A auch auf Femoralarterien von Hunden, ein relaxierender Effekt beschrieben [111]; [157]. Lominadze et al. beobachteten ebenfalls an Rattenarterien hingegen eine kontraktile Antwort auf die Fibrinogen-Zugabe und postulierten, dass die Kontraktion durch die Bindung an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1) verursacht wurde [106]. ICAM-1 ist ein Immunglobulin-ähnliches Membranprotein, das beispielsweise von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert wird und antiapoptotische Wirkung

besitzt [144]. Die Expression wird durch Medikation mit ACEH vermindert [128]. Fibrinogen selbst stimuliert die Bildung von Zellen der hämatopoetischen und lymphatischen Zellreihe, und vermittelt gleichzeitig die Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel bei inflammatorischen Prozessen durch ICAM-1 [58]; [99]; [192].

Untersuchungen zur vasomotorischen Wirkung von Fibrinogen auf humane Gefäße beschränkten sich bisher auf Venen. Bei der Vena (V.) saphena magna wurde beschrieben, dass niedrige Fibrinogen-Konzentrationen (0 – 2  $\mu$ M) zu einer Vasorelaxation führen, eine Dosiserhöhung jedoch eine Vasokonstriktion hervorruft [74]. Die Vasorelaxation war dabei durch einen K<sup>+</sup>-Kanal-Blocker (Glibenclamid) inhibierbar. Golledge et al. wiesen eine Vasorelaxation der V. saphena magna bei einer Fibrinogen-Konzentration bis 3  $\mu$ M nach, die sich unter arteriellen Flussbedingungen verstärkte und ebenfalls durch Glibenclamid hemmbar war, wobei auch eine Beteiligung von ICAM-1 postuliert wurde [63]. Bei Inkubationsversuchen mit Fibrinogen an humanen Endothelzellen der V. saphena magna (human saphenous vein endothelial cells, HSVECs) wurde eine Zunahme der ICAM-1 Expression beobachtet [69].

In der vorliegenden Arbeit soll erstmals die Charakterisierung der vasomotorischen Wirkung von Fibrinogen auf humane Arterien erfolgen, um mögliche pathogenetische Zusammenhänge zwischen den pathologischen Fibrinogenwerten und der Ausbildung eines AÖ aufzuzeigen.

## 2 Fragestellung

Vorangegangene klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Fibrinogen-Plasmaspiegel bei Patienten mit ACEH induziertem AÖ signifikant erhöht ist. Um die Pathogenese dieser Beobachtung zu klären, sollte in den vorliegenden Untersuchungen eine mögliche Beteiligung von Fibrinogen an der Entstehung des AÖ durch Einfluss auf den Vasotonus überprüft werden.

Zunächst musste geklärt werden, inwieweit sich humane Arterien als Modell für Untersuchungen des Vasotonus im Organbad eignen. Dazu war eine valide Charakterisierung der Vasomotorik der verwendeten Arterien vonnöten. Wichtig war hierbei besonders die Etablierung eines Tests zur Überprüfung des intakten Endothels, um genauere Aussagen über beteiligte Mediatoren an der Vasomotorik treffen zu können.

Außerdem war es nötig zu untersuchen, welche Substanzen auf die verwendeten Arterien einen stabilen konstriktiven Einfluss haben. Dies war einerseits auch für den Endotheltest wichtig, außerdem sollten mögliche Relaxationen messbar gemacht werden, was unbedingt eine gleichmäßige Vorspannung voraussetzt.

Nach diesen vorgeschalteten Experimenten sollte festgestellt werden, welchen Einfluss Bradykinin und Fibrinogen auf den Vasotonus der verwendeten Arterien haben. Dabei wurde mit der Vasodilatation lediglich eine Komponente der Angioödementstehung untersucht. Inwieweit auch die Kapillarpermeabilität eine Rolle bei der Genese eines AÖ spielt, wurde nicht geprüft.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsobjekte und Präparation**

Als Untersuchungsobjekte dienten zwei unterschiedliche Arten humaner Arterien. Zum einen wurden isolierte Arterien embryonaler Herkunft aus Nabelschnüren verwendet, zum anderen Brustwandarterien, also adulte Gefäße, die im Rahmen von koronaren Bypassoperationen präpariert wurden. Für die Nutzung der humanen Gefäße wurde ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Düsseldorf unter der Nummer 2526 (Studienleiter Prof. Dr. G. Kojda) ausgesprochen.

##### **3.1.1 Arteria umbilicalis**

Die Arteriae (Aa.) umbilicales (engl.: human umbilical artery = HUA) sind paarig angelegte Arterien, die in der Nabelschnur die singuläre V. umbilicalis spiralig umfassen. In Zusammenarbeit mit dem Kreißsaalteam wurden von der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf unter Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. Bender freundlicherweise menschliche Nabelschnüre zur Verfügung gestellt. Nach der Abnabelung wurden diese in mit PBS-Puffer (Tab. 3.1) gefüllte Probenbehälter überführt und bis zur Abholung innerhalb von 24 Stunden bei 4°C gekühlt gelagert. Nach dem Transport in das Labor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf erfolgte dort die Präparation. Dafür wurde zunächst ein flacher Styropordeckel mit Plastik bespannt und wenige mm hoch mit HEPES-Puffer (Tab. 3.2) gefüllt. Nun wurden die Nabelschnüre darauf vorsichtig mit sterilen Kanülen fixiert und präpariert. Die Wharton'sche Sulze wurde dazu zunächst der Länge nach eingeschnitten, sodass es möglich war, eine der beiden Arterien mit möglichst geringem Kontakt zum Präparationsbesteck und wenig Zug auf das Gefäß herauszupräparieren. Die Feinpräparierung erfolgte in ebenfalls mit HEPES-Puffer gefüllten Petrischalen. Anschließend wurden  $5 \pm 1$  mm lange Gefäßsegmente zugeschnitten.

##### **3.1.2 Arteria mammaria interna**

Die Bereitstellung der Aa. mammariae internae (engl.: internal mammary artery = IMA, syn.: Aa. thoracicae internae) erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch das Team der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie der Universitätsklinik

Düsseldorf unter Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. E. Gams. Hier unterzogen sich Patienten mit KHK einer koronaren Bypassoperation, in deren Rahmen mindestens eine der beiden Aa. mammariae internae (Abb. 3.1), in der überwiegenden Mehrzahl die linke, frei präpariert wurde und als arterieller Bypass auf den R. interventricularis anterior (RIVA) diente. Intraoperativ wurde ein für den arteriellen Bypass nicht benötigtes Stück der Arteria (A.) mamma interna abgetrennt, in einem mit isotoner Kochsalzlösung befeuchteten Tupfer angereicht und anschließend sofort in einen mit PBS-Puffer gefüllten Probenbehälter überführt. In den meisten Fällen war die Arterie schon vorpräpariert worden. Je nach Präparationszustand wurde dann im Labor in einer mit HEPES-Puffer gefüllten Petrischale die Entfernung von Muskel- und Bindegewebsresten vorgenommen, wobei wiederum besonderes Augenmerk auf dem schonenden Umgang mit dem Gefäß lag. Direkter Kontakt mit dem Präparationsbesteck und Zug wurde auch hier vermieden. Die Länge der einzelnen Gefäßsegmente betrug ebenfalls  $5 \pm 1$  mm.

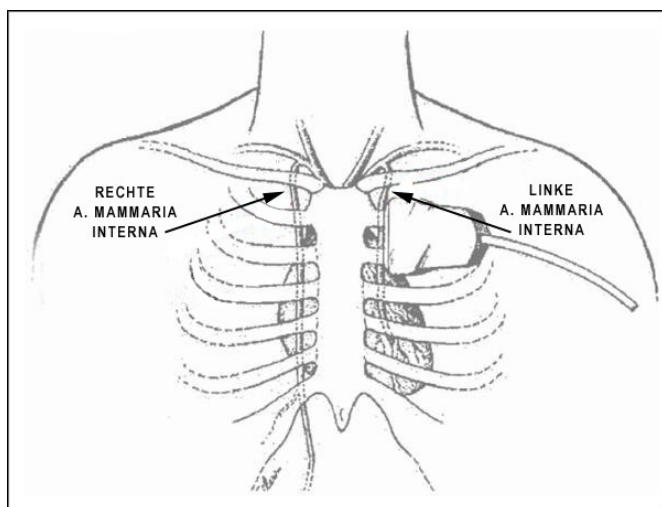


Abb. 3.1: Schemazeichnung zur A. mamma interna, modifiziert nach [206]

### 3.2 Bezug der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Abciximab (ReoPro®)	Lilly/Centocor, Bad Homburg
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bradykinin	Alexis Biochemicals, Lörrach
D <sup>+</sup> -Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimeticon 100 Silikonöl Typ 100	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Fibrinogen from bovine plasma	Fluka, Steinheim
Hepes sodium salt ultra grade	Calbiochem, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
L-NAME	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
PGF <sub>2α</sub> (Miniprostin®)	Pharmacia, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pluronic® F 68	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Serotonin HCl	Fluka, Steinheim
Substanz P	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Alle verwendeten Substanzen entsprachen der Qualitätsstufe pro analysi.

### 3.3 Pufferlösungen

#### 3.3.1 PBS-Puffer

Der Transport und gegebenenfalls (ggf.) die Aufbewahrung bis zur Präparation erfolgte in PBS- (Phosphate buffered saline-) Puffer, dessen Zusammensetzung Tab. 3.1 zeigt.

Bestandteil	Konzentration [mM]
KCl	2,68
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47
NaCl	136,89
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1

Tab. 3.1: Zusammensetzung des PBS-Puffers

Nach der Lösung der Substanzen in Aqua dest. wurde der PBS-Puffer durch Hinzugabe von 1-molarer Natronlauge respektive von 37-prozentiger Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 3.3.2 HEPES-Puffer

Für die Präparierung sowie für die kurzfristige Lagerung der Gefäße wurde HEPES-Puffer verwendet. Die Zusammensetzung zeigt Tab. 3.2.

Bestandteil	Konzentration [mM]
NaCl	98,04
KCl	4,69
CaCl <sub>2</sub>	2,48
MgSO <sub>4</sub>	2,46
NaHCO <sub>3</sub>	24,997
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,03
Na-HEPES	20
D-Glucose	11,1

Tab. 3.2: Zusammensetzung des HEPES-Puffers

Der HEPES-Puffer wurde nach Lösung der Substanzen in Aqua dest. mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf den physiologischen pH-Wert von 7,35 – 7,45 eingestellt.

## 3.4 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau sowie dessen Durchführung werden zur Erleichterung der Transparenz dezidiert beschrieben:

### 3.4.1 Apparatur und Instrumente

Der Versuchsaufbau für die Experimente setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Vier doppelwandige Organbäder aus Glas (Fassungsvermögen: ca. 17 ml) (Abb. 3.2)
- ein Umlaufthermostat (Fa. Haake, Typ NB22) mit angeschlossenem doppelwandigem Vorratsgefäß aus Glas für den Krebs-Henseleit-Puffer (s.u.)
- vier Spannungsaufnehmer (Statham, USA)
- zwei Verstärker

- zwei Schreiber (Fa. Goerz Mettrawatt, Typ SE 120)



Abb. 3.2: Foto des verwendeten Organbades vor Einhängen der Gefäßringe; nicht abgebildet: Verstärker und Schreiber

#### **Instrumente:**

- ein Operations-Instrumentensieb mit mehreren Scheren und Pinzetten
- eine Nabelschnurschere
- eine anatomische, gebogene, spitze Pinzette
- mehrere Petrischalen
- Kanülen (Microlance Nr.1, Becton Dickinson, Heidelberg)
- ein flacher Styropordeckel, täglich frisch mit Plastikfolie überzogen
- triangelförmige Haken aus Edelstahl (Maße ca. 10-7-10 mm) zum Einhängen der Gefäßsegmente ins Organbad
- feine Holzspäne
- textiler Faden (Supolene, 1,5 metric 4/0 USP, Resorba, Nürnberg) zur Verbindung des jeweiligen Hakens mit dem Spannungsaufnehmer
- Messpipetten mit Pipettierhilfe
- mehrere Feinpipetten (Eppendorf Research)

### 3.4.2 Nährmedium im Organbad

Als physiologische Nährlösung im Organbad wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHP) verwendet, die täglich frisch angesetzt wurde und deren Zusammensetzung in Tab. 3.3 dargestellt wird.

Bestandteil	Konzentration [mM]
$\text{K}^+$	5,87
$\text{Na}^+$	143,07
$\text{Cl}^-$	125,96
$\text{Ca}^{2+}$	1,6
$\text{Mg}^{2+}$	1,18
$\text{HCO}_3^-$	25,00
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	1,18
$\text{SO}_4^{2-}$	1,18
Glucose	5,05

Tab. 3.3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers (KHP)

Für die Herstellung wurden zunächst 13,8 g NaCl, 4,2 g  $\text{NaHCO}_3$  sowie 2,2 g Glucosemonohydrat abgewogen. Die übrigen Mineralien wurden mittels der in Tab. 3.4 aufgeführten Stammlösungen (jeweils 10 ml) ergänzt. Abschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt und der pH auf 7,09 eingestellt.

	Bestandteile	Konzentration [mol/l]
<b>Stammlösung 1</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,235
<b>Stammlösung 2</b>	KCl	0,939
<b>Stammlösung 3</b>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,235
<b>Stammlösung 4</b>	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,320

Tab. 3.4: Zusammensetzung der Stammlösungen

### 3.5 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf unterlag folgendem Schema:

- Kalibrierung

- Einhängen
- Äquilibrierung
- Kontraktionstest
- Endotheltest
- Dosis-Wirkungs-Kurve

### **3.5.1 Kalibrierung**

Zu Beginn jedes Versuchstags wurden das Messgerät und der Verstärker kalibriert. Die Einstellung der Vorspannung von 2 g erfolgte durch Einhängen eines 2 g schweren Gewichtes an dem Spannungsaufnehmer, durch anschließende Abgleichung des Verstärkers auf „0“, sowie ggf. mit Hilfe einer Korrektur an dem Schreiber, sodass sich eine definierte Nulllinie auf dem Schreiberpapier ergab. Mit zwei weiteren, nacheinander angehängten 2 g schweren Gewichten wurden zwei zusätzliche Kalibrierungspunkte überprüft und ggf. an Verstärker oder Schreiber korrigiert.

### **3.5.2 Einhängen**

Nach abgeschlossener Feinpräparation wurden die Gefäßsegmente, falls nicht für die Versuchsreihe anders benötigt, unter größtmöglicher Schonung der Intima auf zwei triangelförmigen Haken aufgezogen. An diesen wurde jeweils ein Faden (Supolene) befestigt, über den die obere Triangel am Spannungsaufnehmer, die untere Triangel an einem Haken im Organbad befestigt wurde (Abb. 3.3). Die Fäden durften dabei nicht zu fest angezogen werden, da das Gefäß dadurch bereits unter Spannung gesetzt und möglicherweise geschädigt worden wäre. Eine zu lockere Einspannung jedoch führte dazu, dass keine Justierung möglich war.

Die Organbäder waren wie auch das Vorratsgefäß mit KHP gefüllt, welcher kontinuierlich bei einer Temperatur von 37°C gehalten und mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, begast wurde. Der pH-Wert des KHP lag durch die Begasung kontinuierlich bei 7,4 und wurde regelmäßig kontrolliert.

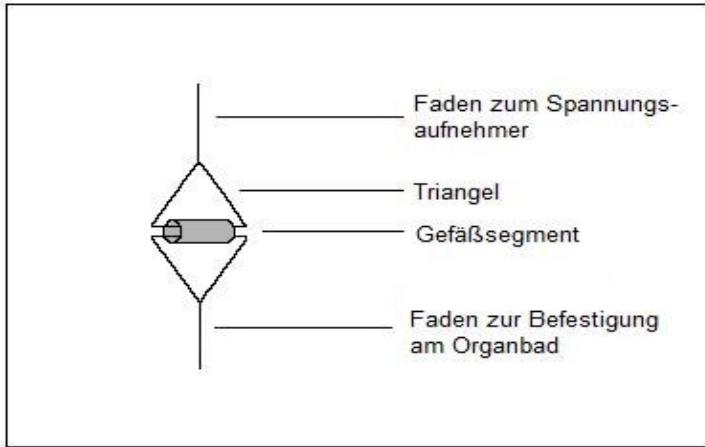


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Einhängens eines Gefäßsegmentes in das Organbad

### 3.5.3 Äquilibrierung

Nachdem die Gefäße in das mit KHP gefüllte Organbad eingehängt worden waren, wurden sie während der Äquilibrierungsphase an die 2 g Vorspannung adaptiert, um eine definierte Grundspannung zu erreichen. Dies machte eine wiederholte Justierung am Spannungsaufnehmer, verbunden mit regelmäßigm Wechseln des KHP, nötig. Erst wenn die Gefäße diesen basalen Tonus konstant einhielten, wurde mit den Versuchen begonnen. Diese Äquilibrierungsphase nahm bei den Umbilikarterien ca. 120 min, bei den Brustwandarterien ca. 70 min in Anspruch. Vor dem Beginn eines Versuchs wurde der Puffer nochmals vorsichtig mit Hilfe einer Messpipette gewechselt und, außer bei den Versuchen mit Fibrinogen, genau 10 ml in jedes Organbad eingefüllt. Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte mit Feinpipetten (Eppendorf Research).

Vor jedem weiteren Versuch erfolgte eine erneute Äquilibrierungsphase, um den Basaltonus wieder zu erreichen.

### 3.5.4 Kontraktionstest

Jedes Gefäßsegment wurde zunächst durch Zugabe von 80 mM Kaliumchlorid (KCl) bei der A. umbilicalis und 60 mM KCl bei der A. mammaria interna auf die rezeptorunabhängige Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur hin überprüft. Dieser Test wurde zweimal mit dem Ziel der maximalen Kontraktion durchgeführt und anschließend ein Mittelwert gebildet. Nach positivem Kontraktionstest wurden

nach erneuter Äquilibrierung weitere Versuche durchgeführt. Bei keinem oder nur mangelhaftem Ansprechen auf die KCl-Gabe wurde das entsprechende Gefäßsegment verworfen.

### **3.5.5 Endotheltest**

Im Anschluss an den Kontraktions- test erfolgte der Test auf eine endothelabhängige Relaxation, der Aufschluss über die Intaktheit des Endothels gab. Zuvor wurde das Gefäß vorkontrahiert und die erreichte Kontraktion als Bezugspunkt 100% gleichgesetzt. Somit konnte bei erfolgter Relaxation der prozentuale Wert des intakten Endothels errechnet werden.

Bei beiden Gefäßen wurde anschließend in einer Versuchsreihe die Endothelabhängigkeit der Relaxation überprüft. Dazu wurden mehrere Gefäße nach erfolgtem Endotheltest 30 min mit dem Inhibitor der endothelialen NO-Synthase N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginin-methylester (L-NAME) inkubiert (Konzentration im Organbad bei der HUA 100 µM, bei der IMA 10 µM) und danach einem weiteren Endotheltest unterzogen. Als Kontrolle wurden auch Gefäße auf die Funktion des Endothels überprüft, bei denen zuvor vorsichtig unter Schonung der glatten Gefäßmuskulatur das Endothel mittels feiner Holzspäne entfernt worden war.

#### **3.5.5.1 A. umbilicalis**

Der Endotheltest an der A. umbilicalis wurde mit Phenylephrin (PhE) und Substanz P durchgeführt. Zunächst wurde mittels einer Phenylephrin-Konzentration von 3,75 µM im Organbad eine Vorkontraktion des Gefäßes hervorgerufen. Bei Erreichen eines Plateaus kam es je nach Zustand des Endothels bei Zugabe von 3 nM Substanz P zur Relaxation. Bei Erreichen eines Plateaus wurde die Lösung mehrfach ausgewaschen und durch frischen KHP ersetzt. Anschließend folgte eine Äquilibrierungsphase.

#### **3.5.5.2 A. mammaria interna**

An der A. mammaria interna wurde das Endothel mittels Vorkontraktion durch 2,5 µM Phenylephrin und Relaxation durch 3,75 µM Acetylcholin getestet. Nach erfolgter Relaxation kam es aufgrund der kurzen Wirkdauer des Acetylcholins rasch wieder zur erneuten Kontraktion auf das Vorkontraktionsniveau. Dann wurde die

Lösung ausgewaschen, und auch hier schloss sich eine erneute Äquilibrierungsphase an.

### **3.5.6 Dosis-Wirkungs-Kurven**

Alle Dosis-Wirkungs-Kurven wurden kumulativ durchgeführt. Die jeweils nächste Dosis wurde bei Erreichen eines Plateaus nach der vorangegangenen Dosis hinzugefügt.

### **3.5.7 Kaliumchlorid**

Für die Dosis-Wirkungs-Kurve von KCl wurde die Konzentration im Organbad kumulativ gesteigert. Ausgehend von einer Konzentration von 5 mM KCl im physiologischen Nährmedium ergab sich, dass diese zunächst auf 10 mM, und dann in weiteren Schritten von jeweils 10 mM bis zu 70 mM KCl erhöht wurde. Nach Erreichen der Maximalkontraktion erfolgte eine Auswasch- und Äquilibrierungsphase.

### **3.5.8 Phenylephrin**

Hierbei wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration  $10^{-2}$  M angesetzt. Beginnend mit einer Organbadkonzentration von 1 nM wurde eine kumulative Dosissteigerung bis zu 100  $\mu$ M Phenylephrin erreicht. Anschließend wurde ausgewaschen und äquilibriert.

### **3.5.9 Serotonin**

Nur bei der HUA wurden auch Dosis-Wirkungs-Kurven von Serotonin angefertigt. Das Vorgehen und die Dosissteigerungen erfolgten bis zu einer Organbadkonzentration von 10  $\mu$ M wie bei Phenylephrin beschrieben.

### **3.5.10 Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>**

Ebenfalls beschränkt auf die A. umbilicalis wurden Versuche zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  gemacht. Als Stammlösung diente Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  Miniprostin® in Ampullen, das mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt wurde. Die Zugabe zum Nährmedium im Organbad erfolgte zunächst in kleinen Schritten und ergab Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis zu 70  $\mu$ M. Eine Auswaschungs- und Äquilibrierungsphase folgte.

### **3.5.11 Acetylcholin**

Die Untersuchungen zur Dosis-Wirkungs-Kurve von Acetylcholin (ACh) beschränkten sich hingegen auf die A. mammaria interna. Zunächst wurde eine Stammlösung von  $10^{-2}$  M angesetzt. Nach Vorkontraktion mit 2,5  $\mu\text{M}$  PhE erfolgte eine kumulative Dosissteigerung beginnend mit 1 nM bis hin zu 10  $\mu\text{M}$ . Es folgte die übliche Auswaschung und Äquilibrierung.

### **3.5.12 Bradykinin**

Die Stammlösung wies eine Konzentration von  $10^{-2}$  M auf. Die Konzentration im Organbad wurde bis zu 1  $\mu\text{M}$  gesteigert. Bei der IMA erfolgte die Zugabe von Bradykinin nach der Vorkontraktion des Gefäßes mit 2,5  $\mu\text{M}$  PhE in zunächst größeren Schritten (0,1 nM, 3 nM, 100 nM, 300 nM), bei der HUA auf den Basaltonus beginnend mit 0,01 nM in kontinuierlich kleinen Schritten.

### **3.5.13 Fibrinogen**

Verwendet wurde Fibrinogen aus Rinderplasma. Zunächst wurde eine Stammlösung der Konzentration 35  $\mu\text{M}$  hergestellt. Dazu wurde eine Petrischale mit 24 ml KHP gefüllt, im Wärmebad auf 37°C erwärmt und das Fibrinogen portionsweise gelöst. Dabei musste es regelmäßig geschwenkt werden. Die Versuche im Organbad erfolgten nach Zugabe von einem Entschäumer, Pluronic® F68 (0,8 mg/ml), das durch die Kombination mit Dimeticon Silikonöl (12  $\mu\text{M}$ ) keinen einzelnen dicken Tropfen im Organbad ausbildete, sondern sich ausreichend verteilte.

Es folgten Versuche auf den Basaltonus der Gefäße sowie bei der A. mammaria interna nach Vorkontraktion mit 2,5  $\mu\text{M}$  PhE. Insgesamt wurde dabei die Organbadkonzentration von Fibrinogen kumulativ gesteigert. Bei der HUA erfolgte die Zugabe zunächst in Schritten von jeweils 2  $\mu\text{M}$  bis auf 10  $\mu\text{M}$ , dann in Schritten von 1  $\mu\text{M}$  bis auf 14  $\mu\text{M}$ . Bei der IMA wurden lediglich 3 Dosen von 6, 11 und 15  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Außerdem wurden an der A. mammaria interna exemplarisch ( $n = 2$ ) Dosis-Wirkungs-Kurven mit Fibrinogen nach 60-minütiger Inkubation mit dem GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt. Die Weiterführung dieser Experimente war und ist Bestandteil weiterer Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe.

## **4 Statistische Auswertung**

Die Änderungen des Vasotonus wurden vom Spannungsaufnehmer registriert und vom Schreiber verstärkt aufgezeichnet. Die Amplituden auf den Schreiberfahnen wurden ausgemessen und in Newton umgerechnet, sodass sich die jeweilige Kontraktionskraft in mN ergab. Für die Versuche zur Relaxation wurde die Vorkontraktion 100% gleichgesetzt, und die Relaxation als prozentualer Wert angegeben.

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte computergestützt mit den Statistikprogrammen GraphPad Prism 3 und GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Die Ergebnisse aller Messungen sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) angegeben. Der Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten wurde mit Two way ANOVA oder One way ANOVA durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist in p angegeben, wobei  $p < 0,05$  signifikant (\*) und  $p < 0,0001$  hoch signifikant (\*\*\*) bedeutet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kaliumchlorid

KCl ist als potenter Vasokonstriktor bekannt und verursacht eine Depolarisation durch Ausgleich des Kalium-Konzentrationsgradienten. Dies wiederum induziert den Einstrom von extrazellulären Kalziumionen durch spannungsabhängige Kalziumkanäle und damit eine Kontraktion [27]. Die kumulative Zugabe von KCl führte in unseren Untersuchungen zu einer zunehmenden Kontraktion der Arterien (Abb. 5.1). Dabei stellte sich die Kontraktionskraft der A. umbilicalis mit einer Maximalkonzentration von  $72,03 \pm 3,38$  mN hoch signifikant ausgeprägter dar als die der A. mammaria interna mit  $26,7 \pm 1,25$  mN.

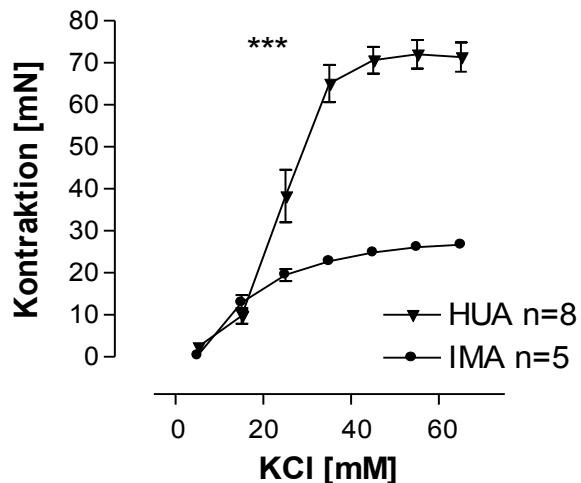


Abb. 5.1: Kontraktion der Arterien durch steigende  $\text{K}^+$ -Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. HUA und IMA

### 5.2 Phenylephrin

Der  $\alpha_1$ -Agonist Phenylephrin führte sowohl bei der A. umbilicalis als auch bei der A. mammaria interna zu einer dosisabhängigen Vasokonstriktion (Abb. 5.2). Die HUA wies eine maximale Kontraktion von  $9,8 \pm 1,23$  mN auf, die bei einer Organbadkonzentration von  $10^{-5}$  M eintrat und durch Steigerung der Konzentration nicht mehr zunahm, sondern ein Plateau auf geringerem Niveau ausbildete. Die IMA wies hingegen eine kontinuierliche Kontraktilitätszunahme auf, die ihr Maximum von  $20,88 \pm 1,8$  mN bei  $10^{-4}$  M zeigte. Die Unterschiede zwischen den

Mittelwerten beider Versuchsreihen war hoch signifikant bei einem Niveau von  $p < 0,0001$ .

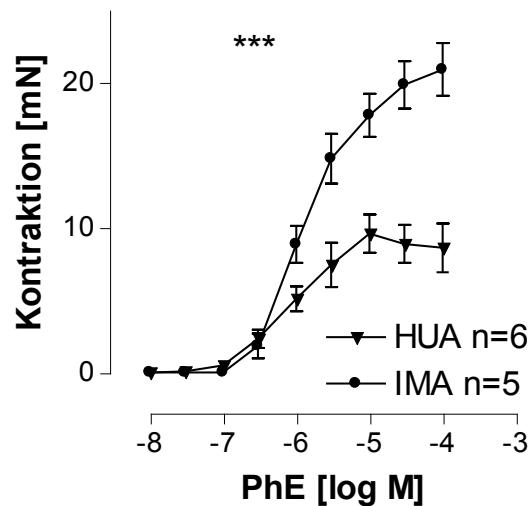


Abb. 5.2: Einfluss steigender Phenylephrin-Konzentrationen auf den Vasotonus, Mittelwerte  $\pm$  SEM. HUA und IMA

### 5.3 Serotonin

Serotonin ist in der Vergangenheit bereits zur Kontraktion von Gefäßsegmenten der HUA verwendet worden [107]; [151]; [184]; [190]. Bei exemplarisch durchgeföhrten Dosis-Wirkungs-Kurven konnte diese konstriktive Wirkung bestätigt werden, jedoch stellte sich sowohl bei der DWK (Abb. 5.3) als auch bei einem exemplarisch mit Serotonin durchgeföhrten Endotheltest kein stabiles Niveau ein.

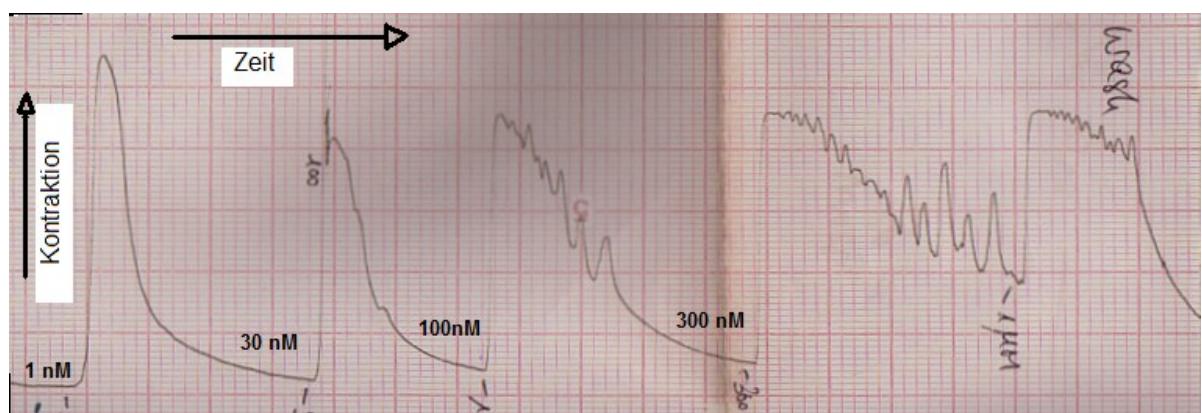


Abb. 5.3: Schreiberaufzeichnung der exemplarisch durchgeföhrten Serotonin-DWK an der HUA

Es war keine Beurteilung möglich, ob die Veränderung des Vasotonus auf die Wirkung von Substanz P zurückzuführen war. Für die Versuche, die eine stabile Vorkontraktion erforderten, war Serotonin also ungeeignet.

#### 5.4 Prostaglandin F<sub>2α</sub>

Prostaglandin F<sub>2α</sub> wirkt als potenter Vasokonstriktor auf humane Gefäße. Es induziert durch Bindung an Rezeptoren eine Aktivierung von Phospholipase C und Adenylatzyklase. Über den rein vasokonstriktiven Einfluss hinaus besitzt PGF<sub>2α</sub> auch einen stark uteruskontrahierenden Effekt und spielt dadurch u.a. in der Geburtshilfe eine Rolle [141]; [170]; [194]. Die HUA reagierte auf PGF<sub>2α</sub> mit Kontraktion [133]; [203], doch ähnlich wie bei Serotonin führte bei unseren Experimenten eine Zugabe der Substanz in das Organbad nicht zu einer stabilen Kontraktion der Arterie (Abb. 5.4).

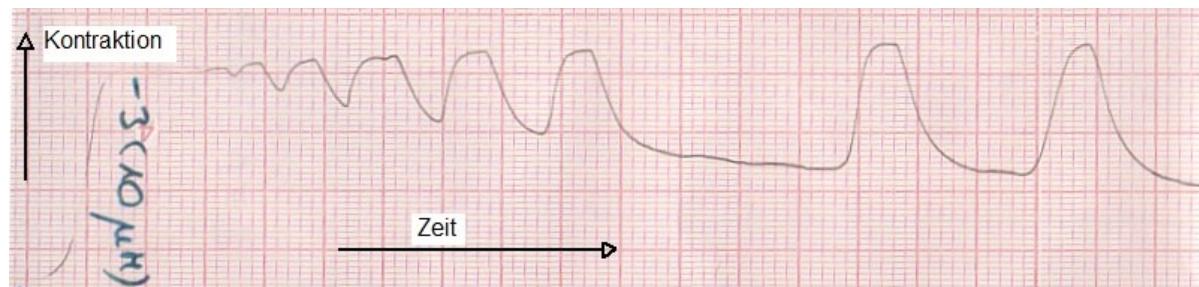


Abb. 5.4: Schreiberaufzeichnung mit Ausschnitt aus der exemplarisch durchgeföhrten Prostaglandin F<sub>2α</sub>-Dosis-Wirkungs-Kurve. Konzentration im Organbad 10 µM. HUA

Für den Endotheltest an der HUA wurde daher Phenylephrin verwendet, das in eigenen Untersuchungen als einziger Vasokonstriktor zu einem ausreichend stabilen Kontraktionsniveau führte (Abb. 5.5; Abb. 5.6).

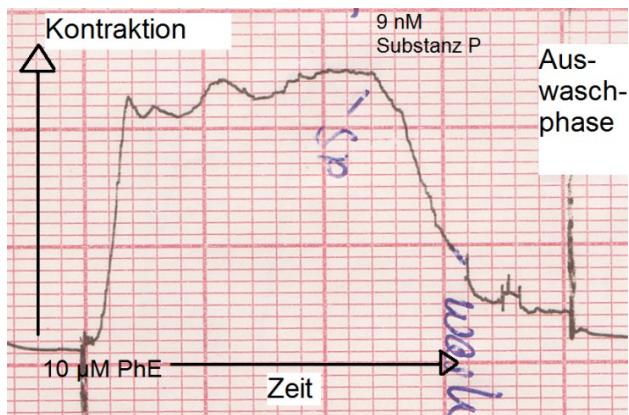


Abb. 5.5: Schreiberaufzeichnung eines mit PhE und Substanz P durchgeföhrten Endotheltests bei der HUA. Hier exemplarisch eine nahezu 80% Relaxation bei gut erhaltenem Endothel.

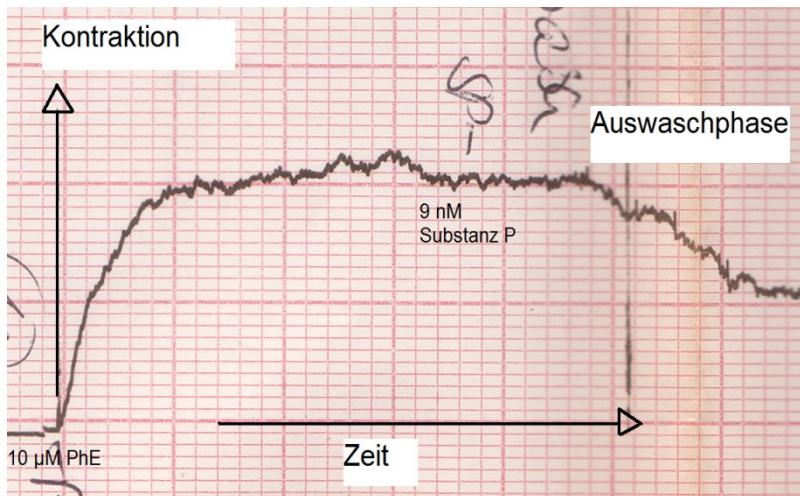


Abb. 5.6: Schreiberaufzeichnung eines mit PhE und Substanz P durchgeföhrten Endotheltests bei der HUA. Hier exemplarisch Nachweis der fehlenden Relaxation bei vorangegangener manueller Entfernung des Endothels.

## 5.5 Acetylcholin

Die Gefäßringe der IMA wurden zunächst mit PhE vorkontrahiert. Die Relaxation durch Einwirkung von Acetylcholin wurde ausgemessen und als prozentuale Restkontraktion berechnet. Nach Zugabe steigender ACh-Konzentrationen erfolgte ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M im Nährmedium eine zunehmende Dilatation bis zu einem Maximalwert von  $11,52 \pm 6,72\%$ . Dies entspricht einer Ausschöpfung der maximalen Dilatationskapazität von 88 – 93 %. Zugrunde liegen der Abb. 5.7 Untersuchungen an Gefäßen ( $n = 5$ ), die nach Gabe einer Acetylcholin-

Maximaldosis eine vollständige Relaxation zeigten, d.h. über ein nahezu vollständig erhaltenes Endothel verfügten.

Insgesamt wurden  $n = 58$  Gefäßsegmente der IMA verwendet, wovon allerdings  $n = 12$  (21%) bereits nach dem Kontraktionstest verworfen wurden, da sie keine ausreichende Kontraktilität zeigten. Von den verbliebenen 46 Gefäßsegmenten zeigten  $n = 27$  (59%) ein zu mindestens 50% erhaltenes Endothel.

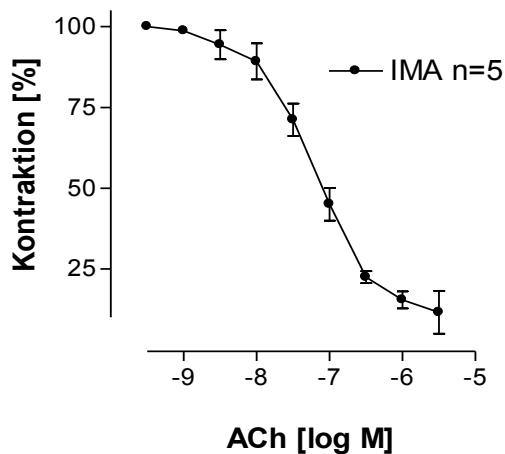


Abb. 5.7: Endothelabhängige Relaxation durch ACh, dargestellt als verbliebene Restkontraktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. IMA

## 5.6 Endotheltests

Die unterschiedliche Methodik der durchgeführten Endotheltests wurde dahin gehend überprüft, inwieweit sie tatsächlich die Abhängigkeit der Relaxation von der Beschaffenheit des Endothels beweisen. Dazu wurde zunächst der Endotheltest durchgeführt und die maximale Relaxation registriert. Dieselben Gefäßsegmente wurden nach einer Auswasch- und Äquilibrierungsphase mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME inkubiert und erneut einem Endotheltest unterzogen. Durch die Hemmung der endothelialen NO-Synthase wurde eine hoch signifikante Verminderung der Relaxation erreicht. Das bewies, dass die vorherige Dilatation durch Freisetzung von NO aus folglich intaktem Endothel induziert wurde. Als Kontrolle dienten darüber hinaus Gefäßringe, bei denen zuvor unter Schonung der glatten Gefäßmuskulatur das Endothel mittels dünner Holzspäne entfernt worden war. Die gering ausgeprägte Dilatation bei den Gefäßringen mit entferntem Endothel war dabei am ehesten auf verbliebene Endothelreste zurückzuführen. Bei mindestens

50-prozentiger Relaxation wurde das Endothel des jeweiligen Gefäßsegmentes als „intakt“ gewertet.

### 5.6.1 A. umbilicalis

Bei der HUA zeigte sich nach Hemmung der eNOS mit 100  $\mu$ M L-NAME nur noch eine Relaxation von 3% (Abb. 5.8). Die Relaxation humaner Arterien nach Einwirkung von Substanz P ist schon lange bekannt [19]; [142]; [150], auch speziell bei der HUA war die endothelabhängige vasodilatierende Wirkung von Substanz P beschrieben worden [26] und konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden.

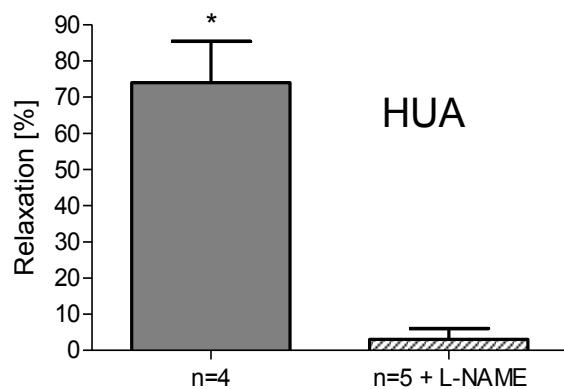


Abb. 5.8: Relaxation durch Substanz P. Ergebnisse der durchgeführten Endotheltests an der HUA vor und nach Inkubation mit L-NAME. HUA

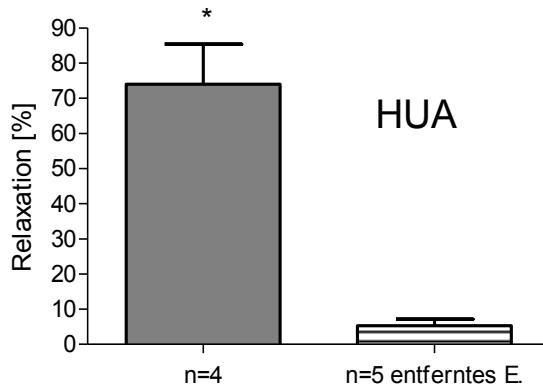


Abb. 5.9: Relaxation durch Substanz P. Darstellung der durchgeführten Endotheltests an Gefäßen mit bzw. ohne Endothel. HUA

Die Abhängigkeit der Wirkung von Substanz P vom Zustand des Endothels zeigt Abb. 5.9. Die maximale Relaxation betrug hier  $5,3 \pm 1,86\%$ .

### 5.6.2 A. mammaria interna

Die IMA zeigte hingegen bei Überprüfung des Endotheltests auch nach Inkubation mit 10 µM L-NAME noch eine Relaxation von durchschnittlich 19 % (Abb. 5.10). Die Entfernung des Endothels hatte jedoch auch hier zur Folge, dass nur eine mittlere Relaxation von 4 % induziert wurde (Abb. 5.11). In beiden Fällen war der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

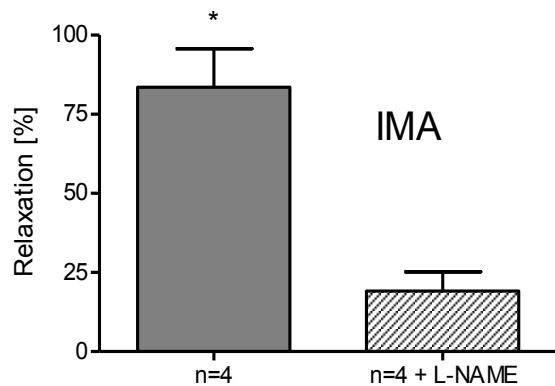


Abb. 5.10: Relaxation durch Acetylcholin. Ergebnisse der durchgeföhrten Endotheltests vor und nach Inkubation mit L-NAME. IMA

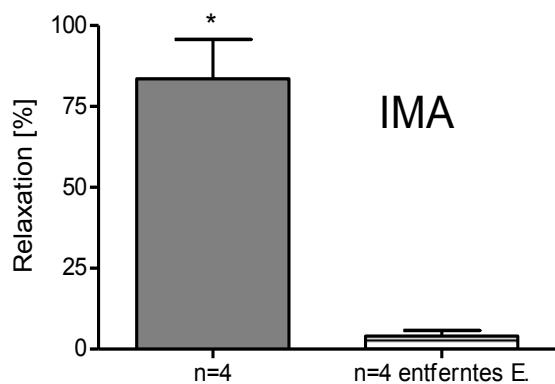


Abb. 5.11: Relaxation durch Acetylcholin. Dargestellt sind die Ergebnisse der Endotheltests mit bzw. ohne Endothel. IMA

In einer abschließenden Analyse ergab sich zwischen den Werten für die Relaxation nach L-NAME-Inkubation einerseits und nach Entfernung des Endothels andererseits kein signifikanter Unterschied (Abb. 5.12).

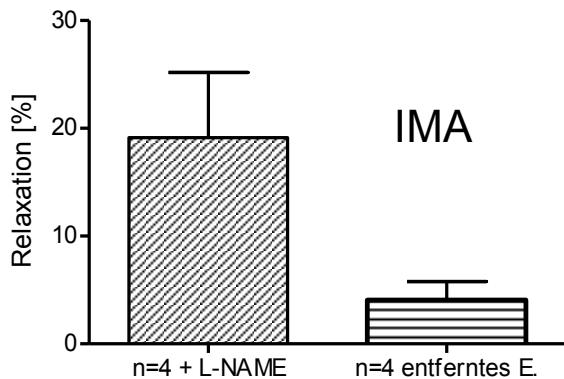


Abb. 5.12: Relaxation durch Acetylcholin. Gegenüber gestellt ist die Relaxation nach L-NAME und die Relaxation bei den Gefäßen mit entferntem Endothel. IMA

## 5.7 Bradykinin

Bradykinin zeigte auf den Vasotonus beider verwendeten Arterientypen unterschiedliche Wirkung. Bei der A. umbilicalis zeigte sich nach Applikation auf den Basaltonus der Gefäßsegmente ab einer Organbadkonzentration von  $10^{-8}$  M eine starke dosisabhängige Vasokonstriktion (Abb. 5.13). Der Maximalwert betrug dabei  $25,93 \pm 4,17$  mN.

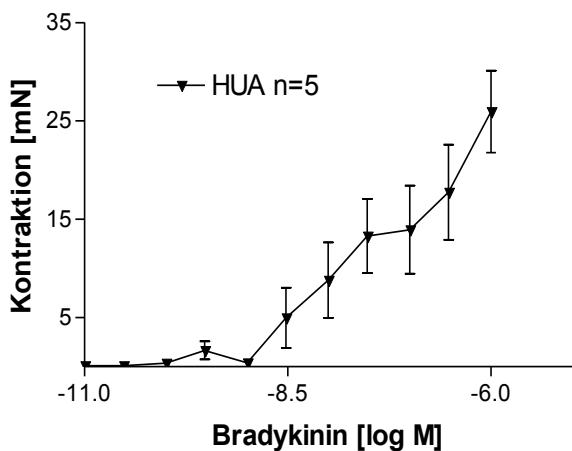


Abb. 5.13: Kontraktion durch Bradykinin. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. HUA

Bei der A. mammaria interna hatte die kumulative Bradykinin-Zugabe zum Nährmedium im Organbad keinen Effekt auf den basalen Vasotonus. Nach Vorkontraktion mit PhE zeigte sich eine dosisabhängige Vasodilatation, die maximal  $46,87 \pm 9,61$  % der Vorspannung betrug und besonders deutlich ab einer Organbadkonzentration von  $10^{-8}$  M zu registrieren war (Abb. 5.14).

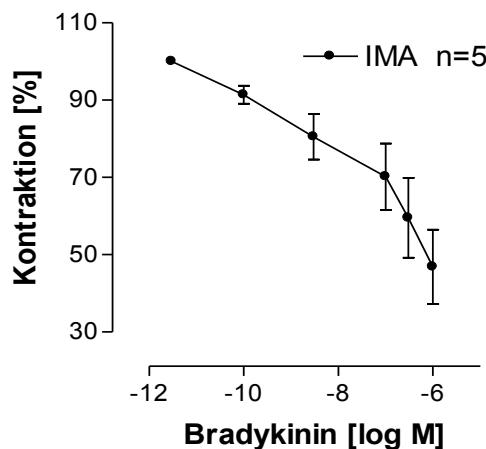


Abb. 5.14: Mittelwerte der Relaxation durch Bradykinin  $\pm$  SEM. IMA

## 5.8 Fibrinogen

Die Applikation von Fibrinogen auf den Basaltonus des Gefäßsegmentes induzierte bei der HUA eine dosisabhängige Vasokonstriktion mit einem Maximalwert von  $30,08 \pm 10,29$  mN (Abb. 5.15). Im Bereich hypofibrinogenämischer und physiologischer Werte war diese schwach ausgeprägt, im supraphysiologischen und im pathologischen Bereich zeigte sich eine konstant zunehmende Kontraktion, die in mN stärker ausgeprägt war als die Kontraktion nach Zugabe des  $\alpha_1$ -Agonisten Phenylephrin.

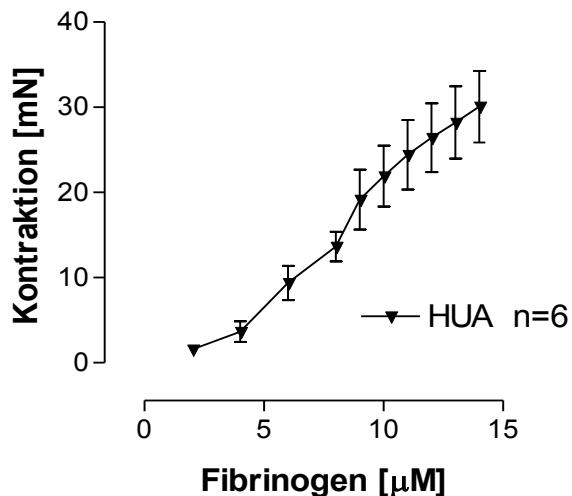


Abb. 5.15: Kontraktion durch Fibrinogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. HUA

Auf den basalen Tonus der IMA hatte Fibrinogen keinen Einfluss. Nach Vorkontraktion mit PhE ließ sich eine dosisabhängige Vasorelaxation beobachten, die ein Maximum bei  $51,17 \pm 1,68$  % der Vorspannung erreichte. Besonders deutlich war die Relaxation im Bereich von supraphysiologischen und pathologischen Fibrinogen-Konzentrationen von 10 bis 15  $\mu\text{M}$  im Organbad. Es wurden weiterhin exemplarisch Dosis-Wirkungs-Kurven nach Inkubation mit dem GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab durchgeführt (Abb. 5.16). Die maximale Dilatation wurde dadurch auf maximal  $23,23 \pm 3,4$  % des Ausgangswertes verringert. Der Unterschied war hoch signifikant bei einem Niveau von  $p < 0,0001$ .

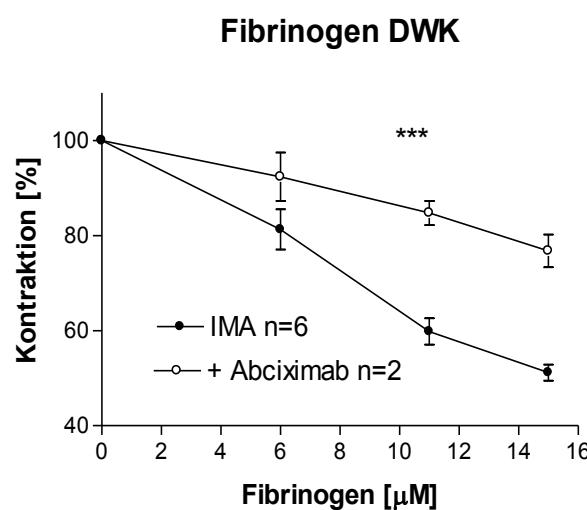


Abb. 5.16: Relaxation durch Fibrinogen alleine und in Anwesenheit von Abciximab. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. IMA

## 6 Diskussion

Überprüft wurde in dieser Arbeit die Vasomotorik humaner Arterien. Dazu erfolgten zunächst Untersuchungen zur Kontraktion und Relaxation der beiden verwendeten Arterientypen, um einen validen Endotheltest zu etablieren. Anschließend wurden erstmals Experimente zur vasomotorischen Wirkung des Akute-Phase-Proteins Fibrinogen auf humane Arterien durchgeführt, um möglicherweise die Rolle des Fibrinogens in der Pathogenese des RAE genauer charakterisieren zu können.

### 6.1 A. umbilicalis

Die A. umbilicalis ist eine Arterie humanen Ursprungs, die aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit grundsätzlich ein ideales Modell u.a. zur Erforschung der Vasomotorik menschlicher Gefäße darstellt. Funktionell konnte in den vorliegenden Versuchsreihen die kontraktile Antwort auf adäquate Kaliumchlorid- und Phenylephrin-Dosen gezeigt und bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der Experimente stellten sich jedoch auch Besonderheiten dar. So musste zu Beginn ein Endotheltest etabliert werden, der eine zuverlässige Auswertung der aufgezeichneten Amplituden erlaubte. Die in der Literatur angeführte Vorkontraktion mittels Serotonin [107]; [184] oder Prostaglandin F<sub>2α</sub> [170]; [203] konnte nicht stabil hervorgerufen werden, vielmehr zeigte sich bei der verstärkten Aufzeichnung durch den Schreiber eine variierende Kontraktion. Renowden et al. vermuteten, dass Serotonin ein Mediator für den postnatalen Verschluss der Umbilikalgefäße ist [151]. Weitere Untersuchungen bestätigen diese Theorie [145]. Dies könnte in Zusammenhang mit dem spiraligen Verlauf der A. umbilicalis die ausgeprägte, inkonstante Reaktion auf die Serotoninzugabe erklären.

Für den Test auf endothelabhängige Relaxation konnte kein Acetylcholin eingesetzt werden, da es im Gegensatz zu anderen humanen und tierischen Gefäßen auf die HUA konstriktive Wirkung besitzt [9]; [39]. Stattdessen wurde Substanz P verwendet. Bodelsson et al. hatten postuliert, dass die Relaxation der HUA durch Substanz P nicht NO-abhängig ist [26]. Wir beobachteten in unseren Untersuchungen jedoch eine Relaxation, die nach Inkubation mit L-NAME und

daraus resultierender Hemmung der eNOS nur noch 3 % der ursprünglichen Maximaldilatation betrug. Damit konnten wir zeigen, dass die Vasodilatation der HUA durch Substanz P nahezu vollständig NO-abhängig ist.

Das Phänomen der endothelabhängigen Relaxation wurde erstmals durch Furchtgott 1980 beschrieben [56]. Er stellte fest, dass Gefäße, deren Endothel bei der Präparation verletzt worden war, ihre vasodilatierende Reaktion auf Acetylcholin verloren und postulierte die Existenz eines endothelabhängigen relaxierenden Faktors (Endothelium-Dependent Relaxing Factor, EDRF). Später wurde als verantwortlicher Mediator Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert [81]; [137]. Die endogene NO-Produktion kann unter anderem durch Aktivierung der eNOS mittels Substanz P induziert werden [38]; [113]. Ob NO jedoch der alleinige Mediator der Vasodilatation durch Substanz P ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden [26]; [67]; [113]; [197], unsere Ergebnisse unterstreichen jedoch die große Rolle von NO bei Substanz P-induzierter endothelabhängiger Relaxation der HUA.

## 6.2 A. mammaria interna

Die Verfügbarkeit der A. mammaria interna war schlechter als die der A. umbilicalis, da ein Großteil der intraoperativ präparierten IMA für die koronaren Bypässe benötigt wurde und daher jeweils nur ein kleiner Abschnitt für die Experimente zur Verfügung gestellt werden konnte. Da sie aber eine humane Arterie adulter Ursprungs und somit ein gutes Modell ist, sind Untersuchungen an ihr von großem wissenschaftlichem Interesse. Einschränkungen sind an dieser Stelle dahingehend zu machen, dass es sich um Arterien von KHK-Patienten mit dementsprechenden Vorschäden handelt. Ein weiteres Problem bei der Auswertung war, dass eine jeweilige Vormedikation, ein erhöhter Fibrinogen-Spiegel im Blut der Patienten oder weitere Vorerkrankungen die Messwerte verfälschen könnten. So stellten Hicks et al. 1996 fest, dass sich bei Diabetikern die vasomotorische Antwort auf die Fibrinogen-Zugabe von der nicht-diabetischer Patienten unterschied [75].

Eine Besonderheit ergab sich beim Endotheltest und seiner Verifizierung nach Inkubation mit L-NAME. Laut Hinweisen in der Literatur ist eine adäquate Relaxationshemmung bei einer Konzentration von 100 µM im Organbad zu erreichen [178]; [182]. Bei unseren Versuchen konnte in Anwesenheit von 100 µM

L-NAME keine stabile Kontraktion der IMA erhalten werden, was auf einen toxischen Effekt hindeutet. So wurde nur mit einer Konzentration von 10 µM inkubiert, was zwar die Vorkontraktion nicht beeinträchtigte, jedoch nicht zu einer vollständigen Hemmung der Relaxation führte. Andere Quellen berichten von Experimenten mit 1 µM [20]; [203] bzw. 3,5 µM L-NAME [130]. In beiden Fällen wurde allerdings keine Minderung der Relaxation berichtet, was als fehlende Beteiligung der eNOS gedeutet wurde. Möglicherweise wurde jedoch in diesen Fällen die Konzentration von L-NAME zu niedrig gewählt.

Andererseits ist mittlerweile bekannt, dass ein Teil der endothelabhängigen Gefäßrelaxation über den endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF) vermittelt wird, der neben Stickstoffmonoxid als endothelabhängiger Vasodilatator beschrieben worden ist [41]; [49]; [55]; [166]. Untersuchungen konnten auch speziell an der IMA den Einfluss von EDHF auf den Vasotonus zeigen [177]; [200]. Bauersachs et al. postulierten darüber hinaus, dass EDHF besonders dann vasodilatatorisch aktiv wird, wenn die NO-Synthese gehemmt ist [16]. Unsere Beobachtungen unterstützen diesen Ansatz mit der Einschränkung, dass nicht sicher von einer vollständigen eNOS-Hemmung ausgegangen und somit der Mechanismus der Vasorelaxation an den verwendeten IMA nicht endgültig geklärt werden kann.

### 6.3 Bradykinin

Die Wirkung von Bradykinin wird durch zwei Rezeptorsubtypen vermittelt: so ist einerseits der B<sub>1</sub>-Rezeptor bekannt, der jedoch nur in entzündlichem Gewebe exprimiert wird [101] und eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen wie der Sepsis einnimmt [121]; [164]. Darüber hinaus wird eine Beteiligung an der Entstehung der schmerzhaften Neuropathie bei Diabetikern postuliert [175]. Andererseits wurde der B<sub>2</sub>-Rezeptor beschrieben, dessen Expression ubiquitär im Gewebe stattfindet [36] und der auch unter physiologischen Bedingungen für eine Änderung des Vasotonus verantwortlich ist [62]; [146]. Auch die Wirkung von Bradykinin auf die HUA wird über den B<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt [1]; [183].

Bradykinin bewirkt generell eine erhöhte Gefäßpermeabilität [53], gilt beim HAE und AAE als hauptverantwortlicher Mediator und scheint auch am RAE beteiligt zu sein

[10], weswegen wir seine direkte vasomotorische Wirkung auf menschliche Arterien ebenfalls untersuchten. Die HUA zeigte in unseren Untersuchungen bei Bradykinin-Zugabe auf den basalen Vasotonus eine deutliche Vasokonstriktion, die eventuell an der besonderen Aufgabe der HUA bei der Umstellung des embryonalen Kreislaufs auf den adulten liegt.

Im embryonalen Kreislauf wird das Kind von der Plazenta aus über die V. umbilicalis und den Ductus venosus mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Über die V. cava inferior erreicht das Blut das fetale Herz, wo es über das offene Foramen ovale in den linken Vorhof und linken Ventrikel strömt. Über die Aorta ascendens wird das Gehirn, welches besonders viel Sauerstoff ( $O_2$ ) benötigt, sowie die übrigen Kopf-/Halsregion mit arteriellem Blut versorgt.

Die V. cava superior führt das kohlenstoffdioxidreiche ( $CO_2$ ) Blut in den rechten Vorhof, den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis. Da die Lungen noch nicht funktionieren und eine pulmonale Sauerstoffanreicherung des Blutes demnach noch nicht möglich ist, fungiert der Ductus arteriosus hier als Kurzschluss zwischen Pulmonalarterie und Aorta, in der sich nun  $CO_2$ -reiches und  $O_2$ -reiches Blut mischen. Damit wird die untere Körperhälfte, die hinsichtlich der Sauerstoffversorgung wesentlich weniger vulnerabler ist als die Kopf-/Halsregion ist, versorgt. Nach Durchblutung dieser Region wird das  $CO_2$ -reiche Blut durch die Aa. umbilicales zum Gasaustausch zur Plazenta geleitet.

Nach der Geburt führt die Unterbrechung des Plazentakreislaufs zu einem Anstieg des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes ( $pCO_2$ ) im Blut des Kindes, wodurch das Atemzentrum angeregt wird und es durch erste Atembewegungen zur Entfaltung der Lunge und zur Durchblutung des pulmonalen Gefäßsystems kommt. Dafür ist es nötig, dass der Ductus arteriosus geschlossen wird. Dies erfolgt grundsätzlich durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, die auch einen zu hohen Blutverlust über die Nabelschnur verhindert [158]. Der genaue Mechanismus ist dabei nicht abschließend geklärt, eine mögliche Erklärung ist, dass durch den nun erhöhten Sauerstoffgehalt des kindlichen Blutes die Sensitivität der Gefäßmuskulatur für Vasokonstriktoren erhöht wird [116].

Melmon et al. stellten schon 1968 bei Neugeborenen signifikant erhöhte Bradykinin-Spiegel im Nabelschnurblut fest [120] und postulierten erstmals, dass Bradykinin durch Induktion der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur ein Mediator der neonatalen Kreislaufumstellung sei. Analog dazu ist mittlerweile bekannt, dass Bradykinin postpartal die Kontraktion der Umbilikalgefäße sowie des Ductus arteriosus verstärkt und gleichzeitig den vaskulären Widerstand im Pulmonalkreislauf senkt [6].

Möglicherweise spielen o.g. physiologische Mechanismen auch bei Komplikationen in Schwangerschaft und Wochenbett eine Rolle. So wird bei der Präeklampsie, welche über das Auftreten von arterieller Hypertonie und Proteinurie in der Schwangerschaft definiert ist, eine erhöhte Empfindlichkeit der Gefäßmuskulatur gegenüber vasokonstriktorischen Substanzen postuliert [198]. Als prädisponierend gelten darüber hinaus Diabetes mellitus, vorbestehende arterielle Hypertonie sowie Nierenerkrankungen [171]. Tatsächlich wurden bei Müttern mit Präeklampsie erhöhte Bradykinin-Werte beobachtet [71]. In einer anderen Untersuchung wurde eine deutlich gesteigerte G-Protein gekoppelte Heterodimerisation der AT<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>-Rezeptoren festgestellt, die mit einer bis zu vier- bis fünffach erhöhten Expression des B<sub>2</sub>-Rezeptors korrelierte. In Kombination werden diese Beobachtungen wiederum für die gesteigerte Sensitivität des Gefäßsystems für das vasokonstriktorische AT-II bei Präeklampsie verantwortlich gemacht [2].

Veränderungen hinsichtlich des Gefäßsystems sind auch durch eine qualitativ ungeklärte, quantitativ aber gemessene vermehrte plazentare Expression von fms-like Tyrosinkinase 1 (sFlt1) bei Präeklampsie zu erklären [207]. sFlt1 ist eine Variante des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Rezeptors Flt1, gleichzeitig ein potenter Antagonist von VEGF und dem plazentaren Wachstumsfaktor PIGF (Placental Growth Factor) und bewirkt über diesen Mechanismus vaskuläre und endotheliale Dysfunktion. Bei trächtigen Ratten induzierte sFlt1 entsprechend Hypertonie, Proteinurie und glomeruläre Endotheliosis [114].

Unter hypoxischen Bedingungen wurde eine verminderte Aktivität der Kininase I und damit ein konsekutiv erhöhter Bradykininspiegel gemessen [189]. Das RAAS

weist bei Präeklampsie eine veränderte Aktivität im Vergleich zu normalen Schwangerschaften auf [30]; [165]; [174]. Morgan et al. postulierten, dass das in den Spiralarterien der Nabelschnur nachgewiesene lokale RAAS eine Rolle bei der schwangerschafts-assoziierten Gefäßmodifikation spielt [126]. Die Regulation erfolgt über Progesteron, was seinerseits bei präeklamptischen Frauen erhöht ist [205].

Bisher waren Konstriktionen durch Bradykinin nur an Gefäßen ohne intaktes Endothel [154]; [188] oder bei hohen Bradykinin-Konzentrationen beschrieben worden [187]; [204]. Buluk et al. beobachteten eine Zunahme der Kontraktion durch Bradykinin nach Inkubation mit Fibrinogen an Arterien von Meerschweinchen [34]. Die Umbilikalarterie zeigt auch mit intaktem Endothel eine kontraktile Antwort auf Bradykinin [5]; [39], wobei die Kontraktion nach Entfernung des Endothels stärker ausfiel [93].

In Versuchen mit tierischen Gefäßen konnte Bradykinin dagegen als potenter Dilatator identifiziert werden [87]; [96]; [98], auch menschliche Basilar-, Koronar- und Brachialarterien zeigten in Organbadversuchen nach Bradykinin-Zugabe eine Vasodilatation [40]; [70]; [95]; [193]. Die Relaxation war jeweils endothelialabhängig [48]; [117]; [134]. Kontroversen bestehen bezüglich der vasomotorischen Wirkung von Bradykinin auf die humane IMA. Einerseits wurde beschrieben, dass Bradykinin trotz intakten Endothels keinen dilatativen Effekt auf Gefäßsegmente der IMA hatte [32]; [160]. Andere Untersuchungen konnten jedoch eine Relaxation der IMA unter Bradykinin-Einfluss zeigen [72]; [105], die durch Methylenblau, einen Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase und der eNOS, hemmbar war [181]. In unseren Experimenten war bei der IMA kein Einfluss auf den Basaltonus zu verzeichnen. Nach Vorkontraktion mit Phenylephrin ergab sich jedoch eine deutliche Vasorelaxation auf  $46,87 \pm 9,61\%$  der Vorspannung. Somit bestätigen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass Bradykinin eine dilatative Wirkung auf humane IMA besitzt.

## 6.4 Fibrinogen

Bisher existierten nur einzelne Berichte über Organbadversuche mit Fibrinogen an humanen Gefäßen.

Bei der V. saphena magna wurde beschrieben, dass niedrige Fibrinogen-Konzentrationen (0 – 2 µM) zu einer Vasorelaxation führen, eine Dosiserhöhung jedoch eine Vasokonstriktion hervorruft [74]. Golledge et al. wiesen eine Vasorelaxation der V. saphena magna bei einer Fibrinogen-Konzentration bis 3 µM nach, die sich unter arteriellen Flussbedingungen verstärkte [63].

Unbekannt war bisher jedoch der direkte vasomotorische Effekt von Fibrinogen auf arterielle Gefäße humanen Ursprungs. Bei unseren Versuchsreihen konnten wir bei den beiden verwendeten Arterientypen eine gegenläufige vasomotorische Antwort zeigen. Die HUA reagierte mit deutlicher Konstriktion auf die Fibrinogen-Zugabe auf den Basaltonus.

In klinischen Studien wurden erhöhte Fibrinogen-Serumspiegel bei Patientinnen mit Präekampsie beschrieben [24]; [191]; [202]. Möglicherweise führt der erhöhte Fibrinogenspiegel über die vermehrte Kontraktilität der Umbilikalgefäße zur Minderdurchblutung des Feten und damit zur reflektorischen Blutdruckanhebung im mütterlichen Kreislauf, kann aber auch Ausdruck einer Thrombophilie mit möglichen konsekutiven Durchblutungsstörungen sein [97]. Analog dazu wurde bei Präekampsie eine vermehrte Expression von thrombozytären CD61- (Fibrinogen-) Rezeptoren mit konsekutiver Aggregation und Bildung von Mikrothromben beobachtet [22]; [76].

Manten et al. deuteten die Hyperfibrinogenämie bei präeklamtischen Frauen als Ausdruck eines inflammatorischen Geschehens und als Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion [110].

Zu gegensätzlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Zuppa. Hier wurden verminderte Fibrinogenwerte im Blut von Müttern mit Präekampsie gemessen und gleichzeitig ein Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit gesehen. Ursächlich sei hierfür eine veränderter maternaler hepatischer Proteinstoffwechsel mit u.a. verringelter Fibrinogensynthese [208].

Auch von mehreren anderen Arbeitsgruppen wurden negative Effekte von Fibrinogen beobachtet, wenn der Serumspiegel signifikant erniedrigt war. So wurde ebenfalls ein Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit [123] beschrieben sowie mit Blutungskomplikationen, Plazentalösung, intrauterinem Fruchttod und der bereits

o.g. Präeklampsie [122]; [179]. Dies ist jedoch nicht auf die vasomotorischen Effekte, sondern auf die Rolle von Fibrinogen im Gerinnungssystem zurückzuführen [139]. Am Tiermodell wurde nach Ausschalten der Fibrinogensynthese gezeigt, dass die Entwicklung von Embryo und Plazenta gestört ist und es in der Folge zum Abort kommt [84].

Hinsichtlich der vasomotorischen Eigenschaften von Fibrinogen im Zusammenhang mit der Ausbildung eines RAE brachten unsere Beobachtungen an der HUA keine richtungsweisenden, neuen Erkenntnisse. Ein Ödem beruht nicht auf einer Kontraktion, sondern auf einer überschießenden Relaxation und Schwellung speziell kleinlumiger Gefäße.

Die IMA zeigte bei Fibrinogen-Zugabe eine Relaxation auf 50% der Vorspannung, wobei die Relaxation besonders stark im supraphysiologischen und pathologischen Bereich ( $10 - 15 \mu\text{M}$ ) ausgeprägt war. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Patienten mit RAE einen mindestens supraphysiologischen bis pathologischen Fibrinogen-Spiegel im Blut aufwiesen [15] und bestätigt damit auch im funktionellen Laborexperiment mit humanen Arterien die Korrelation zwischen erhöhten Fibrinogen-Werten und einer Vasorelaxation. Diese deutliche Reduktion des Vasotonus war durch Inkubation mit Abciximab inhibierbar auf 80 % der Vorspannung. Möglicherweise handelte es sich auch bei dieser 20-prozentigen Vasodilatation eher um ein Messartefakt, das dadurch zustande gekommen war, dass die humanen Arterien die Vorspannung über eine längere Zeit nicht vollständig konstant halten konnten und sich so ein Drift entwickelte. Dieser Effekt müsste aber in diesem Falle in gleichem Maße auch bei den Fibrinogen-Experimenten ohne Abciximab eine Rolle gespielt haben.

Als Einschränkung sei abschließend erwähnt, dass in den beschriebenen Experimenten ungereinigtes Fibrinogen verwendet wurde und eine Beeinflussung anderer Inhaltsstoffe nicht auszuschließen war. Mittlerweile wurden diese Untersuchungen jedoch von der Arbeitsgruppe auch mit gereinigtem Fibrinogen durchgeführt und bestätigten o.g. Beobachtungen [14].

## 6.5 Abciximab

Der GPIIb/IIIa-Antagonist Abciximab bindet an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren der Thrombozyten, verhindert die Bindung von Fibrinogen und hemmt unabhängig vom Aktivierungsreiz die Thrombozytenaggregation [90]; [103]; [172]. Es ist derzeit zur intravenösen Applikation verfügbar. Klinisch konnte gezeigt werden, dass eine frühe Medikation mit Abciximab bei Patienten mit ST-Streckenhebungs-Infarkt (STEMI) eine bessere Myokard-Durchblutung und linksventrikuläre Funktion, einen raschen Rückgang der infarktspezifischen Laborparameter sowie weniger ungünstige postischämische Umbauprozesse im Herzgewebe (Remodeling) nach sich zieht [147]. Montalescot et al. stellten in ihrer Metaanalyse eine verminderte Sterblichkeit nach Abciximab-Gabe und einen besonderen Benefit bei an Diabetes erkrankten Patienten heraus [124]. Eine zusätzliche Gabe von GPIIb/IIIa-Antagonisten in Ergänzung zur Hemmung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung mittels Clopidogrel konnte in einigen Studien die Häufigkeit von Re-Stenosen und Todesfällen nicht mindern [138]; [161]. Gleichwohl reduzierte Abciximab in Kombination mit Heparin und Acetylsalicylsäure in plazebokontrollierten Studien die Rate an ischämischen Komplikationen signifikant [80]; [100]; [185].

Abciximab bindet als monoklonaler Antikörper darüber hinaus mit ähnlicher Affinität auch an den Vitronectin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  [42]; [102]; [131]; [176]; [185]. Dieser Rezeptor ist unter anderem bei der Migration von Endothelzellen, der Monozytenadhäsion, Angiogenese und wie auch ICAM-1 bei der Hemmung der Apoptose von Bedeutung [100]; [144]. In etwas schwächerem Ausmaß blockiert Abciximab auch die Interaktion zwischen Fibrinogen und ICAM-1 [163]; [167]. Rauch et al. beobachteten eine Migration von humanen glatten Gefäßmuskelzellen (human vascular smooth muscle cells, SMC) nach Fibrinogen-Inkubation, die durch Antikörper gegen ICAM-1, nicht jedoch durch Abciximab inhibierbar war [148].

Ein Einfluss von ICAM-1 auf den Vasotonus der Gefäße ist ebenfalls denkbar, jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Unsere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Vitronectin-Rezeptor durch Fibrinogen aktiviert wird und eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Vasorelaxation spielt. Denn wir konnten in den exemplarischen Untersuchungen

zeigen, dass die Zugabe von Abciximab die Fibrinogen-induzierte Vasorelaxation der A. mammaria interna fast vollständig hemmte.

Somit haben sich an humanen Gefäßen erste Hinweise auf eine direkte vasomotorische Wirkung von Fibrinogen auf humane Gefäße finden lassen, die möglicherweise zur Aufklärung der Pathogenese des RAE beitragen. Weitere Untersuchungen sowie klinische Beobachtungen müssen folgen, um aus diesen Erkenntnissen einen möglichen Behandlungsansatz entwickeln zu können.

## **6.6 Weiterführende Untersuchungen**

Zur Verifizierung und weiteren Charakterisierung der Wirkung des Fibrinogens auf die Pathogenese des RAE könnte die Wiederholung unserer Versuche nach Inkubation mit Antikörpern gegen ICAM-1 oder mit direkter Zugabe eines ACEH in therapeutischer Dosis in das Organbad erfolgen. Sinnvoll wären auch molekularbiologische Untersuchungen. Dabei könnte der Signaltransduktionsweg weiter aufgeklärt und die zentrale Rolle des  $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors und die Bedeutung von ICAM-1 geklärt und ggf. bestätigt werden. Als Modell wäre dazu unter Umständen auch die A. umbilicalis geeignet. Diese reagiert zwar mit Kontraktion und damit gegenläufig zu den adulten Gefäßen auf die Fibrinogen-Zugabe. Allerdings würde diese funktionelle Aussage je nach Fragestellung ohnehin an Relevanz verlieren. Es wäre aber auch denkbar, Versuchsreihen im Organbad mit der A. umbilicalis durchzuführen und dabei zu prüfen, ob die Kontraktion durch Fibrinogen sich analog zur Dilatation bei der A. mammaria interna mit Abciximab mindern lässt.

Weiterhin ist eine Beteiligung des venösen Systems beim AÖ nicht ausgeschlossen und könnte untersucht werden.

Es ist möglich, dass auch andere Entzündungsparameter einen Einfluss auf den Vasotonus besitzen, was sich ebenfalls durch Organbadversuche feststellen ließe. Die Auswirkung einer Kombination von erhöhten Entzündungsparametern könnte durch Inkubationsversuche getestet werden.

## 7 Zusammenfassung

Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Blocker gehören zu den am häufigsten verwendeten Antihypertonika und werden im Allgemeinen gut vertragen. Eine seltene, aber lebensbedrohliche unerwünschte Wirkung ist dabei das Angioödem (AÖ). Bisher wurde die Bradykinin-Akkumulation bei ACE-Hemmung für die Ausbildung eines AÖ verantwortlich gemacht. Bei Untersuchungen von Patienten, die aufgrund eines RAAS-Blocker-induzierten Angioödems hospitalisiert wurden, fielen neben pathologischen Bradykininwerten im Blut jedoch auch erhöhte Fibrinogen-Plasmaspiegel auf, die nicht durch ein infektiöses Geschehen zu erklären waren.

Wir untersuchten daher im Organbad den Einfluss von Bradykinin und erstmals auch die direkte vasomotorische Wirkung des Akute-Phase-Proteins Fibrinogen auf humane Gefäße, genauer auf die Nabelschnurarterie (HUA) sowie auf die Brustwandarterie (IMA), um die Beteiligung von Fibrinogen an der Pathogenese des Ödems zu prüfen. Zunächst erfolgte ein Kontraktionstest mit KCl und die Überprüfung der Intaktheit des Endothels. Die Relaxation der HUA durch Substanz P war dabei Stickstoffmonoxid (NO)-abhängig, die Dilatation der IMA durch Acetylcholin scheint neben NO- auch EDHF-vermittelt zu sein. In den anschließenden Versuchsreihen mit Bradykinin und Fibrinogen zeigte die HUA eine kontraktile, die IMA jeweils eine dilatative Antwort. Um die Vermittlung der Relaxation an der IMA zu klären, wurden auch Dosis-Wirkungs-Kurven von Fibrinogen nach Inkubation des GPIIb/IIIa-Inhibitors Abciximab durchgeführt. Hier zeigte sich die Relaxation nach Fibrinogen-Zugabe hoch signifikant gemindert. Da neben GPIIb/IIIa-Rezeptoren auch der Vitronectin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  durch Abciximab gehemmt wird, legen unsere Ergebnisse nahe, dass dieser eine Rolle bei der Vasodilatation und möglicherweise in der Folge bei der Ausbildung eines Ödems spielen könnte.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] ABBAS F, CLAYTON JK, MARSHALL KM, SENIOR J. Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery. In: *J Endocrinol* 156 (1998): 389–394
- [2] ABDALLA S, LOTHER H, EL MASSIERY A, QUITTERER U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. In: *Nat Med* 7 (2001): 1003–1009
- [3] AGOSTONI A, CICARDI M, CUGNO M, ZINGALE LC, GIOFFRÉ D, NUSSBERGER J. Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors. In: *Immunopharmacology* 44 (1999): 21–25
- [4] AGOSTONI A, CUGNO M. The kinin system: biological mechanisms and clinical implications. In: *Recenti Prog Med* 92 (2001): 764–773
- [5] ALTURA BM. Comparative contractile actions of different kinins on human umbilical arteries and veins. In: *Eur J Pharmacol* 19 (1972): 171–179
- [6] AMARNANI S, SANGRAT B, CHAUDHURI G. Effects of selected endothelium-dependent vasodilators on fetoplacental vasculature: physiological implications. In: *Am J Physiol.* 277 (1999): H842–H847
- [7] ANDERSON MW, DESHAZO RD. 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): 856–858
- [8] AONO Y, OHKUBO T, KIKUYA M, HARA A, KONDO T, OBARA T, METOKI H, INOUE R, ASAYAMA K, SHINTANI Y, HASHIMOTO J, TOTSUNE K, HOSHI H, SATOH H, IZUMI S, IMAI Y. Plasma fibrinogen, ambulatory blood pressure, and silent cerebrovascular lesions: the Ohasama study. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007): 963–968
- [9] ATALIK KE, KILIÇ M, NURULLAHOGLU ZU, DOĞAN N. Effects of cooling and warming on 5-hydroxytryptamine- and acetylcholine-induced contractions of human umbilical vessels: role of nitric oxide. In: *Fundam Clin Pharmacol* 22 (2008): 37–44
- [10] BAS M, ADAMS V, SUVORAVA T, NIEHUES T, HOFFMANN TK, KOJDA G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. In: *Allergy* 62 (2007): 842–856
- [11] BAS M, HOFFMANN TK, BIER H, KOJDA G. Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema. In: *Br J Clin Pharmacol* 59 (2005): 233–238
- [12] BAS M, HOFFMANN TK, KOJDA G, BIER H. ACE-inhibitor induced angioedema. In: *Laryngorhinootologie* 86 (2007): 804–808
- [13] BAS M, HOFFMANN TK, KOJDA G. Evaluation and management of angioedema of the head and neck. In: *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14 (2006): 170–175
- [14] BAS M, KIRCHHARTZ N, HOCHFELD J, TÜLLMANN C, KUMPF S, SUVORAVA T, OPPERMANN M, HAFNER D, BIER H, HOFFMANN TK, BALZ V, KOJDA G. Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. In: *J Allergy Clin Immunol* 4 (2008): 969–975
- [15] BAS M, KOJDA G, BIER H, HOFFMANN TK. ACE inhibitor-induced angioedema in the head and neck region. A matter of time? In: *HNO* 52 (2004): 886–890
- [16] BAUERSACHS J, POPP R, HECKER M, SAUER E, FLEMING I, BUSSE R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Circulation* 94 (1996): 3341–3347

- [17] BAYES-GENIS A, MATEO J, SANTALÓ M, OLIVER A, GUINDO J, BADIMON L, MARTÍNEZ-RUBIO A, FONTCUBERTA J, SCHWARTZ RS, DE LUNA AB. D-Dimer is an early diagnostic marker of coronary ischemia in patients with chest pain. In: *Am Heart J* 140 (2000): 379–384
- [18] BENDERLY M, GRAFF E, REICHER-REISS H, BEHAR S, BRUNNER D, GOLDBOURT U. Fibrinogen is a predictor of mortality in coronary heart disease patients. The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Group. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996): 351–356
- [19] BERKENBOOM G, DEPIERREUX M, FONTAINE J. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. In: *Br J Pharmacol* 92 (1987): 113–120
- [20] BERMAN M, HASDAI D, RAANANI E, GEORGHIU GP, KAPUSTIN L, CHEPURKO Y, VIDNE BA, HOCHHAUSER E. Ex-vivo effect of roxithromycin on human and rat arterial vasoactivity. In: *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 4 (2005): 232–237
- [21] BERTHIAUME N, CLAING A, REGOLI D, WARNER TD, D'ORLÉANS-JUSTE P. Characterization of receptors for kinins and neuropeptides in the arterial and venous mesenteric vasculatures of the guinea-pig. In: *Br J Pharmacol* 115 (1995): 1319–1325
- [22] BHARUCHA K, KULKARNI S, NAIR S, GHOSH K, MOHANTY D, WALVEKAR V, RAUT V. Functional and fibrinogen receptor studies in platelets in pre-eclamptic toxæmia of pregnancy. In: *Platelets* 10 (1999): 197–202
- [23] BLAIS C JR, ROULEAU JL, BROWN NJ, LEPAGE Y, SPENCE D, MUÑOZ C, FRIBORG J, GEADAH D, GERVAIS N, ADAM A. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. In: *Immunopharmacology* 43 (1999): 293–302
- [24] BLUMENSTEIN M, McMMASTER MT, BLACK MA, WU S, PRAKASH R, COONEY J, McCOWAN LM, COOPER GJ, NORTH RA. A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease. In: *Proteomics* 9 (2009): 2929–2945
- [25] BODA Z. Fibrinogen as an independent cardiovascular risk factor and the question of treatment with fibrinogen-lowering drugs. In: *Orv Hetil* 138 (1997): 2455–2460
- [26] BODELSSON G, STJERNQUIST M. Endothelium-dependent relaxation to substance P in human umbilical artery is mediated via prostanoid synthesis. In: *Hum Reprod* 9 (1994): 733–737
- [27] BOLTON TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. In: *Physiol Rev* 59 (1979): 606–718
- [28] BORAZAN A, USTÜN H, YILMAZ A. Angioedema induced by angiotensin II blocker telmisartan. In: *Allergy* 58 (2003): 454
- [29] BOTS ML, ELWOOD PC, SALONEN JT, FREIRE DE CONCALVES A, SIVENIUS J, DI CARLO A, NIKITIN Y, BENETOU V, TUOMILEHTO J, KOUDSTAAL PJ, GROBBEE DE. 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 (2002), Suppl 1: i14–i18
- [30] BROWN MA, ZAMMIT VC, MITAR DA, WHITWORTH JA. Renin-aldosterone relationships in pregnancy-induced hypertension. In: *Am J Hypertens* 5 (1992): 366–367

- [31] BROWN NJ, SNOWDEN M, GRIFFIN MR. Recurrent angiotensin-converting enzyme inhibitor--associated angioedema. In: *JAMA* 278 (1997): 232–233
- [32] BUIKEMA H, GRANDJEAN JG, VAN DEN BROEK S, VAN GILST WH, LIE KI, WESSELING H. Differences in vasomotor control between human gastroepiploic and left internal mammary artery. In: *Circulation* 86 (1992): II205–II209
- [33] BULUK K, MALOFIEJEW M, CZOKALO M. Unknown properties of the products of plasmin-degradation of fibrinogen and fibrin. In: *Bull Acad Pol Sci Biol* 14 (1966): 193–197
- [34] BULUK K, MALOFIEJEW M. The pharmacological properties of fibrinogen degradation products. In: *Br J Pharmacol* 35 (1969): 79–89
- [35] BYRD JB, ADAM A, BROWN NJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. In: *Immunol Allergy Clin North Am* 26 (2006): 725–737
- [36] CALIXTO B, MEDEIROS R, FERNANDES ES, FERREIRA J, CABRINI DA, CAMPOS MM. Kinin B1 receptors: key G-protein coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. In: *Br J Pharmacol* 143 (2004): 808–818
- [37] CAMPBELL DJ, KRUM H, ESLER MD. Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation* 111 (2005): 315–320
- [38] CHATAIGNEAU T, FÉLÉTOU M, HUANG PL, FISHMAN MC, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. In: *Br J Pharmacol* 126 (1999): 219–226
- [39] CLYMAN RI, SANDLER JA, MANGANELLO VC, VAUGHAN M. Guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery. In: *J Clin Invest* 55 (1975): 1020–1025
- [40] COCKCROFT JR, SCIBERRAS DG, GOLDBERG MR, RITTER JM. Comparison of angiotensin-converting enzyme inhibition with angiotensin II receptor antagonism in the human forearm. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (1993): 579–584
- [41] COLEMAN HA, TARE M, PARKINGTON HC. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31 (2004): 641–649
- [42] COLLER BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. In: *Am Heart J* 138 (1999): S1–S5
- [43] COULTER DM, EDWARDS IR. Cough associated with captopril and enalapril. In: *Br Med J (Clin Res Ed)* 294 (1987): 1521–1523
- [44] DE SILVA SR, SHAWE JE, PATEL H, CUDWORTH AG. Plasma fibrinogen in diabetes mellitus. In: *Diabète Metab* 5 (1979): 201–206
- [45] D'ERASMO E, PISANI D, ROMAGNOLI S, RAGNO A, ACCA M. Clinical and prognostic significance of hyperfibrinogenemia in cerebral ischemia. In: *J Med* 29 (1998): 115–123
- [46] DINARDO LJ, HENDRIX RA, ANDERSON G, DEDIO RM. Angiotensin-converting enzyme inhibitor induced angioedema of the head and neck. In: *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 42 (1990): 998–1001
- [47] DYKEWICZ MS. Cough and angioedema from angiotensin-converting enzyme inhibitors: new insights into mechanisms and management. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4 (2004): 267–270
- [48] FÉLÉTOU M, MARTIN CA, MOLIMARD M, NALINE E, GERMAIN M, THURIEAU C, FAUCHÈRE JL, CANET E, ADVENIER C. In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue. In: *Eur J Pharmacol* 274 (1995): 57–64

- [49] FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. The alternative: EDHF. In: *J Mol Cell Cardiol* 31 (1999): 15–22
- [50] FOLSOM AR. Epidemiology of fibrinogen. In: *Eur Heart J* 16 (1995), Suppl A: 21–24
- [51] FORSTER C, MOHAN J, WHALLEY ET. Dose-dependent nature of the interaction of fibrinogen-degradation products and 5-hydroxytryptamine on various vascular smooth muscle preparations. In: *Br J Pharmacol* 68 (1980): 151P
- [52] FRIEL AM, HYNES PG, SEXTON DJ, SMITH TJ, MORRISON JJ. Expression levels of mRNA for Rho A/Rho kinase and its role in isoprostane-induced vasoconstriction of human placental and maternal vessels. In: *Reprod Sci* 15 (2008): 179–188
- [53] FUJISAWA H, ITO H, KASHIWAGI S, NOMURA S, TOYOSAWA M. Kallikrein-kinin system in chronic subdural haematomas: its roles in vascular permeability and regulation of fibrinolysis and coagulation. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59 (1995): 388–394
- [54] FULLER RW, DIXON CM, CUSS FM, BARNES PJ. Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. Mode of action. In: *Am Rev Respir Dis* 135 (1987): 176–180
- [55] FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. In: *FASEB J* 3 (1989): 2007–2018
- [56] FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (1980): 373–376
- [57] GANNON TH, EBY TL. Angioedema from angiotensin converting enzyme inhibitors: a cause of upper airway obstruction. In: *Laryngoscope* 100 (1990): 1156–1160
- [58] GARDINER EE, D'SOUZA SE. A mitogenic action for fibrinogen mediated through intercellular adhesion molecule-1. In: *J Biol Chem* 272 (1997): 15474–15480
- [59] GENINI GF, COMEGLIO M, COLELLA A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. In: *Eur Heart J* 19 (1998): A53–A61
- [60] GIBBS CR, LIP GY, BEEVERS DG. Angioedema due to ACE inhibitors: increased risk in patients of African origin. In: *Br J Clin Pharmacol* 48 (1999): 861–865
- [61] GIL M, ZAREBIŃSKI M, ADAMUS J. Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. In: *Int J Cardiol* 83 (2002): 43–46
- [62] GOBEIL F, PHENG LH, BADINI I, NGUYEN-LE XK, PIZARD A, RIZZI A, BLOUIN D, REGOLI D. Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. In: *Br J Pharmacol* 118 (1996): 289–294
- [63] GOLLEDGE J, TURNER RJ, HARLEY SL, SPRINGALL DR, POWELL JT. Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. In: *J Clin Invest* 99 (1997): 2719–2726
- [64] GÖRING HD. 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): 822–825
- [65] GRAINICK HR, WILLIAMS SB, COLLER BS. Asialo von Willebrand factor interactions with platelets. Interdependence of glycoproteins Ib and IIb/IIIa for binding and aggregation. In: *J Clin Invest* 75 (1985): 19–25

- [66] GRANT NN, DEEB ZE, CHIA SH. Clinical experience with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. In: *Otolaryngol Head Neck Surg* 137 (2007): 931–935
- [67] GROSS DR, FISCUS RR, ARDEN WA, MALEY RH, LANZO S, SALLEY RK. Substance P induces biphasic endothelium-dependent relaxations in pig and rabbit carotid arteries. In: *Neuropeptides* 26 (1994): 329–341
- [68] GUO X, DICK L. Late onset angiotensin-converting enzyme induced angioedema: case report and review of the literature. In: *J Okla State Med Assoc* 92 (1999): 71–73
- [69] HARLEY SL, STURGE J, POWELL JT. 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): 652–658
- [70] HATAKE K, KAKISHITA E, WAKABAYASHI I, SAKIYAMA N, HISHIDA S. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. In: *Stroke* 21 (1990): 1039–1043
- [71] HAYAKAWA M. Coagulation-fibrinolysis and kinin-forming systems in toxemia of pregnancy. In: *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 40 (1988): 59–66
- [72] HE GW. Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries and veins. In: *J Card Surg* 17 (2002): 317–323
- [73] HERBERT JM, BERNAT A, CHATENET-DUCHÈNE L. Effect of ciprofibrate on fibrinogen synthesis in vitro on hepatoma cells and in vivo in genetically obese Zucker rats. In: *Blood Coagul Fibrinolysis* 10 (1999): 239–244
- [74] HICKS RC, GOLLEDGE J, MIR-HASSEINE R, POWELL JT. Vasoactive effects of fibrinogen on saphenous vein. In: *Nature* 379 (1996): 818–820
- [75] HICKS RC, MOSS J, HIGMAN DJ, GREENHALGH RM, POWELL JT. The influence of diabetes on the vasomotor responses of saphenous vein and the development of infra-inguinal vein graft stenosis. In: *Diabetes* 46 (1997): 113–118
- [76] HOLTHE MR, STAFF AC, BERGE LN, LYBERG T. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant and nonpregnant women. In: *Am J Obstet Gynecol* 190 (2004): 1128–1134
- [77] HOWES LG, CHRISTIE N. Angiotensin receptor antagonists and ACE inhibitors. In: *Aust Fam Physician* 27 (1998): 914–917, 919–921
- [78] HOWES LG, TRAN D. Can angiotensin receptor antagonists be used safely in patients with previous ACE inhibitor-induced angioedema? In: *Drug Saf* 25 (2002): 73–76
- [79] HUNYADY L, NAGY L. AT1 angiotensin receptor inhibition as a new therapeutic possibility. In: *Orv Hetil* 138 (1997): 2583–2590
- [80] IBBOTSON T, MCGAVIN JK, GOA KL. Spotlight on abciximab in patients with ischemic heart disease undergoing percutaneous coronary revascularization. In: *Am J Cardiovasc Drugs* 3 (2003): 381–386
- [81] IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987): 9265–9269
- [82] ISHIWATA S, NAKANISHI S, NISHIYAMA S, SEKI A. Prevention of restenosis by bezafibrate after successful coronary angioplasty. In: *Coron Artery Dis* 6 (1995): 883–889

- [83] ISRAILI ZH, HALL WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. In: *Ann Intern Med* 117 (1992): 234–242
- [84] IWAKI T, SANDOVAL-COOPER MJ, PAIVA M, KOBAYASHI T, PLOPLIS VA, CASTELLINO FJ. Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during development in the mouse. In: *Am J Pathol* 160 (2002): 1021–1034
- [85] JAMET M, LEVY G. Thrombolysis: biochemical basis of fibrinolysis. Fibrinogen. In: *Ann Anesthesiol Fr* 19 (1978): 683–686
- [86] JING M, PANICO FG, PANICO JL, LEDVINA MA, BINA S, MULDOON SM. Diaspirin cross-linked hemoglobin does not alter isolated human umbilical artery or vein tone. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 24 (1996): 621–628
- [87] KAMITANI T, LITTLE MH, ELLIS EF. Effect of leukotrienes, 12-HETE, histamine, bradykinin, and 5-hydroxytryptamine on in vivo rabbit cerebral arteriolar diameter. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 5 (1985): 554–559
- [88] KANNEL WB, D'AGOSTINO RB, BELANGER AJ. Update on fibrinogen as a cardiovascular risk factor. In: *Ann Epidemiol* 2 (1992): 457–466
- [89] KANNEL WB. Influence of fibrinogen on cardiovascular disease. In: *Drugs* 54 (1997), Suppl 3: 32–40
- [90] KAROW T, LANG-ROTH R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Thomas Karow Verlag, (2005): 316–319
- [91] KELLEHER CC. Plasma fibrinogen and factor VII as risk factors for cardiovascular disease. In: *Eur J Epidemiol* 8 (1992), Suppl 1: 79–82
- [92] KIRK A, MUTRIE N, MACINTYRE P, FISHER M. Increasing physical activity in people with type 2 diabetes. In: *Diabetes Care* 26 (2003): 1186–1192
- [93] KLOCKENBUSCH W, BRAUN MS, SCHRÖDER H, HECKENBERGER RE, STROBACH H, SCHRÖR K. Prostacyclin rather than nitric oxide lowers human umbilical artery tone in vitro. In: *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47 (1992): 109–115
- [94] KLONER RA, REZKALLA SH. To drink or not to drink? That is the question. In: *Circulation* 116 (2007): 1306–1317
- [95] KUGA T, EGASHIRA K, MOHRI M, TSUTSUI H, HARASAWA Y, URABE Y, ANDO S, SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. Bradykinin-induced vasodilation is impaired at the atherosclerotic site but is preserved at the spastic site of human coronary arteries in vivo. In: *Circulation* 92 (1995): 183–189
- [96] KUO L, CHILIAN WM, DAVIS MJ. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. In: *Circ Res* 66 (1990): 860–866
- [97] KVASNICKA J, BENDL J, ZIVNÝ J, UMLAUFOVÁ A, MASLOWSKÁ H. Changes in hemostasis and fibrinolysis in gestational diabetes. In: *Cas Lek Cesk* 135 (1996): 106–111
- [98] LAMBERT GA, DUCKWORTH JW, BOGDUK N, LANCE JW. Low pharmacological responsiveness of the vertebro-basilar circulation in Macaca nemestrina monkeys. In: *Eur J Pharmacol* 102 (1984): 451–458
- [99] LANGUINO LR, PLESCIA J, DUPERRAY A, BRIAN AA, PLOW EF, GELTOSKY JE, ALTIERI DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. In: *Cell* 73 (1993): 1423–1434
- [100] LECLERC JR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: lessons learned from clinical trials and future directions. In: *Crit Care Med* 30 (2002): S332–S340

- [101] LEEB-LUNDBERG LMF, MARCEAU F, MÜLLER-ESTERL W, PETTIBONE DJ, ZURAW B. International Union of Pharmacology: XLV Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. In: *Pharmacol Rev* 57 (2005): 27–77
- [102] LELE M, SAJID M, WAJID N, STOUFFER GA. Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit alpha(v)beta(3) integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin. In: *Circulation* 104 (2001): 582–587
- [103] LI Y, SPENCER FA, BALL S, BECKER RC. Inhibition of platelet-dependent prothrombinase activity and thrombin generation by glycoprotein IIb/IIIa receptor-directed antagonists: potential contributing mechanism of benefit in acute coronary syndromes. In: *J Thromb Thrombolysis* 10 (2000): 69–76
- [104] LINDSBERG PJ, GRAU AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. In: *Stroke* 34 (2003): 2518–2532
- [105] LIU ZG, GE ZD, HE GW. Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein. In: *Circulation* 102 (2000): III 296–301
- [106] LOMINADZE D, TSAKADZE N, SEN U, FALCONE JC, D'SOUZA SE. Fibrinogen and fragment D-induced vascular constriction. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (2005): H1257–H1264
- [107] LOVREN F, LI XF, LYTTON J, TRIGGLE C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. In: *Br J Pharmacol* 127 (1999): 1247–1255
- [108] LYÉ RH, PAUL KS, FORSTER CM, WHALLEY ET, DUTTON J. Effect of fibrin-fibrinogen degradation products on human basilar artery preparations. In: *J Neurosurg* 56 (1982): 339–343
- [109] MALDE B, REGALADO J, GREENBERGER PA. Investigation of angioedema associated with the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. In: *Ann Allergy Asthma Immunol* 98 (2007): 57–63
- [110] MANTEN GT, SIKKEMA JM, FRANX A, HAMEETEMAN TM, VISSER GH, DE GROOT PG, VOORBIJ HA. Increased high molecular weight fibrinogen in pre-eclampsia. In: *Thromb Res* 111 (2003): 143–147
- [111] MARCEAU F, BOUTHILLIER J, TREMBLAY B, ST-PIERRE S. Effects of low molecular weight fibrin degradation products 6A and 6D on rabbit aorta strips. In: *Agents Actions* 22 (1987): 43–49
- [112] MARESCA G, DI BLASIO A, MARCHIOLI R, DI MINNO G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999): 1368–1377
- [113] MATSUMOTO T, KINOSHITA M, TODA N. Mechanisms of endothelium-dependent responses to vasoactive agents in isolated porcine coronary arteries. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 21 (1993): 228–234
- [114] MAYNARD SE, MIN JY, MERCHAN J, LIM KH, LI J, MONDAL S, LIBERMANN TA, MORGAN JP, SELLKE FW, STILLMAN IE, EPSTEIN FH, SUKHATME VP, KARUMANCHI SA. Excess placental soluble fms-like tyrosinkinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. In: *J Clin Invest* 111 (2003): 649–658

- [115] McCABE J, STORK C, MAILLOUX D, SU M. Penile angioedema associated with the use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers. In: *Am J Health Syst Pharm* 65 (2008): 420–421
- [116] MCGRATH JC, MACLENNAN SJ, WHITTLE MJ. Comparison of the effects of oxygen, 5-hydroxytryptamine, bradykinin and adrenaline in isolated human umbilical artery smooth muscle. In: *Q J Exp Physiol* 73 (1988): 547–559
- [117] McNALLY PG, WATT PA, RIMMER T, BURDEN AC, HEARNSHAW JR, THURSTON H. Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Clin Sci (Lond)* 87 (1994): 31–36
- [118] MEADE TW, CHAKRABARTI R, HAINES AP, NORTH WR, STIRLING Y. Characteristics affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentrations. In: *Br Med J* 1 (1979): 153–156
- [119] MEISEL S, SHAMISS A, ROSENTHAL T. Clinical pharmacokinetics of ramipril. In: *Clin Pharmacokinet* 26 (1994): 7–15
- [120] MELMON KL, CLINE MJ, HUGHES T, NIES AS. Kinins: possible mediators of neonatal circulatory changes in man. In: *J Clin Invest* 47 (1968): 1295–1302
- [121] MERINO VF, TODIRAS M, CAMPOS LA, SAUL V, POPOVA E, BALATU OC, PESQUERO JB, BADER M. Increased susceptibility to endotoxic shock in transgenic rats with endothelial overexpression of kinin B(1) receptors. In: *J Mol Med* 86 (2008): 791–798
- [122] MITRA AG, CHESCHEIR NC, CEFALO RC, TATUM BS. Spontaneous resolution of hypofibrinogenemia in a triplet gestation associated with second trimester in utero death of two fetuses. In: *Am J Perinatol* 10 (1993): 448–449
- [123] MITSIAKOS G, GIOUGI E, CHATZIOANNIDIS I, KARAGIANNI P, PAPADAKIS E, TSAKALIDIS C, PAPAIOANNOU G, MALINDRETOS P, NIKOLAIDIS N. Haemostatic profile of healthy premature small for gestational age neonates. In: *Thromb Res* 126 (2010): 103–106
- [124] MONTADESCOT G, ANTONIUCCI D, KASTRATI A, NEUMANN FJ, BORENTAIN M, MIGLIORINI A, BOUTRON C, COLLET JP, VICAUT E. Abciximab in primary coronary stenting of ST-elevation myocardial infarction: a European meta-analysis individual patients' data with long-term follow-up. In: *Eur Heart J* 28 (2007): 443–449
- [125] MONTADESCOT G, COLLET JP, CHOUPPAT R, THOMAS D. Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease. In: *Eur Heart J* 19 (1998): H11–H17
- [126] MORGAN T, CRAVEN C, LALOUEL JM, WARD K. Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in first-trimester decidua. In: *Am J Obstet Gynecol* 180 (1999): 95–102
- [127] MORWOOD K, GILLIS D, SMITH W, KETTE F. Aspirin-sensitive asthma. In: *Intern Med J* 35 (2005): 240–246
- [128] NAGAI N, OIKE Y, IZUMI-NAGAI K, KOTO T, SATOFUKA S, SHINODA H, NODA K, OZAWA Y, INOUE M, TSUBOTA K, ISHIDA S. Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: minimal role of bradykinin. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (2007): 2321–2326
- [129] NICHOLLS MG. Side effects and metabolic effects of converting-enzyme inhibitors. In: *Clin Exp Hypertens A* 9 (1987): 653–664

- [130] NOVELLA S, MARTÍNEZ AC, PAGÁN RM, HERNÁNDEZ M, GARCÍA-SACRISTÁN A, GONZÁLEZ-PINTO A, GONZÁLEZ-SANTOS JM, BENEDITO S. Plasma levels and vascular effects of vasopressin in patients undergoing coronary artery bypass grafting. In: *Eur J Cardiothorac Surg* 32 (2007): 69–76
- [131] NURDEN P. GPIIb-IIIa inhibitors. In: *Transfus Clin Biol* 8 (2001): 114–122
- [132] NUSSBERGER J, CUGNO M, AMSTUTZ C, CICARDI M, PELLACANI A, AGOSTONI A. Plasma bradykinin in angio-oedema. In: *Lancet* 351 (1998): 1693–1697
- [133] OKATANI Y, WAKATSUKI A, WATANABE K, TANIGUCHI K, FUKAYA T. Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. In: *Eur J Pharmacol* 417 (2001): 125–129
- [134] ONUYE H, KAITO N, TOKUDOME S, ABE T, TASHIBU K, NAGASHIMA H, NAKAMURA N. Investigation of postmortem functional changes in human cerebral arteries. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 13 (1993): 346–349
- [135] ONTARGET INVESTIGATORS, YUSUF S, TEO KK, POGUE J, DYAL L, COPLAND I, SCHUMACHER H, DAGENAIS G, SLEIGHT P, ANDERSON C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. In: *N Engl J Med* 358 (2008): 1547–1559
- [136] 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): 827–832
- [137] PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. In: *Nature* 327 (1987): 524–526
- [138] PANNU R, ANDRAWS R. Effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel: a meta-analysis of randomized trials. In: *Crit Pathw Cardiol* 7 (2008): 5–10
- [139] PARASNIS H, RAJE B, HINDUJA IN. Relevance of plasma fibrinogen estimation in obstetric complications. In: *J Postgrad Med* 38 (1992): 183–185
- [140] PARISH RC, MILLER LJ. Adverse effects of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. An update. In: *Drug Saf* 7 (1992): 14–31
- [141] PARKINGTON HC, TONTA MA, BRENNCKE SP, COLEMAN HA. Contractile activity, membrane potential, and cytoplasmic calcium in human uterine smooth muscle in the third trimester of pregnancy and during labor. In: *Am J Obstet Gynecol* 181 (1999): 1445–1451
- [142] PEACH MJ, LOEB AL, SINGER HA, SAYE J. Endothelium-derived vascular relaxing factor. In: *Hypertension* 7 (1985): I94–I100
- [143] PELOROSSO FG, BRODSKY PT, ZOLD CL, ROTHLIN RP. Potentiation of des-Arg9-kallidin-induced vasoconstrictor responses by metallopeptidase inhibition in isolated human umbilical artery. In: *J Pharmacol Exp Ther* 313 (2005): 1355–1360
- [144] PLUSKOTA E, D'SOUZA SE. Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival. In: *Eur J Biochem* 267 (2000): 4693–4704
- [145] QUAN A, LEUNG SW, LAO TT, MAN RY. 5-hydroxytryptamine and thromboxane A2 as physiologic mediators of human umbilical artery closure. In: *J Soc Gynecol Investig* 10 (2003): 490–495

- [146] RADENKOVIĆ M, GRBOVIĆ L, RADUNOVIĆ N, MOMCILOV P. Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. In: *Pharmacol Rep* 59 (2007): 64–73
- [147] RAKOWSKI T, ZALEWSKI J, LEGUTKO J, BARTUS S, RZESZUTKO L, DZIEWIERZ A, SORYSZ D, BRYNIARSKI L, ZMUDKA K, KALUZA GL, DUBIEL JS, DUDEK D. Early abciximab administration before primary percutaneous coronary intervention improves infarct-related artery patency and left ventricular function in high-risk patients with anterior wall myocardial infarction: a randomized study. In: *Am Heart J* 153 (2007): 360–365
- [148] RAUCH BH, MÜSCHENBORN B, BRAUN M, WEBER AA, SCHRÖR K. ICAM-1 and p38 MAPK mediate fibrinogen-induced migration of human vascular smooth muscle cells. In: *Eur J Pharmacol* 577 (2007): 54–57
- [149] RAZA-AHMAD A. Fibrinogen: a diagnostic marker for early ischemia. In: *Biotech Histochem* 69 (1994): 268–272
- [150] REGOLI D. Polypeptides and antagonists. In: *Sem Hop* 60 (1984): 987–1002
- [151] RENOWDEN S, EDWARDS DH, GRIFFITH TM. Impaired cyclic nucleotide-mediated vasorelaxation may contribute to closure of the human umbilical artery after birth. In: *Br J Pharmacol* 106 (1992): 348–353
- [152] RENZ-POLSTER H, KRAUTZIG S, BRAUN J. *Basislehrbuch Innere Medizin*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage (2004): 1268
- [153] ROBERTS JR, WUERZ RC. Clinical characteristics of angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. In: *Ann Emerg Med* 20 (1991): 555–558
- [154] ROSENBLUM WI. Endothelial dependent relaxation demonstrated in vivo in cerebral arterioles. In: *Stroke* 17 (1986): 494–497
- [155] ROSKIEWICZ F, ANDRIAMANANA I, GRAS-CHAMPEL V, ANDREJAK M, MASSY ZA. Iatrogenic angioedema: the role of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blockers. In: *Nephrol Ther* 3 (2007): 89–95
- [156] SAKAKIBARA H, FUJII C, NAITO M. Plasma fibrinogen and its association with cardiovascular risk factors in apparently healthy Japanese subjects. In: *Heart Vessels* 19 (2004): 144–148
- [157] SALDEEN K, NICHOLS W, LAWSON D, ANDERSSON R, SALDEEN T, MEHTA J. Fibrin(ogen) degradation product peptide 6A increases femoral artery blood flow in dogs. In: *Acta Physiol Scand* 142 (1991): 339–344
- [158] SCHIEBLER TH, SCHMIDT W, ZILLES K. *Anatomie*, Springer Verlag, 8. Auflage (1999): 514–516
- [159] SCHMIDT R, FAZEKAS F, HAYN M, SCHMIDT H, KAPELLER P, ROOB G, OFFENBACHER H, SCHUMACHER M, EBER B, WEINRAUCH V, KOSTNER GM, ESTERBAUER H. Risk factors for microangiopathy-related cerebral damage in the Austrian stroke prevention study. In: *J Neurol Sci* 152 (1997): 15–21
- [160] SCHOEFFTER P, DION R, GODFRAIND T. Modulatory role of the vascular endothelium in the contractility of human isolated internal mammary artery. In: *Br J Pharmacol* 95 (1988): 531–543

- [161] SCHÜHLEN H, KASTRATI A, MEHILLI J, HAUSLEITER J, DIRSCHINGER J, DOTZER F, BOLLWEIN H, SCHÖMIG A. Abciximab and angiographic restenosis after coronary stent placement. Analysis of the angiographic substudy of ISAR-REACT – a double-blind, placebo-controlled, randomized trial evaluating abciximab in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions after pretreatment with a high loading dose of clopidogrel. In: *Am Heart J* 151 (2006): 1248–1254
- [162] SCHUSTER C, REINHART WH, HARTMANN K, KUHN M. Angioedema induced by ACE inhibitors and angiotensin II-receptor antagonists: analysis of 98 cases. In: *Schweiz Med Wochenschr* 129 (1999): 362–369
- [163] SCHWARZ M, NORDT T, BODE C, PETER K. The GP IIb/IIIa inhibitor abciximab (c7E3) inhibits the binding of various ligands to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, alphaMbeta2). In: *Thromb Res* 107 (2002): 121–128
- [164] SEGUIN T, BULEON M, DESTRUBE M, RANERA MT, COUTURE R, GIROLAMI JP, TACK I. Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxic shock in mice. In: *Int Immunopharmacol* 8 (2008): 217–221
- [165] SHAH DM. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. In: *Curr Hypertens Rep* 8 (2006): 144–152
- [166] SI H, HEYKEN WT, WÖLFLE SE, TYSIAC M, SCHUBERT R, GRGIC I, VILIANOVICH L, GIEBING G, MAIER T, GROSS V, BADER M, DE WIT C, HOYER J, KÖHLER R. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. In: *Circ Res* 99 (2006): 537–544
- [167] SIMON DI, XU H, ORTLEPP S, ROGERS C, RAO NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997): 528–535
- [168] SIMPSON HC, MANN JI, MEADE TW, CHAKRABARTI R, STIRLING Y, WOOLF L. Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. In: *Lancet* 1 (1983): 786–790
- [169] SMOGER SH, SAYED MA. Simultaneous mucosal and small bowel angioedema due to captopril. In: *South Med J* 91 (1998): 1060–1063
- [170] STAUBER M, WEYERSTAHL T. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Duale Reihe Thieme Verlag, 2. Auflage (2005): 675–678
- [171] STAUBER M, WEYERSTAHL T. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Duale Reihe Thieme Verlag, 2. Auflage (2005): 544–546
- [172] STRINGER KA. The evolving role of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in the management of acute coronary syndromes. In: *Ann Pharmacother* 33 (1999): 712–722
- [173] SUEISHI K, NANNO S, TANAKA K. Permeability enhancing and chemotactic activities of lower molecular weight degradation products of human fibrinogen. In: *Thromb Haemost* 45 (1981): 90–94
- [174] SYMONDS EM, BROUGHTON PIPKIN F, CRAVEN DJ. Changes in the renin-angiotensin system in primigravidae with hypertensive disease of pregnancy. In: *Br J Obstet Gynaecol* 82 (1975): 643–650
- [175] TALBOT S, CHAHMI E, PENA DIAS J, COUTURE R. Key role for spinal dorsal horn for microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. In: *J Neuroinflammation* 7 (2010): 36

- [176] TAM SH, SASSOLI PM, JORDAN RE, NAKADA MT. Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. In: *Circulation* 98 (1998): 1085–1091
- [177] TASATARGIL A, GOLBASI I, SADAN G, KARASU E. Unfractioned heparin produces vasodilatory action on human internal mammary artery by endothelium-dependent mechanisms. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 45 (2005): 114–119
- [178] TASATARGIL A, SADAN G, GOLBASI I, KARASU E, TURKAY C. Effects of short-term exposure to homocysteine on vascular responsiveness of human internal mammary artery. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 43 (2004): 692–697
- [179] TEMPFER CB, BRUNNER A, BENTZ EK, LANGER M, REINTHALER A, HEFLER LA. Intrauterine fetal death and delivery complications associated with coagulopathy: a retrospective analysis of 104 cases. In: *J Womens Health (Larchmt)* 18 (2009): 469–474
- [180] THIND GS. Angiotensin converting enzyme inhibitors: comparative structure, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. In: *Cardiovasc Drugs Ther* 4 (1990): 199–206
- [181] THOMAS G, VARGAS R, WROBLEWSKA B, RAMWELL PW. Role of the endothelium and arginine peptides on the vaso-motor response of porcine internal mammary artery. In: *Life Sci* 44 (1989): 1823–1830
- [182] THORIN-TRESCASES N, HAMILTON CA, REID JL, MCPHERSON KL, JARDINE E, BERG G, BOHR D, DOMINICZAK AF. Inducible L-arginine/nitric oxide pathway in human internal mammary artery and saphenous vein. In: *Am J Physiol* 268 (1995): H1122–H1132
- [183] TIRITILLI A, EL HABACH T, HAURY L, DURET JF. BK2 but not BK1 receptors mediating contractile response in human umbilical arteries: role of thromboxane A2. In: *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26 (2004): 247–252
- [184] TIRITILLI A. 5-hydroxytryptamine induces vasoconstriction of the human umbilical artery: effects of hypoxia and nicorandil. In: *Gynecol Obstet Invest* 50 (2000): 77–83
- [185] TOPOL EJ, FERGUSON JJ, WEISMAN HF, TCHENG JE, ELLIS SG, KLEIMAN NS, IVANHOE RJ, WANG AL, MILLER DP, ANDERSON KM, CALIFF RM. Long-term protection from myocardial ischemic events in a randomized trial of brief integrin beta3 blockade with percutaneous coronary intervention. EPIC Investigator Group. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibition for Prevention of Ischemic Complication. In: *JAMA* 278 (1997): 479–484
- [186] TRIBOUILLOY C, PELTIER M, COLAS L, SENNI M, GANRY O, REY JL, LESBRE JP. Fibrinogen is an independent marker for thoracic aortic atherosclerosis. In: *Am J Cardiol* 81 (1998): 321–326
- [187] TSUJI T, COOK DA. Vasoconstrictor mechanism of neuropeptides augmented after endothelial removal in isolated, perfused canine basilar arteries. In: *Neurol Res* 17 (1995): 193–200
- [188] TSUKADA M, CHIBA S. Bradykinin-induced vascular responses in dog isolated lingual artery. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (1999): 456–460
- [189] TSUKAHARA Y, ITAKURA A, OHNO Y, ANDO H, MIZUTANI S. Umbilical plasma kininase I activity in fetal hypoxia. In: *Horm Metab Res* 35 (2003): 583–587

- [190] TUFAN H, AYAN-POLAT B, TECDER-UNAL M, POLAT G, KAYHAN Z, OĞUŞ E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levocromakalim. In: *Life Sci* 72 (2003): 1321–1329
- [191] USTÜN Y, ENGIN-USTÜN Y, KAMACI M. Association of fibrinogen and C-reactive protein with severity of preeclampsia. In: *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 121 (2005): 154–158
- [192] VAN DE STOLPE A, VAN DER SAAG PT. Intercellular adhesion molecule-1. In: *J Mol Med* 74 (1996): 13–33
- [193] VILLENEUVE E, BLAISE G, SILL JC, GUERARD MJ, BULURAN J, GIRARD D. Halothane 1.5 MAC, isoflurane 1.5 MAC, and the contractile responses of coronary arteries obtained from human hearts. In: *Anesth Analg* 72 (1991): 454–461
- [194] VINCENTI E, TAMBUSCIO B, MARCHESONI D, GRAZIOTTIN A, DI LENARDO L, CHIARANDA M. Use of intramyometrial injection of prostaglandin F 2 alpha in the management of intractable hemorrhage due to uterine atony. In: *Clin Exp Obstet Gynecol* 9 (1982): 26–30
- [195] VLEEMING W, VAN AMSTERDAM JG, STRICKER BH, DE WILDT DJ. ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management. In: *Drug Saf* 18 (1998): 171–188
- [196] VYSSOULIS GP, MARINAKIS AG, AZNAOURIDIS KA, KARPANOVA EA, ARAPOGIANNI AN, COKKINOS DV, STEFANADIS CI. The impact of third-generation beta-blocker antihypertensive treatment on endothelial function and the prothrombotic state: effects of smoking. In: *Am J Hypertens* 17 (2004): 582–589
- [197] WALLERSTEDT SM, BODELSSON M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. In: *Br J Pharmacol* 120 (1997): 25–30
- [198] WAREING M, MYERS JE, O'HARA M, KENNY LC, TAGGART MJ, SKILLERN L, MACHIN I, BAKER PN. Phosphodiesterase-5 inhibitors and omental and placental small artery function in normal pregnancy and pre-eclampsia. In: *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127 (2006): 41–49
- [199] WARNER KK, VISCONTI JA, TSCHAMPEL MM. Angiotensin II receptor blockers in patients with ACE inhibitor-induced angioedema. In: *Ann Pharmacother* 34 (2000): 526–528
- [200] WEI W, CHEN ZW, YANG Q, JIN H, FURNARY A, YAO XQ, YIM AP, HE GW. Vasorelaxation induced by vascular endothelial growth factor in the human internal mammary artery and radial artery. In: *Vascul Pharmacol* 46 (2007): 253–259
- [201] WEIR MR. Angiotensin-II receptor antagonists: a new class of antihypertensive agents. In: *Am Fam Physician* 53 (1996): 589–594
- [202] WILLIAMS VK, GRIFFITHS AB, CARBONE S, HAGUE WM. Fibrinogen concentration and factor VIII activity in women with preeclampsia. In: *Hypertens Pregnancy* 26 (2007): 415–421
- [203] YILDIZ O, SEYREK M, GUL H, UN I, YILDIRIM V, OZAL E, UZUN M, BOLU E. Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 45 (2005): 580–585
- [204] YU H, CARRETERO OA, JUNCOS LA, GARVIN JL. Biphasic effect of bradykinin on rabbit afferent arterioles. In: *Hypertension* 32 (1998): 287–292

- [205] ZAMUDIO S, LESLIE KK, WHITE M, HAGERMAN DD, MOORE LG. Low serum estradiol and high serum progesterone concentrations characterize hypertensive pregnancies at high altitude. In: *J Soc Gynecol Investig* 1 (1994): 197–205
- [206] ZELLER T, AMANTEA P, HORN B, RASTAN A, FRANK U, BÜRGELIN K, SCHWARZWÄLDER U, NEUMANN FJ. Belastungs-Duplexsonographie zur Verlaufskontrolle nach Arteria thoracica interna-Bypass auf den Ramus interventricularis anterior in MIDCAB-Technik. In: *Z Gefässmed* 3 (2006): 4–10
- [207] ZHOU Y, McMASTER M, WOO K, JANATPOUR M, PERRY J, KARPANEN T, ALITALO K, DAMSKY C, FISHER SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are deregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. In: *Am J Pathol* 160 (2002): 1405–1423
- [208] ZUPPA AA, MARAGLIANO G, MAZZOTTA M, GIRLANDO P, MARROCCO G, TORTOROLO G. Changes in liver protein synthesis in the preterm newborn infant of a pre-eclamptic mother and/or with intrauterine growth retardation. In: *Pediatr Med Chir* 16 (1994): 359–362

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

22.01.2013, Vera Susanne Ennekes