

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Molekulare Mechanismen nicht- allergischer arzneimittelinduzierter Angioödeme

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht
an Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marion Bisha

aus Düsseldorf

Düsseldorf, 2024

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Georg Kojda
2. Prof. Dr. Rainer Kalscheuer

Tag der mündlichen Prüfung:

02.06.2026

*In liebevoller Erinnerung an meine verstorbenen Eltern
Mustafa Bisha und Naifa Khawaja*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Das nicht-allergische Angioödem	1
1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie	1
1.1.1.1 Simvastatin und Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren	4
1.1.1.2 Sitagliptin, Angiotensin konvertierendes Enzym und Dipeptidylpeptidase IV	5
1.1.1.3 Angiotensin II-Typ1-Rezeptor-Antagonisten	9
1.1.1.4 Risperidon und C1-Hemmer	10
1.1.1.5 Fibrinolytika	11
1.1.1.6 Östrogen	12
1.1.1.7 Nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente (NSAID) ...	13
1.1.1.8 Andere Arten des arzneimittelinduzierten nicht-allergischen Angioödems	14
1.1.1.9 Hereditäres Angioödem (HAE)	14
1.1.1.10 Idiopathisches erworbenes Angioödem	16
1.1.2 Epidemiologie des nicht-allergischen Angioödems	16
1.1.3 Diagnostik	18
1.1.3.1 Medikamenteninduziertes Bradykinin-vermitteltes Angioödem	19
1.1.3.2 Hereditäres Angioödem	22
1.1.3.3 Akute Urtikaria	23
1.1.3.4 Allergisches Angioödem	23
1.1.4 Therapie	23
1.1.4.1 Absetzen von ACE-Hemmern	23
1.1.4.2 Pharmakologische Therapie	25
1.2 Das Kallikrein-Kinin-System (KKS)	33
1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	34
1.4 Die endotheliale Permeabilität	36
1.4.1 Physiologie	36
1.4.2 Mediatoren der erhöhten Permeabilität	40

1.4.3	Stabilisierende Mediatoren.....	43
1.5	Bradykinin und dessen Rezeptoren.....	44
1.6	Ziel der Studie	49
2	Material und Methoden	51
2.1	Puffer und Lösungen	51
2.2	Versuchstiere.....	54
2.2.1	Fütterungsversuche	55
2.2.2	B2 ^{tg} und ihre Genotypisierung.....	55
2.2.2.1	Genomische DNA-Isolierung aus der Schwanzspitze.....	56
2.2.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	56
2.2.2.3	Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR.....	56
2.2.2.4	DNA-Elektrophorese	57
2.2.3	Präparation der Tiere und Entnahme der Organe.....	58
2.3	Präparation und Analyse von Proteinen	60
2.3.1	Proteinisolierung aus Geweben der Maus	60
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	60
2.3.3	Western Blot	61
2.3.3.1	SDS-Page.....	62
2.3.3.2	Western-Blot-Protokoll.....	62
2.3.3.3	Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran.....	63
2.3.3.4	Antikörperdetektion.....	64
2.3.3.5	Detektion mit dem Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner	64
2.4	Präparation und Analyse der RNA (rtPCR)	65
2.4.1	RNA-Isolierung aus der Lunge.....	65
2.4.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	66
2.4.3	cDNA-Synthese	67
2.4.4	Real-time-RT-PCR.....	67
2.4.5	Versuchsaufbau	69
2.4.6	Relative Quantifizierung der mRNA-Expression	70
2.5	Morphologische Parameter der B2 ^{tg} Maus	71
2.6	Funktionelle Untersuchungen an der isolierten Aorta	71
2.6.1	Organbad-Messapparatur	72
2.6.2	Kalibrierung.....	72
2.6.3	Versuchsprotokoll	73

2.7	Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen an der Maus.....	74
2.8	Miles Assay	75
2.8.1	Versuchsprotokoll	76
2.8.1.1	Akutversuche	76
2.8.1.2	Versuche nach Vorbehandlung.....	77
2.8.1.3	Quantifizierung von Evans Blue.....	77
2.8.1.4	Kalibrierkurve.....	78
2.9	Two Photon-Laser-Scanning-Mikroskopie (TPLSM).....	79
2.10	ABRASE-Studie.....	82
2.10.1	Versuchsverlauf	83
2.10.2	Messung und Berechnung der Quaddel	84
2.10.3	Dokumentation und Endpunkte der Studie	85
2.11	Statistik.....	86
3	Ergebnisse	87
3.1	Charakterisierung der B2 ^{tg} -Maus.....	87
3.1.1	B2-Proteinexpression in der Aorta und der Lunge der B2 ^{tg}	87
3.1.2	B2-Rezeptor-mRNA-Expression in der Lunge der B2 ^{tg}	89
3.1.3	Morphologische Daten der B2 ^{tg}	90
3.1.4	Veränderung der vaskulären Bradykinin-Aktivität in B2 ^{tg}	90
3.1.5	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung in der B2 ^{tg}	92
3.1.5.1	Blutdruckmessung	92
3.1.5.2	Herzfrequenzmessung.....	93
3.2	Miles Assay: Bradykinin-induzierte Extravasation	94
3.2.1	Validierung der PBS-Kontrolle	95
3.2.2	Zeitabhängige Extravasation durch dermalen Bradykinin Injektion	96
3.2.3	Konzentrationsabhängige erhöhte vaskuläre Permeabilität	97
3.2.4	Hemmung der induzierten Extravasation durch Icatibant.....	99
3.2.4.1	Intraperitoneale Icatibant-Injektion.....	100
3.2.4.2	Intradermale Icatibant-Injektion.....	102
3.2.5	Einfluss der erhöhten B2 Expression in B2 ^{tg} auf die Extravasation	104
3.2.6	Erhöhte Extravasation durch Hemmung der ACE in C57BL/6-Mäusen	107
3.2.7	COX-abhängige Hemmung der endothelialen Permeabilität	110
3.2.7.1	Ibuprofen.....	111

3.2.7.2	Diclofenac	112
3.2.7.3	SC560 ein spezifischer COX1- Hemmer	112
3.2.7.4	Celecoxib und Rofecoxib, spezifische Inhibitoren der COX2	114
3.3	Two-Photon-Laser-Mikroskopie.....	116
3.4	„A Bradykinin in Skin Edema Trial“ (ABRASE)	119
3.4.1	Primäre Endpunkte der ABRASE.....	120
3.4.2	Sekundäre Endpunkte der ABRASE	121
3.4.3	Einfluss auf den primären Endpunkt durch die Quaddelgröße	122
4	Diskussion.....	124
4.1	Effekte der Überexpression humaner B2-Rezeptoren	124
4.2	Reaktivität der Aorta auf Bradykinin	128
4.3	Einfluss der Überexpression auf den Blutdruck	132
4.4	Erhöhte Gefäßpermeabilität durch Bradykinin	133
4.5	Funktionelle Aspekte der ACE-vermittelten Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion	136
4.6	ABRASE-Studie.....	139
4.7	Limitationen der Untersuchungen.....	142
4.8	Schlussfolgerung	143
	Zusammenfassung	145
	Summary	147
	Literaturverzeichnis	148
	Publikationen	191
	Lebenslauf	195
	Danksagung	2
	Eidesstattliche Erklärung	3

Abkürzungsverzeichnis

ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2
ACEI	ACE-Inhibitor
ACEI-AE	ACEI-induziertes Angioödem
ADH	antidiuretisches Hormon
AJs	Adherens Junctions
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ANG-(1-7)	Angiotensin (1-7)
Ang2	Angiopoeitin-2
ANOVA	Analysis of Variance
APP	Aminopeptidase P
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT1R	ANG-II-Typ-1-Rezeptor
B2 ⁿ	Transgen-negatives Geschwistertiere der Mäuselinie BKtg (entspricht Mäuselinie BKn)
bEND.3	Hirndothelzellen
BK	Bradykinin
BKR-2	Bradykinin-Typ-2-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
C1	Komplementprotein 1
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C3	Komplementprotein 3
C4	Komplementprotein 4
C5b	Komplementfaktor C5b
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-bindende Protein
cDNA	complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPN	Carboxypeptidase N
CREB	cAMP-Response-Element-Bindungsprotein
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV
ECM	extrazelluläre Matrix
ECs	Endothelzellen

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAK	fokale Ahäsionskinase
FAP-alpha	Fibroblasten-Aktivierungsprotein-alpha
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FXII	Hageman-Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HAE	hereditäres Angioödem
HbA1c	Hämoglobin A1C
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HIS	Histamin
HK	hochmolekulares Kininogen
hK1	Gewebekallikrein
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
i. d.	intradermal
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IAE-H	idiopathisches histaminerges erworbenes Angioödem
IAE-NH	nicht-histaminerges erworbenes Angioödem
ICAM	intercellular adhesion molecule
IEJs	interendotheliale Verbindungsstellen, Interendothelial Junctions
IgE	Immunglobulin E, Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltriphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LD	Labradimil
LMWK	Low Molecular Weight Kininogen
L-NA	N ω -Nitro-L-Arginin
L-NAME	L-Nitroargininmethyl-Ester
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAP	mitogen-aktiviertes Protein

mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MYLK	Myosin-Leichtketten-Kinase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ P ₂ O ₄	Natriumpyrophosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NEP	neutrale Endopeptidase
NF-κB	nuclear factor kappa b
NK1	Neurikininrezeptor 1
NKR	Neurokininrezeptor 1
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAID	nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
PAEC	Aortenendothelzellen
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Saliner Phosphat-Puffer (Phosphate buffer saline)
PBST	Phosphate-Buffered Saline/Tween
PDGF	Platelet-derived growth factor
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E2
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rac-1	Rac Family Small GTPase 1
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtPCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SPF	spezieller pathogenfreier Bereich
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming growth factor beta
TJs	Tight Junctions
TLR	Toll-Like Rezeptor
tPA	Gewebeplasminogenaktivator
TPLSM	Two Photon-Laser-Scanning-Mikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPC	Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monooleat
V/V	Volumenprozent
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZO	Zonula occludens
λ	Wellenlänge

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Synthese- und Degradierungswege sowie der Wirkungsvermittlung von Bradykinin	5
Abbildung 2: Diagnostische Algorithmen für das Angioödem	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Angioödembildung aufgrund der pharmakologischen Hemmung des Angiotensin Converting Enzyms (ACE).....	34
Abbildung 4: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	36
Abbildung 5: Darstellung der Interendothelial Junctions (IEJs)	39
Abbildung 6: Struktur und der Metabolismus von Bradykinin	45
Abbildung 7: Schema des transgenen Konstruktes der Genotypisierungs-PCR.....	57
Abbildung 8: A Eine B2 ^{tg} Maus mit endothelspezifischer Überexprimierung des B2-Rezeptors. B Ein Beispielgel als Abbildung für die Mauslinie (B2 ^{tg}).....	58
Abbildung 9: Euthanasierte C57BL/6-Maus A. vor und B. nach Entfernung des Brustfells zur Vorbereitung der Organentnahme.....	59
Abbildung 10: Beispiel einer Bovines Serumalbumin (BSA)-Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Organlysaten in der Maus.	61
Abbildung 11: Sandwich-Verfahren zum Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran ...	63
Abbildung 12: A. Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner. B. Beispiele für eine fluoreszierende Membran (Western Blot) nach Aufnahme im Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner, der die Expression von B2-Rezeptorproteinen in Aortengewebe zeigt (Leiter (LD) links ist in kDa angezeigt).	65
Abbildung 13: Bildliche Darstellung des Realtime-RT-PCR-Prinzips mit dem TaqManAssay® (Applied Biosystem, Weiterstadt).	69
Abbildung 14: Eine Organbadapparatur mit vier Gefäßbädern und den dazu gehörigen Kraftaufnehmer	72
Abbildung 15: A. Das Detail eines Gefäßbades mit eingespannter Mauseaorta. B. Verstärker und Schreiber	73
Abbildung 16: A. Ein elektrisches Rasiergerät und die anästhesierte Maus. B. Maus nach einer groben Rückenrasur und aufgetragener Enthaarungscreme. C. Nach der Rasur, Enthaarung des Rückens und der intradermalen Injektion von 30 µl PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (2 nmol).	77
Abbildung 17: A. Abbildung der dorsalen Haut einer Maus nachdem sie ausgeschnitten und umgedreht wurde. B. Spezieller kreisförmiger Fräser mit einer Öffnung zum Ausstanzen der Injektionsstellen. C. Dorsalen Haut einer Maus nach dem Ausstanzen der Hautproben mit dem speziellen Fräser.	78

Abbildung 18: Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration von Evans Blue aus den ausgestanzten runden Hautstücken der dorsalen Haut der Maus	79
Abbildung 19: A. Die anästhesierte Maus wurde auf einer speziell hergestellten Einlege-Apparatur an der Schwanzvene fixiert.	80
Abbildung 20: TPLM: A. Mittels zweier Magneten wurde das Ohrläppchen mit einem Deckglas darüber fixiert und nach Injektion von FITC-Dextran ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, in $50 \mu\text{l}$ $0,9 \%$ NaCl) und Alexa 594 Dextran ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, in $50 \mu\text{l}$ $0,9 \%$ NaCl) B. wurde die zufällig ausgewählte Position im inneren Teil des Ohrläppchens mit einem C. Olympus FV1000MPE Two-Photon-Laser (Tokyo, Japan) gemessen.	81
Abbildung 21: Die Abbildung zeigt kleine dermale Blutgefäße des Ohrs einer anästhesierten C57BL/6-Maus.	82
Abbildung 22: Beispiel für Quaddeln nach intradermaler Injektion von $18,9 \text{ nmol}$ Bradykinin und $0,9 \%$ iger Kochsalzlösung (NaCl) in den oberen inneren Unterarm eines Probanden.	85
Abbildung 23: Representatives Beispiel für einen vollständigen Western Blot, der die Expression von B2-Rezeptorproteinen in Aortengewebe und im Lungengewebe der B2 ^{tg} und C57BL/6 zeigt (die linke Protein Leiter ist in kDa angezeigt).	88
Abbildung 24: Quantitative Auswertung der Realtime-RT-PCR-Messung in den Lungengeweben. Expression der murinen und humanen B2-Rezeptor mRNA, die aus den Lungengeweben der B2 ^{tg} und ihren transgen negativen Geschwistertieren B2 ⁿ isoliert wurde.	89
Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Organbadversuche. Vaskuläre Reaktivität auf steigende Bradykinin-Konzentrationen der Maus-Aortenringe, die leicht mit Phenylephrin ($0,2 \mu\text{M}$) vorverengt sind.	91
Abbildung 26: Quantitative Auswertung der Organbadversuche.	92
Abbildung 27: Effekte von L-NA und die Kombination von L-NA und Diclofenac auf den systolischen Blutdruck von transgen negativen B2 ⁿ und transgen positiven B2 ^{tg} Mäusen.	93
Abbildung 28: Effekte von L-NA und der Kombination von L-NA und Diclofenac auf die Herzfrequenz.	94
Abbildung 29: Miles Assay zur Bestimmung der induzierten vaskulären Permeabilität von PBS und unbehandelten Hautpartien.	95
Abbildung 30: Miles Assay zur Bestimmung der Zeit-Wirkungs-Beziehungen.	96

- Abbildung 31:** Miles Assay zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach intradermaler Bradykinin und Labradimil Injektion von jeweils 30 µl unterschiedlicher Konzentrationen (0,2–2 nmol) in die dorsale Haut der C57BL/6 im Vergleich zur PBS.98
- Abbildung 32:** Miles Assay: A. Das linke Bild stellt eine repräsentative Fotografie von 6 unabhängigen Experimenten dar. Vaskuläre Permeabilität in dorsalem Hautstück, induziert durch intradermalen Injektionen von jeweils 30 µl PBS, Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (jeweils 2 nmol) in der Mauslinie C57BL/6 (n = 6). B. Die rechte Grafik zeigt die Quantifizierung der entstandenen Extravasation bezogen auf die PBS Injektion (*P < 0.0001 One-way ANOVA, *P < 0.0001 gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test).99
- Abbildung 33:** A. Das linke Bild stellt ein repräsentatives dorsales Hautstück einer C57BL/6 dar. Das Foto zeigt die endotheliale Extravasation durch intradermale Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol, BK), Labradimil (2 nmol, LD) und Histamin (2 nmol, HIS) nach intraperitoneale Icatibant-Injektion (2 nmol) in C57BL/6 (Miles Assay). Nach Messung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue aus Stanzproben der dorsalen Haut wurde die rechte Grafik für 6 unabhängige Experimente erstellt. B. Die rechte Grafik stellt die Ergebnisse der Hemmung der intradermalen Bradykinin-induzierten Extravasation durch intraperitoneale Icatibant-Injektion in C57BL/6 dar (jeweils n = 6, P < 0.05 One-way ANOVA, *P < 0.05 versus Bradykinin allein, Tukey's Multiple Comparison Test).101
- Abbildung 34:** Miles Assay: A. Dorsales Hautstück nach intraperitoneale Icatibant-Injektion (2 nmol) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol, BK), Labradimil (2 nmol, LD) und Histamin (2 nmol, HIS). Nach Ausschnitt der blau gefärbten Injektionsstellen der vaskulären Permeabilität durch Bradykinin, Labradimil und Histamin in den C57BL/6 Versuchstieren, wurden diese spektrophotometrisch vermessen und in das rechte Diagramm eingetragen. B. Das Diagramm stellt die Hemmung von Labradimil-induzierter Extravasation nach i. p. Icatibant-Injektion dar (2 nmol, 20 nmol, jeweils n = 6, P < 0.05 One-way ANOVA, *P < 0.05 gegenüber Labradimil allein, Tukey's Multiple Comparison Test). Icatibant hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von Histamin. Auch hier war kein Unterschied in der Labradimil-induzierten Extravasation zwischen der Vorbehandlung mit 2 nmol und 20 nmol Icatibant messbar.102

- Abbildung 35:** Miles Assay: A. Dorsale Haut der C57BL/6 Versuchstiere nach dem Rasieren, Enthaaren und der intradermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung (jeweils 2 nmol, BK/ICA). B. Interessanterweise entwickelte sich nach dermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung ein durch Evans blue verursachter blauer Ring, der im inneren des Kreises keine erkennbare Bradykinin verursachte Evans blue Färbung aufwies. C. Dorsales Hautstück mit einer intradermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung (jeweils 2 nmol) nach einer 2 nmol intraperitonealen Icatibant Vorbehandlung der C57BL/6 Versuchstiere. Hier ist der blaue Ring kaum noch erkennbar. 103
- Abbildung 36:** Miles Assay: Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßdurchlässigkeit, durch die Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue, aus Stanzproben der dorsalen Haut. 104
- Abbildung 37:** Ergebnisse des Miles Assays zur Bewertung der durch Bradykinin-induzierten Plasmaextravasation bei Mäusen mit einer endothelspezifischen Überexpression von B2-Rezeptoren (B2^{tg}) im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren (B2ⁿ). 105
- Abbildung 38:** Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der transgen negativen (BKⁿ) und transgen positiven (BK^{tg}) Maus als Versuchsmodell. 106
- Abbildung 39:** Ergebnisse des Miles Assay zur Untersuchung der durch Bradykinin-induzierten vaskulären Permeabilität, im Vergleich zur Vehikel Kontrolle (PBS) zwischen B2ⁿ und B2^{tg} nach Behandlung mit dem COX-Hemmer Diclofenac. 107
- Abbildung 40:** Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion (2 h vor Versuchsbeginn). 108
- Abbildung 41:** Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion (2 h vor Versuchsbeginn). 109
- Abbildung 42:** Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion. 110
- Abbildung 43:** A. Ergebnisse des Miles Assays. Repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach i. v. Injektion des unspezifischen COX-Inhibitor Ibuprofen (12 mg kg⁻¹ KG) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (30 µl, 2 nmol), Labradimil (30 µl, 2 nmol) und Histamin (30 µl, 2 nmol) in C57BL/6 (n = 5). 111

- Abbildung 44:** A. Ergebnisse des Miles Assays. Repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach i. v. Injektion des unspezifischen COX-Inhibitor Diclofenac ($5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol), Labradimil (2 nmol) und Histamin (2 nmol) in C57BL/6 ($n = 6$). B. Die Vorbehandlung mit Vehikel (linker Balken, PBS behandelte Kontrolltiere) und dem unspezifischen COX-Inhibitor Diclofenac (rechter Balken) zeigte auch hier, dass eine unspezifische COX1/2-Inhibition die Bradykinin und Labradimil-induzierte Extravasation signifikant reduziert (jeweils $n = 6$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $***P < 0.0001$ versus unbehandelte Kontrolltiere, Tukey's Multiple Comparison Test). Auch hierbei war die Histamin induzierte Extravasation unbeeinflusst.112
- Abbildung 45:** A. Miles Assay: Dorsales Hautstückergebniss nach i. v. Injektion des spezifischen COX1-Inhibitor SC560 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils $30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) in C57BL/6 ($n = 6$).113
- Abbildung 46:** A. Representatives Bild eines Dorsalen Hautstück einer C57BL/6. Ergebnisse des Miles Assays nach intravenöser Injektion des spezifischen COX1-Inhibitor SC560 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils $30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) in der Mauslinie C57BL/6. B. Die Vorbehandlung mit Vehikel (linker Balken) und dem spezifischen COX1-Inhibitor SC560 (rechter Balken) zeigte erst bei einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ eine verminderte signifikante Bradykinin und Labradimil-induzierte Extravasation (jeweils $n = 5$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$ gegen Vehikelbehandlung (PBS), Tukey's Multiple Comparison Test). Auch hierbei war die Histamin induzierte Extravasation unbeeinflusst.114
- Abbildung 47:** Miles Assay in C57BL/6: A. Representatives Bild eines Dorsalen Hautstück nach Vorbehandlung mit Celecoxib (i. v., $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) und anschließender intradermalen Injektion von $30 \text{ } \mu\text{l}$ PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 2 nmol). B. Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Celecoxib führte zu einer signifikanten Reduzierung der Bradykinin als auch Labradimil-induzierten dermalen Extravasation ($n = 6$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $***P < 0.001$, $*P < 0.05$ gegenüber Vehikel, Tukey's Multiple Comparison Test). C. Dorsales Hautstück nach Rofecoxib Injektion und anschließender intradermalen Injektion von $30 \text{ } \mu\text{l}$ PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 2 nmol). D. Die Grafik stellt die Auswertung der Proben dar. Rofecoxib hatte einen schwächeren Effekt auf die Bradykinin jedoch keinen Einfluss auf

die Labradimil-induzierte dermale Extravasation (n = 6, P < 0.0001 One-way ANOVA, **P < 0.01 gegenüber Vehikel (PBS), Tukey's Multiple Comparison Test).	115
Abbildung 48: Auswertung der Two-Photon-Laser-Mikroskopie Bildgebung kleiner dermaler Blutgefäße des Ohrs von anästhesierten C57BL/6 Versuchstiere.	116
Abbildung 49: Two-Photon-Laser-Mikroskopie kleiner dermaler Blutgefäße. Aufnahme etwa 200 µm unter der Oberfläche des Ohres. C57BL/6 Versuchstiere wurden mit 1,5 mg 250 kDa Dextran vorbehandelt, das mit einem grün fluoreszierenden Chromophor markiert ist. Anschließend wurde 250 µg des 10 kDa Dextrans, der gewebedurchlässige rote fluoreszierende Farbstoff, der die Endothelbarriere im Laufe der Zeit leicht durchquert, in den gleichen Zugang der Schwanzvene appliziert. Quantifizierung der Akkumulation des 10 kDa Farbstoffes im Interstitialraum der C57BL/6 (n = 6). Allerdings ist die Genauigkeit dieser Messungen geringer, da das Interstitium nicht so klar definiert werden konnte wie die intravaskulären Gefäße.	117
Abbildung 50: Two-Photon-Laser-Mikroskopie: Aufzeichnungen spontaner Extravasation kleiner dermaler Blutgefäße im Ohr der anästhesierten Maus. Die Aufzeichnungen zeigen, dass das 10 kDa Dextran, aber nicht das 250 kDa Dextran das Gefäßlumen spontan über einen Zeitraum von 60 min verlässt.	118
Abbildung 51: ABRASE: Ein representatives Bild einer Quaddel nach intradermaler Injektion von 18,9 nmol Bradykinin und 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) im Unterarm eines gesunden Probanden beiderlei Geschlechts.	119
Abbildung 52: ABRASE Primärer Endpunkt: Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel, war nach Einnahme von 600 mg Ibuprofen signifikant niedriger.	120
Abbildung 53: ABRASE Primärer Endpunkt: Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel, war nach Einnahme von 200 mg Celecoxib signifikant niedriger. (n = 27, ***P < 0.0001, berechnet unter Verwendung des Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Tests).	121
Abbildung 54: ABRASE: Darstellung der Variation der maximalen Quaddelgröße unter den Probanden vor und nach Einnahme von 600 mg Ibuprofen oder 200 mg Celecoxib.	122
Abbildung 55: ABRASE: Die Diagramme geben die Beziehung zwischen der Variation der maximalen Quaddelgröße und der Zeit bis zur vollständigen Auflösung der maximalen Quaddelquaddel bei den Probanden vor und nach der Einnahme von 600 mg Ibuprofen oder von 200 mg Celecoxib wieder.	123

Abbildung 56: Grafische Darstellung des möglichen Mechanismus der Prostaglandinbildung für die dermale Extravasation, die durch die Aktivierung von Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (B2) ausgelöst wird.	130
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen des nicht-allergischen Angioödems	2
Tabelle 2: Überblick über die Wirkstoffe für die Behandlung des hereditären Angioödems. .	26
Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper zur Protein-Detektion im Westernblot aus den Organlysaten (Lunge und Aorta) : Antikörper, Quelle, Verdünnung und Hersteller.	64
Tabelle 4: Details für die Detektion der B2-Rezeptor mRNA-Expression verschiedener Gene mittels der Realtime-RT-PCR-Methode.....	70
Tabelle 5: Arzneistoffe die entweder als intraperitoneale Vorbehandlung oder intravenös direkt mit Evans Blue verschiedenen Mäusen injiziert worden sind	76
Tabelle 6: Ablauf der Versuche.....	77
Tabelle 7: Morphologische Daten von B2 ^{tg} im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren B2 ⁿ	90

1 Einleitung

1.1 Das nicht-allergische Angioödem

1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie

Die meisten Angioödeme mit Urtikaria (allergische Angioödeme) werden durch eine allergische oder paraallergische Reaktion verursacht (Kanani et al., 2011). Histamin ist der Hauptvermittler der Reaktion und der pathologische Zustand verschwindet meist nach einer Behandlung mit Histamin-H1-Antagonisten (Antihistaminika). Ein Prozentsatz der Patienten¹ mit Angioödem ohne Urtikaria (nicht-allergisches Angioödem) spricht jedoch nicht auf die Behandlung mit Antihistaminika an und diese Patienten stellen für die Klinik eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung dar (Kaplan, 2005).

Das typische kutane Angioödem bei einem nicht-allergischen Angioödem unterscheidet sich von der Urtikaria dadurch, dass es in der Regel länger andauert (2 bis 4 Tage statt nur wenige Stunden) und nicht juckt, nicht schmerzt und nicht erythematös ist (Friedmann, 1999). Nicht-histaminerge Angioödeme können im Gesicht, an den Genitalien, den Extremitäten und am Rumpf lokalisiert sein und ohne Folgen abklingen. Wenn die Schleimhäute betroffen sind, werden die oberen Atemwege und der Magen-Darm-Trakt stark beeinträchtigt, was zu einer lebensbedrohlichen Asphyxie und heftigen Bauchschmerzen, Erbrechen und/oder Diarrhö führen kann (Kostis et al., 2018).

Diese pathologische Entität tritt am häufigsten bei Patienten mit einem erblichen Mangel oder einer Funktionsstörung des Inhibitors der ersten Komponente der Komplementkaskade (C1-INH) oder mit einer erworbenen Beeinträchtigung dieses Proteins auf, und wird in der Regel durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen C1-INH verursacht (Agostoni & Cicardi, 1992; Davis, 1988). Ein dritter klinischer Zustand mit rezidivierenden familiären und östrogeninduzierten Angioödem wurde bei Frauen beschrieben und als östrogenabhängig angesehen (Binkley, 2000; Bork et al., 2000; Warin et al., 1986). Bei einem vierten klinischen Zustand, dem idiopathischen

¹ Gender-Hinweis: In der vorliegenden Arbeit wird darauf verzichtet, bei Personenbezeichnungen sowohl die männliche als auch die weibliche Form zu nennen. Die männliche Form gilt in allen Fällen, in denen dies nicht explizit ausgeschlossen wird, für beide Geschlechter.

nicht-histaminergen Angioödem, sind die Symptome den bereits beschriebenen ähnlich, doch wurde bisher kein biochemischer Defekt entdeckt (Cicardi et al., 1999). Schließlich können ähnliche klinische Merkmale die Folge einer unerwünschten Arzneimittelwirkung sein. Ein arzneimittelinduziertes nicht-allergisches Angioödem (ohne Urtikaria) kann durch eine durch Immunglobulin E vermittelte allergische Reaktion verursacht werden, aber für die Mehrzahl der Reaktionen bleibt die Pathogenese unklar. Da kein immunologischer Mechanismus identifiziert wurde, sind Hauttests und Antikörperbestimmungen in der Regel unzuverlässig für die Diagnose (Bircher, 1999). **Tabelle 1** gibt eine Übersicht über die Formen von nicht-allergischen Angioödem dar.

Subtyp	Beschreibung
Hereditäres Angioödem (HAE)	- Erhöhte Generation von Bradykinin aufgrund von Mutationen des C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)-Gens SERPING1, die zu einem Verlust von C1-INH führen (HAE Typ 1, 85 % der Fälle), oder Dysfunktion von C1-INH (HAE Typ 2) - Erhöhte Generation von Bradykinin trotz normalem C1-INH verursacht durch Missense-Mutationen im Faktor 12-Gen [13], Plasminogen-Gen (K. Bork et al., 2018), Angiopoietin-1-Gen (Bafunno et al., 2018), Kininogen 1-Gen (K. Bork et al., 2019), Myoferlin-Gen (Ariano et al., 2020), HS3ST6-Gen (K. Bork et al., 2021) oder unbekannter Ursache (Zuraw, 2018)
Erworbenes Angioödem	- Verringerte Abbau von Bradykinin, verursacht durch Medikamente wie ACE-Hemmer, Sartane, Plasminogenaktivatoren oder den Neprilysin-Inhibitor Sacubitril - Erhöhte Generation von Bradykinin, verursacht durch einen Verlust von C1-INH aufgrund von Autoantikörpern und/oder zugrundeliegenden (malignen) Bedingungen
Angioödem unbekannter Ursache	Nicht auf Antihistaminika ansprechendes Angioödem unbekannter Ursache

Tabelle 1: Subtypen des nicht-allergischen Angioödems
aufgeführt nach (Cicardi et al., 2014) und (Hahn et al., 2023).

Folgende Definition wurde für eine unerwünschten Arzneimittelwirkung vorgeschlagen:

Eine spürbare schädliche oder unangenehme Reaktion, die sich aus einer Intervention im Zusammenhang mit der Verwendung eines Arzneimittels ergibt, die eine Gefahr bei künftiger Verabreichung voraussagt und eine Vorbeugung oder spezifische Behandlung oder eine Änderung des Dosierungsschemas oder die Rücknahme des Arzneimittels rechtfertigt.“ (Edwards & Aronson, 2000)

Diese Definition verbesserte jene der Weltgesundheitsorganisation („International drug monitoring: the role of national centres: report of a WHO meeting“, 1972), die seit etwa 30 Jahren verwendet wird, in einigen Fällen nicht präzise genug ist und zweideutig sein kann. Das Angioödem ohne Urtikaria fällt unter eine solche Definition. Ein Angioödem ist eine Schwellung der Schleimhaut und des submukösen Gewebes. Typischerweise äußert es sich als Schwellung von Gesicht, Lippen und Zunge. Angioödeme

können schwerwiegend und lebensbedrohlich sein, wenn sie die Atemwege betreffen (Kaplan, 2005). Medikamente sind nach Nahrungsmitteln die zweithäufigste Ursache für Angioödeme, die in der Notaufnahme behandelt werden müssen (Kulthanan et al., 2007). Medikamente können zwei verschiedene Arten von Angioödem auslösen: allergische und nicht-allergische Angioödeme (Nussberger et al., 1998). Studien haben gezeigt, dass viele Ärzte in der Notaufnahme die spezifische Art des Angioödems bei einem Patienten nicht erkennen und die Angioödem-Episode häufig nicht spezifisch behandeln können, da jede Art von Angioödem eine andere Behandlung erfordert (Lombardi et al., 2005). Tatsächlich unterscheiden sich medikamenteninduzierte allergische Angioödeme und medikamenteninduzierte nicht-allergische Angioödeme durch ihren Mediator, ihre klinische Präsentation und ihre Behandlung.

Das arzneimittelinduzierte allergische Angioödem ist eine Überempfindlichkeit vom Typ I und wird durch Histamin vermittelt (Raj & Sidhu, 2006). Bei einer Überempfindlichkeit vom Typ I verbinden sich die Medikamente mit den an der Oberfläche der Mastzellen gebundenen Immunglobulin E (IgE)-Antikörpern, was zur Freisetzung von Histamin führt (Schnyder & Brockow, 2015). Klinisch äußert sich ein medikamenteninduziertes allergisches Angioödem durch eine rasch einsetzende Schwellung der Schleimhäute und des submukösen Gewebes. Außerdem zeigt der Patient einen typischen urtikariellen Hautausschlag. Die Symptome sprechen schnell auf eine Behandlung mit Antihistaminika, Epinephrin und Kortikosteroiden an (Kaplan, 2005).

Das medikamenteninduzierte nicht-allergische Angioödem wird durch Bradykinin vermittelt (Bonner et al., 2017). Beim medikamenteninduzierten nicht-allergischen Angioödem fehlt der urtikarielle Hautausschlag. Darüber hinaus ist der Beginn im Vergleich zum histaminvermittelten Angioödem progressiver. Die Symptome können innerhalb von drei bis fünf Tagen abklingen (Bonner et al., 2017). Beim medikamenteninduzierten nicht-allergischen Angioödem sind die Symptome resistent gegen eine Behandlung mit Antihistaminika und Kortikosteroiden und klingen erst nach Absetzen der Medikamente ab (Grigoriadou et al., 2009).

1.1.1.1 Simvastatin und Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren

Der folgende Fall entstammt der Studie von Nisly et al. (2013). Eine 75-jährige afroamerikanische Patientin mit Typ-2-Diabetes und Dyslipidämie wurde mit wiederkehrenden nächtlichen Episoden von Gesichts-, Lippen- und Zungenschwellungen ins Krankenhaus eingeliefert. Die Patientin verneinte jeglichen Ausschlag während dieser Episoden und gab an, dass die Selbstmedikation mit Diphenhydramin ihre Symptome nicht lindert habe. Die Patientin war hämodynamisch stabil. Der normale C4-Spiegel der Patientin, die C1-Esterase-Inhibitoren und der C1q-Bindungstest schlossen die Diagnose eines hereditären Angioödems aus. Ihre Medikation wurde überprüft, die Simvastatin-Dosis wurde neun Monate vor der Aufnahme jede Nacht von 10 auf 20 mg erhöht. Während dieser Zeit wurde die Patientin fast jede Nacht von Angioödem geweckt. Simvastatin wurde als möglicher Auslöser dieser Angioödem-Episoden angesehen und abgesetzt. Die Sauerstoffsättigung wurde kontinuierlich überwacht. Die Gesichts-, Lippen- und Zungenschwellungen des Patienten bildeten sich innerhalb der nächsten 36 Stunden ohne weitere Kortikosteroidbehandlung zurück. In den folgenden sechs Monaten meldete der Patient nur eine Episode eines Angioödems am Tag, aber keine neue Episode eines nächtlichen Angioödems (Nisly et al., 2013). In diesem Fallbericht ist Bradykinin höchstwahrscheinlich der Vermittler der Angioödem-Episode, denn es gab keinen urtikariellen Ausschlag, eine relativ lange Verzögerung des Angioödem-Auftretens nach der Simvastatin-Verabreichung, eine fehlende Verbesserung der Schwellung nach Diphenhydramin-Gabe und das Verschwinden des Angioödems nach Absetzen von Simvastatin.

Mindestens zwei Mechanismen wurden bei dem durch Statine ausgelösten nicht-allergischen Angioödem identifiziert. Erstens erhöhen Statine die Expression von Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (BKR-2) auf Endothelzellen. In einer Studie, in der menschliche Koronarendothelzellen kultiviert wurden, führte Lovastatin zu einer Hochregulierung der Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (Liesmaa et al., 2007). Zweitens können Statine auch die Wirkung von Bradykinin auf seine Rezeptoren verstärken. Beide Mechanismen können dazu führen, dass ein Patient durch die erhöhte Freisetzung von Prostaglandin und Stickstoffmonoxid bei zirkulierenden Bradykininspiegeln ein Angioödem entwickeln kann (Liesmaa et al., 2007; Shariat-Madar et al., 2006). **Abbildung 1** stellt die Synthese- und Degradierungswege sowie der Wirkungsvermittlung von Bradykinin beim Menschen dar.

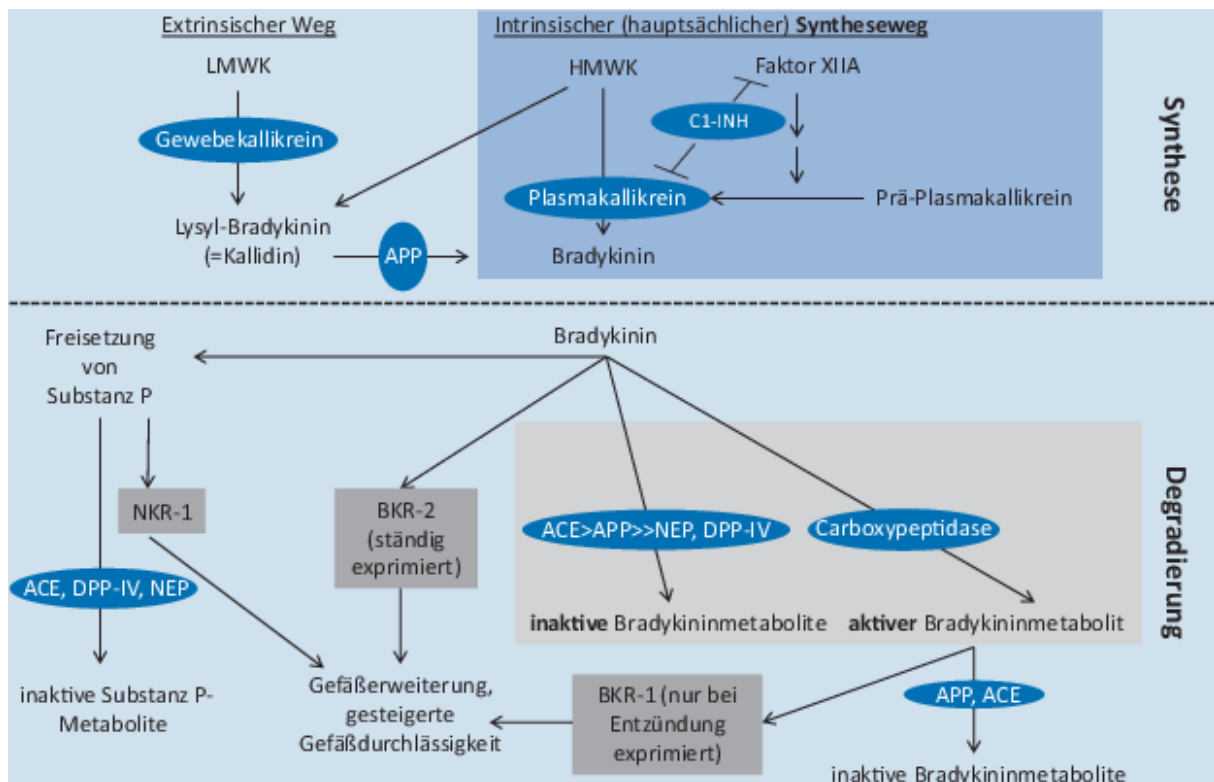


Abbildung 1: Darstellung der Synthese- und Degradierungswege sowie der Wirkungsvermittlung von Bradykinin

Abbildung aus (Sachs et al., 2018).

ACE: Angiotensin-converting Enzyme; APP: Aminopeptidase P, LMWK: Low Molecular Weight Kininogen, HMWK: High Molecular Weight Kininogen, BKR- $\frac{1}{2}$: Bradykininrezeptor $\frac{1}{2}$; NKR-1: Neurokininrezeptor 1; NEP: neutrale Endopeptidase, DPP-IV: Dipeptidylpeptidase IV; C1-INH: C1-Esteraseinhibitor

1.1.1.2 Sitagliptin, Angiotensin konvertierendes Enzym und Dipeptidylpeptidase IV

In einem Fallbericht wurde festgestellt, dass Sitagliptin mit einem medikamenteninduzierten nicht-allergischen Angioödem assoziiert ist (Skalli et al., 2010). In diesem Fallbericht wurde eine 79-jährige Frau mit Typ-2-Diabetes, die zuvor Detemir-Insulin, Atorvastatin 20 mg und Irbesartan 150 mg eingenommen hatte, aufgrund ihres hohen glykierten Hämoglobins (HbA1c) von 8,1 % auf Sitagliptin umgestellt. 14 Tage nach Beginn der Behandlung mit Sitagliptin entwickelte die Patientin ein Angioödem mit Schwellung der Lippen, der Zunge und des Mundes. Sitagliptin wurde abgesetzt und innerhalb weniger Tage wurde eine Remission ohne unterstützende Medikamente beobachtet. Zehn Tage später wurde die Behandlung mit Sitagliptin wiederaufgenommen. Zwei Tage danach entwickelte der Patient erneut ein Angioödem. Sitagliptin wurde dauerhaft abgesetzt. Dieser Fall zeigt eindrücklich, wie durch das Absetzen des Medikaments eine klinische Bestätigung eines nicht-allergischen Angioödems erzielt

werden kann: Der urtikarielle Hautausschlag ist nicht vorhanden, die Symptome werden nur durch die Verabreichung von Sitagliptin ausgelöst und treten verzögert auf. Das Absetzen des Arzneimittels führte zum Verschwinden aller Symptome (Skalli et al., 2010).

Sitagliptin ist ein Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV)-Inhibitor. DPP-IV inaktiviert inkretines glukoseabhängiges insulinotropes Polypeptid und glucagonähnliches Peptid (Sjöstrand et al., 2017). Infolgedessen verbessert DPP-IV die Blutzuckerkontrolle bei Diabetes mellitus Typ 2 (Shi et al., 2016). Neben den Inkretinen inaktiviert DPP-IV auch Substanz P, ein vasoaktives Peptid, das durch seine Wirkung auf den Neurokininrezeptor 1 (NK1) die Gefäßpermeabilität erhöht (Campos & Calixto, 2000). Substanz P ist an dem mit ACE-Hemmern (ACEI) assoziierten Angioödem beteiligt. Studien haben gezeigt, dass der Substanz-P-Spiegel bei ACEI-assoziierten Angioödemem erhöht ist (Byrd et al., 2010). Außerdem verursachte die Infusion von Bradykinin oder Substanz P ein Trachealödem (Sulpizio et al., 2004). Sowohl Bradykinin als auch Substanz P werden durch ACE abgebaut. Bei ACE-Hemmung führt die Akkumulation von Substanz P nicht zu einem Angioödem, da sie durch DPP-IV inaktiviert wird. Daher kann die Gabe eines DPP-IV-Hemmers wie Sitagliptin bei einigen Patienten ein Angioödem verursachen (Brown et al., 2009; Byrd et al., 2008). Vildagliptin, ein weiterer DPP-IV-Hemmer, wurde nicht mit Angioödemem in Verbindung gebracht, wenn er allein eingenommen wurde. Es hat sich jedoch gezeigt, dass er bei Patienten, die gleichzeitig ACEI einnehmen, Angioödemem verursacht (Saisho et al., 2013). Dieser Befund bestätigt den Beitrag der Substanz P zur Pathogenese des Angioödemem.

Angioödemem sind eine gut dokumentierte unerwünschte Wirkung bei Patienten, die ACE-Hemmer einnehmen. Eine vollständige Übersicht über gemeldete Fälle von Angioödemem im Zusammenhang mit der Behandlung mit ACE-Hemmern, die von Januar 1966 bis Juni 1997 veröffentlicht wurden, wurde 1998 von Vleeming et al. vorgelegt (Vleeming et al., 1998). Diese unerwünschte Wirkung tritt bei 0,1 bis 0,5 % der Patienten auf, die diese Medikamente einnehmen (Grossman et al., 2000), sie ist jedoch die häufigste Ursache für wiederkehrende arzneimittelinduzierte Angioödemem. Derzeit werden weltweit 35 bis 40 Millionen Patienten mit ACE-Hemmern behandelt, somit könnte diese Medikamentenklasse für mehrere hundert Todesfälle pro Jahr aufgrund von Larynxödemem verantwortlich sein (Messerli & Nussberger, 2000).

Die kutanen, abdominalen und laryngealen Manifestationen des Angioödems im Zusammenhang mit der Einnahme von ACE-Hemmern ähneln jenen, die bei Patienten mit C1-INH-Mangel beobachtet werden, unterscheiden sich jedoch insofern, als das Angioödem häufiger im Kopf- und Halsbereich auftritt und der Darm nur selten, wenn auch möglicherweise, betroffen ist. Berichte, die auf einen partiellen C1-INH-Defekt in diesem Zusammenhang hindeuten, konnten nicht bestätigt werden (Agostoni et al., 1999). Der pathogenetische Mechanismus scheint mit dem verminderten Abbau von Bradykinin (BK), einem starken gefäßerweiternden Peptid, zusammenzuhängen. ACE, auch bekannt als Kininase II, wirkt nicht nur auf Angiotensin I, sondern ist auch ein wichtiger Inaktivator von BK. Die pharmakologische Hemmung von ACE führt zu erhöhten BK-Plasmaspiegeln (Pellacani et al., 1994). Während einer akuten Angioödem-Episode wurden hohe BK-Spiegel im Plasma nachgewiesen (Nussberger et al., 1998). Der BK-Abbau ist bei allen mit ACE-Hemmern behandelten Patienten blockiert, aber Angioödeme treten unregelmäßig und nur bei einem kleinen Prozentsatz dieser Patienten auf. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch andere Faktoren als ein gestörter BK-Abbau an der Entstehung eines Angioödems beteiligt sind.

Studien, die darauf abzielten, Faktoren zu identifizieren, die Patienten für ein ACE-Hemmer-induziertes Angioödem prädisponieren, konzentrierten sich auf die Entdeckung von Anomalien bei Enzymen, die am BK-Abbau beteiligt sind, insbesondere Carboxypeptidase N (CPN), die auch als Kininase I bekannt ist. In einer großen Kohorte von Patienten (Sigler et al., 1997) mit ACE-Hemmer-bedingten Angioödem waren die mittleren Plasmaspiegel von CPN im Vergleich zu Patienten, die diese unerwünschte Wirkung nicht entwickelten, leicht erniedrigt (Sigler et al., 1997). Die große Überlappung der CPN-Spiegel zwischen den beiden Gruppen schränkt jedoch den Wert der CPN-Messung zur Vorhersage des Risikos eines ACE-Hemmer-bedingten Angioödems ein (Sigler et al., 1997). Darüber wurde gezeigt, dass während eines mit ACE-Hemmern assoziierten Angioödems die BK-Plasmaspiegel ansteigen (Agostoni et al., 1999). Im Gegensatz zum hereditären Angioödem war jedoch kein gespaltenes hochmolekulares Kininogen (HK), die Vorstufe von BK, im Plasma nachweisbar. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass der pathogenetische Mechanismus des ACE-Hemmer-bedingten Angioödems im katabolen Bereich des BK-Stoffwechsels liegt (Agostoni et al., 1999). Marcic und Erdös haben die Existenz einer Zwischenkomponente vorgeschlagen, die an der Wirkung von ACE-Hemmern beteiligt ist und die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren durch BK verstärkt (Marcic & Erdös, 2000). Nach Blais

et al. weist die Hälfte der Patienten mit ACE-Hemmer-bedingtem Angioödem einen Defekt eines Serumenzyms auf, das am Des-Arg-BK-Stoffwechsel beteiligt ist und zu dessen Akkumulation führt (Blais et al., 1999).

Ein vierfach erhöhtes Risiko für ein ACE-Hemmer-induziertes Angioödem wurde bei afroamerikanischen Patienten (Brown et al., 1996) festgestellt, was auf Unterschiede im Kallikrein-Kinin-System mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber BK zurückzuführen ist. Obwohl die Dosisabhängigkeit von Angioödemem im Zusammenhang mit ACE-Hemmern nicht erwiesen ist, werden niedrige Dosen von ACE-Hemmern bei nigerianischen Patienten mit einer Häufigkeit und einem Schweregrad von Angioödemem in Verbindung gebracht, die geringer sind als aufgrund der gemeldeten erhöhten ethnischen Anfälligkeit dieser Patienten zu erwarten wäre (Ajayi et al., 2000). Andererseits haben Geschlecht und Alter keinen Einfluss auf die Häufigkeit oder den Schweregrad von ACE-Hemmer-assoziierten Angioödemem.

Eine schwierige Aufgabe bei der Bewertung der Prävalenz von ACE-Hemmer-induzierten Angioödemem ergibt sich aus der Tatsache, dass Angioödemem auch Jahre nach der ersten Einnahme eines ACE-Hemmers auftreten können. Die lange Zeitspanne zwischen dem Absetzen des ACE-Hemmers und dem Auftreten des Angioödemem kann zwischen 1 Tag und 10 Jahren betragen (Agostoni et al., 1999). Es ist bemerkenswert, dass viele Ärzte den Zusammenhang zwischen der Behandlung mit ACE-Hemmern und Angioödemem nicht erkennen, obwohl diese unerwünschte Wirkung wohlbekannt ist und immer unter den unerwünschten Wirkungen des Medikaments aufgeführt wird. Eigentlich erwarten Ärzte, dass Angioödemem, die im Allgemeinen allergischer Natur sind, in engem zeitlichem Zusammenhang mit der Einnahme des verursachenden Arzneimittels auftreten. Angioödemem, die mit ACE-Hemmern in Verbindung gebracht werden, können nicht nur Jahre nach Beginn der Behandlung auftreten, sondern auch während der Behandlung in unregelmäßigen Abständen wiederkehren.

ACE-Hemmer vermitteln das Angioödem nicht durch eine allergische Reaktion. Sie scheinen vielmehr das Angioödem bei prädisponierten Personen zu fördern. Aus diesem Grund wird der Zusammenhang mit diesem Medikament oft übersehen und folglich unterschätzt. In einer Übersichtsarbeit über die Bewertung medikamenteninduzierter unerwünschter Reaktionen wird betont: „Es ist unwahrscheinlich, dass ein Medikament, das seit mehreren Jahren eingenommen wird, die Ursache der Reaktion

ist“ (Gruchalla, 2000). Dies gilt nicht für das ACE-Hemmer-bedingte Angioödem, dessen korrekte Diagnose eindeutig ein Problem darstellt. Gabb et al. stellten beispielsweise fest, dass in mehr als 50 % der Fälle von ACE-Hemmer-assoziierten Angioödemmen die ACE-Hemmer-Therapie fortgesetzt wurde (Gabb et al., 1996).

1.1.1.3 Angiotensin II-Typ1-Rezeptor-Antagonisten

Während ACE-Hemmer den Blutdruck durch die Verringerung der zirkulierenden Angiotensin-II-Spiegel senken, blockieren Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten die Wirkung von Angiotensin II auf der Rezeptorebene und dürften die BK-Plasmaspiegel nicht erhöhen. Dennoch wurde auch bei Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten über seltene Fälle von Angioödemmen berichtet. Es gibt zahlreiche Berichte über Angioödeme während der Behandlung mit einem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten (Cha & Pearson, 1999; Frye & Pettigrew, 1998; Rivera, 1999; Rupprecht et al., 1999). Bei einigen dieser Patienten gab es eine Vorgeschichte von ACE-Hemmern, die ein Angioödem auslösten; sie hatten eine solche Behandlung seit mehr als einem Jahr erhalten. Bei einem Großteil der Studien handelte es sich um Fallberichte einzelner Patienten (Cha & Pearson, 1999; Rivera, 1999; Rupprecht et al., 1999). Bei 13 Patienten handelte es sich um Berichte über Angioödeme im Zusammenhang mit der Einnahme von Losartan, diese waren zwischen 1995 und Mai 1997 bei der niederländischen Stiftung für Pharmakovigilanz und der Abteilung für Arzneimittelsicherheit der niederländischen Aufsichtsbehörde für das Gesundheitswesen eingegangen (van Rijnsoever et al., 1998). Bei einem Patienten traten während der Einnahme von Losartan vier Monate lang immer wieder Angioödeme auf, die nach dem Absetzen des Arzneimittels verschwanden. Bei den übrigen Patienten wurde der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist unmittelbar nach Auftreten des Angioödems abgesetzt. Ein derartig rasches Absetzen des Arzneimittels macht es schwierig, eine allergische/parallergische Reaktion auszuschließen, da eine solche Reaktion bei fast jedem Medikament möglich ist. Die vorliegenden Informationen deuten darauf hin, dass Angioödeme bei Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten seltener auftreten als bei ACE-Hemmern (Fuchs et al., 2001; Grossman et al., 2000; Schuster et al., 1999). Derzeit ist jedoch unklar, ob diese unerwünschte Wirkung bei den beiden Medikamentenklassen denselben Mechanismus aufweist. Noch wichtiger ist, dass keine überzeugenden Daten vorliegen, die den Schluss zulassen, dass bei Patienten mit einem durch ACE-Hemmer

ausgelösten Angioödem in der Vorgeschichte diese Wirkung auch bei Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten auftreten wird. Theoretisch haben Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten ein anderes Nebenwirkungsprofil als ACE-Hemmer, was durch das seltenere Auftreten von Husten als unerwünschte Nebenwirkung gut dokumentiert ist. Da Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht in das Kallikrein-Kinin-System eingreifen, bleibt der pathogenetische Mechanismus des Angioödems, der auf Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten zurückzuführen ist, ungeklärt. Wenn die zunehmende klinische Erfahrung mit Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten zu dem Schluss führt, dass Angioödeme bei ihrer Anwendung die gleichen Komplikationen verursachen wie bei ACE-Hemmern, müsste entweder die Wirkung von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten auf den BK-Stoffwechsel (Liu et al., 1997; Sato et al., 2000) überdacht, oder die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein verminderter BK-Katabolismus nicht der Hauptmechanismus ist, der zu ACE-Hemmerbedingten Angioödemem führt.

1.1.1.4 Risperidon und C1-Hemmer

Bislang wurden nur wenige Fälle von Risperidon in Verbindung mit Angioödemem berichtet (Güneş et al., 2013; Mishra et al., 2007; Talaei et al., 2016; Umar & Abdullahi, 2016). In einem Fallbericht wurde eine Angioödem-Episode beschrieben, die bei einer 30-jährigen Frau auftrat, die wegen einer schizoaffektiven Störung behandelt wurde. Die Patientin entwickelte zwei Wochen nach Beginn der Behandlung mit Risperidon in einer Dosis von 6 mg ein Ödem im Gesicht und im periorbitalen Bereich ohne Urtikaria. Als die Dosis halbiert wurde, klangen die Symptome ab, aber der mentale Status verschlechterte sich. Risperidon wurde dann auf 6 mg/Tag erhöht, was jedoch zu einem erneuten Auftreten des Gesichts- und Periorbitalödems führte. Risperidon wurde abgesetzt und das Gesichts- und Periorbitalödem bildete sich innerhalb von zwei Wochen vollständig zurück. Die Ergebnisse der immunologischen Labortests zeigten einen normalen C3-Spiegel und niedrige C4- und C1-Esterase-Inhibitor-Werte (Mishra et al., 2007). Ein ähnlicher Fall eines Angioödems wurde bei einer 38-jährigen Patientin mit amphetamininduzierter psychischer Störung berichtet, die wegen Aggressivität, Reizbarkeit und suizidaler Gedanken aufgenommen wurde (Mishra et al., 2007). Risperidon wurde mit 2 mg begonnen und dann auf 6 mg/Tag erhöht. Neun Tage nach

der Behandlung entwickelte die Patientin Schwellungen im Gesicht und im Periorbitalbereich. Im Labor wurden normale Werte von C3-, C4- und C1-Esterase-Inhibitor festgestellt. Risperidon wurde abgesetzt, Hydrocortison und Hydroxyzin wurden in niedriger Dosierung verordnet. Die Schwellung bildete sich innerhalb von vier Tagen vollständig zurück. Das klinische Muster der Angioödem-Episoden spricht in diesen Fällen für eine nicht-allergische Form des Angioödems, da keine Urtikaria auftrat. Darüber hinaus ist das verzögerte Auftreten der Symptome nach der Verabreichung der Medikamente und die allmähliche Rückbildung weniger wahrscheinlich als Ausdruck einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I zu werten.

Die Chronologie der Symptome in beiden Fällen ist eher mit einem Bradykinin-vermittelten Angioödem vereinbar. Schließlich spricht auch das vollständige Verschwinden der Symptome nach Absetzen von Risperidon für ein Bradykinin-vermitteltes Angioödem. Risperidon verursacht nicht-allergische Angioödeme durch zwei Mechanismen. Der erste Mechanismus ist die Unterdrückung von C1-INH (Mishra et al., 2007). Dies wird durch den niedrigen C1-INH-Spiegel, den normalen C3-Spiegel und den niedrigen C4-Spiegel in diesen beiden Fallberichten bestätigt. Normalerweise hemmt C1-INH das Komplementsystem und das Kallikrein-Kinin-System (KKS). Die C1-INH-Suppression erhöht die spontane Aktivierung des klassischen Komplementweges und die Produktion von Anaphylatoxinen (C3a, C4a, C5a) (Schoenfeld et al., 2016). Anaphylatoxine führen zu Gefäßpermeabilität und Gefäßerweiterung (Nesargikar et al., 2012). Durch die C1-INH-Hemmung wird auch das KKS nicht gehemmt und die Synthese von Bradykinin erhöht. Beide Wirkungen führen zu einem Angioödem. Der zweite Mechanismus ist die Aggregation von Bradykinin. In diesem Fall hat der Patient einen normalen C1-INH-, C3- und C4-Spiegel (Güneş et al., 2013). Bradykinin löst die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin durch Endothelzellen aus. Stickstoffmonoxid und Prostazyklin erhöhen die Gefäßpermeabilität und führen so zur Entwicklung eines Angioödems (Shariat-Madar et al., 2006).

1.1.1.5 Fibrinolytika

Es gibt einige Fälle von schweren Angioödemem nach der Behandlung mit fibrinolytischen Medikamenten (Streptokinase und rekombinanter Gewebefibrinogenaktivator).

tor, Alteplase) bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, akutem ischämischem Schlaganfall und tiefer Venenthrombose (Cooper et al., 1994; Hill et al., 2000; Pancioli et al., 1997; Rudolf et al., 2000; Walls & Pollack, 2000). Die pharmakologischen Wirkungen fibrinolytischer Mittel erfordern eine massive Bildung von Plasmin, um Fibrin aufzulösen. Plasmin erleichtert jedoch die Bildung von BK aus hochmolekularem Kininogen (HK) durch zwei Mechanismen: Es kann das sogenannte Kontaktsystem aktivieren, indem es den Faktor XII in seine aktive Form umwandelt und es kann die Anfälligkeit von HK für die Spaltung durch Kallikrein erhöhen (Agostoni et al. 1994; Caliezi et al., 2000). Es ist möglich, dass prädisponierte Patienten über diesen Weg ein Angioödem entwickeln. Die Inzidenz von Angioödem scheint bei der thrombolytischen Therapie des ischämischen Schlaganfalls höher zu sein als beim Myokardinfarkt. Nach Rudolf et al. deutet dies darauf hin, dass eine Störung der autonomen Bahnen zur Entwicklung eines Angioödems bei zerebraler Ischämie beitragen kann, aber die geringe Anzahl von Berichten rechtfertigt keine Einschränkung des Einsatzes von Thrombolytika bei der Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls (Rudolf et al., 2000).

1.1.1.6 Östrogen

In drei Veröffentlichungen wurde eine familiäre Form des Angioödems beschrieben, die nur bei Frauen auftritt (Binkley & Davis, 2000; Bork et al., 2000; Warin et al., 1986). Bei einigen dieser Patientinnen standen die Angioödeme in engem Zusammenhang mit Östrogenen, die entweder exogen, d. h. in Form eines Kontrazeptivums oder einer Substitutionstherapie verabreicht wurden, oder endogen, d. h. während der Schwangerschaft anstiegen. Die Erkrankung wird vererbt und ihre Beschränkung auf Frauen lässt auf einen X-chromosomal dominanten Vererbungsgang schließen. C1-INH wurde bei diesen Personen eingehend untersucht, ohne dass eine Anomalie nachgewiesen werden konnte. Daher ist der biochemische Defekt derzeit noch unbekannt. Neben dem familiären Angioödem bei Frauen können auch Sexualhormone als Auslöser für Angioödem-Episoden fungieren. Dies ist beim C1-INH-Mangel bekannt, bei dem Frauen, die mit oralen Kontrazeptiva behandelt werden, eine Zunahme der Häufigkeit und des Schweregrads der Anfälle erleben (Agostoni et al., 1992). Die negative Wirkung von Östrogenen bei dieser Erkrankung wird auch durch die jüngste Beobachtung einer Frau mit asymptomatischem erblichen C1-INH-Mangel unterstrichen, die im Alter

von 50 Jahren ihre erste Angioödem-Episode entwickelte, als sie mit einer Östrogenersatztherapie begann (McGlinchey et al., 2000). Darüber hinaus wurden fünf Frauen beschrieben, die ein Antiandrogen erhielten und bei denen wiederkehrende Angioödeme auftraten, was möglicherweise auf eine Wirkung dieser Medikamente auf C1-INH zurückzuführen ist (Pichler et al., 1989; Ponard et al., 1997).

Der Zusammenhang zwischen Sexualhormonen und Angioödemem wird auch durch die Tatsache unterstrichen, dass eine Androgenbehandlung bei Patienten mit hereditärem Angioödem (HAE) wirksam Anfälle verhindert und bei hohen Dosierungen die C1-INH-Plasmaspiegel erhöht. In einem Bericht wurde nachgewiesen, dass Danazol, ein abgeschwächtes Androgen, das häufig bei Patienten mit HAE eingesetzt wird, die Transkription des Östrogenrezeptor-Gens in menschlichen Monozyten verringert (Fujimoto et al., 1995).

1.1.1.7 Nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente (NSAID)

Angioödeme können auch durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs) ausgelöst werden. Das durch Aspirin (Acetylsalicylsäure) und andere NSAIDs ausgelöste Angioödem sind pseudoallergischer Natur und wahrscheinlich die bekannteste Form des arzneimittelinduzierten Angioödems (Bircher, 1999; Setticone, 1981). Im Unterschied zu allergischen Reaktionen werden sie jedoch nicht durch IgE ausgelöst, sondern stehen im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus des auslösenden Arzneimittels.

Bei diesen pseudoallergischen Angioödemem ist eine Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Cyclooxygenase-hemmenden Medikamenten zu beobachten. Ein Schlüsselaspekt hierbei ist die vermehrte Bereitstellung des Substrats Arachidonsäure für die 5-Lipoxygenase (5-LOX)-abhängige Biosynthese von CysLT, welche die Endothelpermeabilität erhöhen und so die Bildung von Ödemen begünstigen. Dementsprechend wurden Leukotrienrezeptorantagonisten erfolgreich zur Vorbeugung von NSAID-bedingter Urtikaria eingesetzt (Asero, 2000) und die selektiven Inhibitoren der Cyclooxygenase 2 scheinen bei diesen Patienten eine sicherere Alternative darzustellen (Bavbek et al., 1999).

Die Bedeutung von Prostaglandinen bei der Zunahme der Permeabilität durch Bradykinin wurde in Versuchen mit C57BL/6 J-Mäusen untersucht, die mit COX-Inhibitoren vorbehandelt wurden. Diese Vorbehandlung führte zu einer signifikanten Reduktion

von Bradykinin-induzierter dermaler Extravasation (Gholamreza-Fahimi et al., 2020). Dies deutet darauf hin, dass sowohl COX1 als auch COX2 in der Entwicklung von Bradykinin-induzierter Extravasation in kleinen dermalen Blutgefäßen involviert sein könnten. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass die NSAID-bedingte Reduzierung der BK-induzierten Extravasation möglicherweise durch eine Unterdrückung der Prostaglandinsynthese erklärt werden kann.

1.1.1.8 Andere Arten des arzneimittelinduzierten nicht-allergischen Angioödems

Vereinzelte Berichte beschreiben Angioödeme ohne Urtikaria bei einer Reihe von anderen Arzneimitteln. Außer bei ACE-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten und Fibrinolytika wurde bei anderen Arzneimitteln, die bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden, nur selten über Angioödeme berichtet. Bei einem Patienten wurde nach intravenöser Verabreichung von Metoprolol über eine schwere Angioödemreaktion berichtet (Krikorian et al., 1994). Dieser Patient hatte bereits früher Angioödeme nach einer Behandlung mit ACE-Hemmern und die Komplementkomponenten wurden nicht untersucht. In einer Studie wird das Auftreten von Angioödemem bei 2 Patienten nach der Anwendung von 2 verschiedenen Kalziumkanalantagonisten beschrieben (Sauve et al., 1999). Weiterhin wurde auch über einen Fall eines durch Amiodaron verursachten Angioödems berichtet (Burches et al., 2000). Psychopharmaka wie Risperidon und Paroxetin können ebenfalls Angioödeme auslösen (Cooney & Nagy, 1995; Kimyai-Asadi et al., 1999; Mithani & Hurwitz, 1996). Es scheint, dass diese Medikamente Angioödeme bei Patienten auslösen können, die bereits prädisponiert sind, diese unerwünschte Wirkung zu entwickeln.

1.1.1.9 Hereditäres Angioödem (HAE)

Eine Funktionsstörung oder ein Mangel an C1-Inhibitor oder eine Funktionsstörung von FXII kann ebenfalls zu einem Angioödem führen. HAE wird mit Mutationen im C1-Inhibitor-Gen in Verbindung gebracht. Bei HAE-Typ 1 führt die Mutation zu einer geringeren Menge an C1-Inhibitor, während bei HAE-Typ 2 die Menge an C1-Inhibitor

normal sein kann, das Protein aber nicht richtig funktioniert. Beide Typen sind autosomal dominant. Bei Patienten mit normaler C1-Inhibitor-Funktion wurden spezifische Missense-Mutationen in verschiedenen Genen identifiziert, die zu verschiedenen Subtypen von HAE führen können (Bork et al., 2020; Germenis et al., 2021). Diese umfassen:

- Mutationen im Faktor 12-Gen (FXII) (Dewald & Bork, 2006)
- Mutationen im Plasminogen-Gen (PLG) (K. Bork et al., 2018)
- Mutationen im Angiopoietin-1-Gen (ANGPT1) (Bafunno et al., 2018)
- Mutationen im Kininogen 1-Gen (KNG1) (Bork et al., 2019)
- Mutationen im Myoferlin-Gen (MYOF) (Ariano et al., 2020)
- Mutationen im HS3ST6-Gen (Bork et al., 2021)

In einigen Fällen bleibt die Ursache jedoch unbekannt (Zuraw, 2018). Eine erworbene C1-Inhibitor-Dysfunktion oder -Mangel ist auf das Vorhandensein von zirkulierenden Autoantikörpern zurückzuführen (Kaplan & Ghebrehiwet, 2010).

HAE ist durch die Aktivierung des Plasma-KKS aufgrund einer C1-Inhibitor-Dysfunktion gekennzeichnet, was zur Freisetzung von Bradykinin führt (Germenis et al., 2021). Bradykinin bindet dann an B2R, was die Gefäßpermeabilität erhöht und dadurch eine lokale Extravasation von Plasma und ein Gewebeödem verursacht (De Maat et al., 2018). Das Ödem kann lokal oder generalisiert sein und kann lebensbedrohlich sein, wenn die Atemwege betroffen sind. Patienten mit einer C1-Inhibitor-Dysfunktion weisen hohe zirkulierende Bradykininwerte auf (Nussberger et al., 1998). Neben dem Plasma-KKS ist bei diesen Patienten auch der klassische Weg des Komplementsystems aktiviert, die in der Regel niedrige C4-Spiegel und hohe Konzentrationen von löslichem C5b-9 aufweisen (Nielsen et al., 1996). Die Komplementaktivierung ist jedoch nicht der primäre Mediator der Ödeme. Der fibrinolytische Weg ist ebenfalls aktiviert und es werden erhöhte Spiegel von Plasmin- α 2-Antiplasmin-Komplexen beobachtet (Nielsen et al., 1996). Insgesamt führt eine C1-Inhibitor-Dysfunktion zu einer übermäßigen KKS-Aktivierung und einem Bradykinin-vermittelten Ödem sowie zu einer Komplementaktivierung mit Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a (Kaplan & Ghebrehiwet, 2010).

Es gibt jedoch auch hereditäre Angioödeme mit normaler C1-Funktion. Der Hintergrund dieser Entität ist recht vielfältig, da Mutationen in mehreren Genen (F12, PLG, ANGPT1, KNG1, MYOF und HS3ST6) zu den verschiedenen Subtypen führen können

(Farkas et al., 2021; Veronez et al., 2021). Daher sollte ein Komplementtest durchgeführt werden, um einen C1-INH-Mangel selbst auszuschließen. Nichtsdestotrotz gibt keine spezifische biochemische Methode für die genaue Diagnose von hereditären Angioödemem mit normaler C1-Funktion. Darüber hinaus ist die Ätiologie dieser Entität in einem Großteil der Fälle unbekannt (Veronez et al., 2021).

1.1.1.10 Idiopathisches erworbenes Angioödem

Bei den idiopathischen erworbenen Angioödemem werden das idiopathische nicht-histaminerge erworbene Angioödem (IAE-NH) und das idiopathische histaminerge erworbene Angioödem (IAE-H) unterschieden. Die genauen Hintergründe und die molekulare Pathogenese des IAE-NH sind unbekannt. Ähnlich wie bei ACEI-AE basiert die Diagnose von IAE-NH auf dem Ausschluss anderer Erkrankungen sowie auf der Feststellung, dass die ödematösen Symptome nicht auf die Standardtherapie mit Antihistaminika ansprechen und die Familienanamnese negativ ist (Sabaté-Brescó et al., 2021).

Das IAE-H ist ein mastzell- und histaminabhängiges Angioödem, bei dem die Patienten auf eine kurzzeitige Steroidbehandlung ansprechen. Es kann von dem mit einer chronischen spontanen Urtikaria assoziierten Angioödem durch das relative Fehlen von IgG-Antikörpern gegen den IgE-Rezeptor oder IgG-Anti-IgE unterschieden werden (Sabaté-Brescó et al., 2021).

1.1.2 Epidemiologie des nicht-allergischen Angioödems

Das hereditäre Angioödem wird als seltene Krankheit angesehen. Schätzungen zufolge liegt ihre Prävalenz zwischen einer von 100.000 bis zu einer von 10.000 Personen (Cicardi et al., 2014; Longhurst & Cicardi, 2012). Andere Formen des hereditären Angioödems treten noch seltener auf. Das ACEI-induziertes Angioödem (ACEI-AE) ist aufgrund der häufigen Anwendung von ACEI, die am weitesten verbreitete Form des nicht-allergischen Angioödems. Studien zeigen variierende Inzidenzraten für ACEI-AE, die teilweise durch ethnische Unterschiede in der Patientenpopulation erklärt werden können. Bei weißen Patienten liegt die Inzidenz bei etwa 0,1–0,7 % (Agostoni &

Cicardi, 2001; Bas et al., 2006; Kostis et al., 2005), während sie bei Afroamerikanern etwa 4,6-mal höher ist (Brown et al., 1996). Diese Gruppe zeigt auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Bradykinin (Gainer et al., 1996). Eine Metaanalyse ergab, dass das relative Risiko für ACEI-AE bei afroamerikanischen Patienten dreimal höher ist als bei weißen Patienten (McDowell et al., 2006). Die Häufigkeit von durch Enalapril ausgelösten Angioödemien liegt bei etwa 0,7 %, während Angioödeme durch Captopril/Ramipril etwas seltener sind (0,3–0,5 %) (Kostis et al., 2005; Pfeffer et al., 2003; Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators et al. 2000, ONTarget Investigators et al., 2008). Angioödeme, die durch die Sartane Telmisartan oder Valsartan ausgelöst werden, sind insgesamt noch seltener (0,1–0,25 %) (Kostis et al., 2005; Pfeffer et al., 2003; Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators et al., 2000, ONTARGET Investigators et al. 2008). Eine umfassende Analyse von 40 Studien mit über 110.000 Patienten zeigte, dass die Inzidenz von Angioödemien bei ACE-Hemmern bei etwa 0,3 % und bei Sartanen bei 0,11 % liegt (Makani et al., 2012). Auf der Grundlage einer epidemiologischen Studie lag die Prävalenz eines C1-Inhibitor-abhängigen erworbenen Angioödems bei 1,5 pro 1 Million Einwohner (Aygören-Pürsün et al., 2018; Psarros et al., 2014). Auf 100 Patienten mit ACEI-AE kommen zehn Patienten mit hereditärem Angioödem und auf 100 Patienten mit ACEI-AE ein Patient mit C1-Inhibitor-abhängigem erworbenem Angioödem (Aygören-Pürsün et al., 2018). Bei Personen mit hereditärem Angioödem kommt es durchschnittlich zu einem Angioödemanfall pro Monat (Psarros et al., 2014). Folglich dürfte die Zahl der durch hereditäres Angioödem und ACEI-verursachten Angioödem-Anfälle ähnlich hoch sein, da ACEI in der Regel nach der Diagnose abgesetzt werden, was die Möglichkeit eines erneuten Auftretens verringert. In einem Land mit 100 Millionen Einwohnern würden demnach jährlich etwa 31.500 Bradykinin-vermittelte Angioödem-Attacken registriert (Aygören-Pürsün et al., 2018).

Bestimmte orale Antidiabetika können das Risiko für nicht-allergische Angioödeme durch ACE-Hemmer erhöhen (Brown et al., 2009; Byrd et al., 2007). Andere Nebenwirkungen, wie Husten oder symptomatische Hypotonie, sind jedoch weitaus häufiger und führen eher zu Unverträglichkeiten (ONTARGET Investigators et al., 2008). Eine retrospektive Studie untersuchte, ob Patienten, die bereits ein ACE-Hemmer-induziertes Angioödem erlebt haben, ein erhöhtes Risiko für Angioödeme bei der Einnahme von Sartanen haben. Die Studie ergab, dass dies nicht der Fall ist (Rasmussen et al., 2019). Dennoch wurden Fälle von wiederkehrenden und schweren Angioödemien nach

dem Wechsel von ACE-Hemmern zu Sartanen berichtet (Hellebrand et al., 2005; Warner et al., 2000). Eine klinische Studie deutet darauf hin, dass Sartane den Abbau von Bradykinin durch ACE hemmen können, was wiederum nicht-allergische Angioödeme auslösen kann (Campbell et al., 2005).

Darüber hinaus ist die Kombination des Neprilysin-Hemmers Sacubitril mit Valsartan als Behandlungsoption für Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfraction verfügbar. Die Hemmung von Neprilysin reduziert den Abbau von Bradykinin und kann dadurch nicht-allergische Angioödeme verursachen (Bas et al., 2015). In einer großangelegten Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit des Medikaments Omapatrilat bei hypertensiven Patienten wurde eine deutlich höhere Inzidenz von Angioödem im Vergleich zu Enalapril festgestellt (2,2 % vs. 0,7 %) (Kostis et al., 2004). In einer Studie, die Enalapril und Sacubitril/Valsartan bei Herzinsuffizienzpatienten verglich, lag die Inzidenz von Angioödem bei Enalapril bei 0,2 % und bei Sacubitril/Valsartan bei 0,5 % (McMurray et al., 2014).

Es gibt weitere Medikamente, die potenziell Bradykinin-vermittelte Angioödeme auslösen können, allerdings sind diese weniger bekannt. Die Inzidenzraten variieren in der aktuellen Literatur. Beispiele hierfür sind Gewebefibrinolytika, Renininhibitoren, Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus und Everolimus (Byrd et al., 2008; Duerr et al., 2010; Hurford et al., 2015; Khalid et al., 2018; Lapostolle et al., 2022; White et al., 2010).

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik von Angioödem, insbesondere die Unterscheidung zwischen medikamenteninduziertem Bradykinin-vermitteltem Angioödem, hereditärem Angioödem und histaminergischem Angioödem stellt oft eine Herausforderung dar. In akuten Situationen sind die Anamnese, das klinische Erscheinungsbild und die Reaktion auf die Behandlung von zentraler Bedeutung. Laborwerte können im Verlauf der Erkrankung hilfreich sein, sind aber meist nicht für die unmittelbare Diagnosestellung ausschlaggebend.

1.1.3.1 Medikamenteninduziertes Bradykinin-vermitteltes Angioödem

Wenn Patienten, die regelmäßig potentiell mit Angioödem assoziierte Medikamente einnehmen, ein Angioödem ohne Juckreiz und ohne Quaddelbildung im Kopf- und Halsbereich entwickeln, ist ein medikamenteninduziertes, bradykinin-vermitteltes Angioödem wahrscheinlich. Solche Schwellungen sprechen oft nicht ausreichend auf eine Therapie mit Kortikosteroiden oder Antihistaminika an (Bas et al., 2015). Es gibt keine spezifischen Laborparameter zur Diagnose, aber die Überprüfung der Komplementwerte wie C1q und C4 sowie der Konzentration und Aktivität des C1-INH und die Familienanamnese können hilfreich sein, um HAE oder erworbenes Angioödem mit reduzierten C1-INH-Werten auszuschließen (Balla et al., 2021). Eine C4-Bestimmung ist auf jeden Fall angezeigt, wenn bei dem Patienten ein Angioödem in der Familienanamnese vorliegt oder eine zugrundeliegende lymphoproliferative Erkrankung (wie eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz oder ein Lymphom) oder eine andere bösartige Erkrankung vorliegt (Kyrmizakis et al., 2004; Vasekar & Craig, 2012). Darüber hinaus besteht bei Patienten mit seltenen Angioödem ein höheres Risiko, unter einer ACE-Hemmer-Therapie ein Angioödem zu entwickeln, so dass ACE-Hemmer eine zugrunde liegende Erkrankung „enttarnen“ können (Terreehorst et al., 2019). Ein niedriger C4-Wert sollte Anlass für eine umfassendere Laboruntersuchung sein, die auch die Funktion der C1-Inhibitoren und die Proteinwerte, den C4-Wert und den C1q-Wert umfasst (Vasekar & Craig, 2012). Eine neu entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Messung von Plasmapeptiden im Kallikrein-Kinin-System könnte ebenfalls nützlich sein, obwohl sie noch nicht im alltäglichen klinischen Einsatz etabliert ist (Gangnus & Burckhardt, 2021; Marceau et al., 2022).

In den bisherigen Studien ist es nicht gelungen, spezifische Labor-Biomarker für ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme zu identifizieren, obwohl in einer Studie, in der Patienten sowohl mit Bradykinin-vermitteltem Angioödem als auch mit Histamin/Mastzellen-vermitteltem Angioödem untersucht wurden, bei beiden Arten von Angioödem im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Spiegel von Fibroblasten-Aktivierungsprotein alpha (FAP-alpha) und Gewebeplasminogenaktivator (tPA) festgestellt wurden (Bindke et al., 2022). Nur beim Bradykinin-vermittelten Angioödem waren die Serumwerte von E-Selektin und Angiopoetin-2 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Weitere Studien sind erforderlich, um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu bestimmen (Bindke et al., 2022).

Die Diagnose eines medikamenteninduziertes Angioödems wird klinisch gestellt, wenn bei einem Patienten, der verdächtige Medikamente einnimmt, ein Angioödem ohne Juckreiz oder Urtikaria an einer charakteristischen anatomischen Stelle auftritt. In diesem Fall sollte das Medikament abgesetzt und bis zum Beweis des Gegenteils davon ausgegangen werden, dass das Medikament die Ursache ist (Erickson & Coop, 2016). Die Diagnose wird bestätigt, wenn das Medikament abgesetzt wird und keine weiteren Angioödem-Episoden auftreten. Die Auswirkungen des Absetzens können jedoch erst nach mehreren Monaten deutlich werden, da bei einigen Patienten eine geringe Anzahl von wiederkehrenden Episoden auftritt, insbesondere in den ersten Monaten nach dem Absetzen (Terreehorst et al., 2019). Solche Patienten mit bestätigter Diagnose sollten keine ACE-Hemmer mehr einnehmen. Bei Patienten, bei denen nach sechs Monaten weiterhin Angioödeme auftreten, sollte eine Überweisung an einen Spezialisten in Betracht gezogen werden (Terreehorst et al., 2019). Wenn bei einem Patienten, der einen ACE-Hemmer einnimmt und akute Bauchschmerzen hat, der Verdacht auf ein viszerales Angioödem besteht, sollte eine nichtinvasive Bildgebung, wie z. B. Ultraschall oder Computertomographie (CT), durchgeführt werden, um ein Darmödem und/oder Aszites zu bestätigen (Korniyenko et al., 2011). CT oder abdomineller Ultraschall sind in vielen Fällen diagnostisch angezeigt. Magnetresonanztomographie (MRT) und invasive Endoskopie sollten den Fällen vorbehalten bleiben, in denen Ultraschall und CT nicht diagnostisch aussagekräftig waren und dennoch ein hoher klinischer Verdacht besteht (Schmidt & McGrath, 2002). **Abbildung 2** zeigt eine Übersicht über generelle Algorithmen bei der Diagnostik von Angioödemem. Es ist wichtig zu beachten, dass es bislang keine verlässlichen Laborparameter gibt und die Diagnose eine Ausschlussdiagnose darstellt.

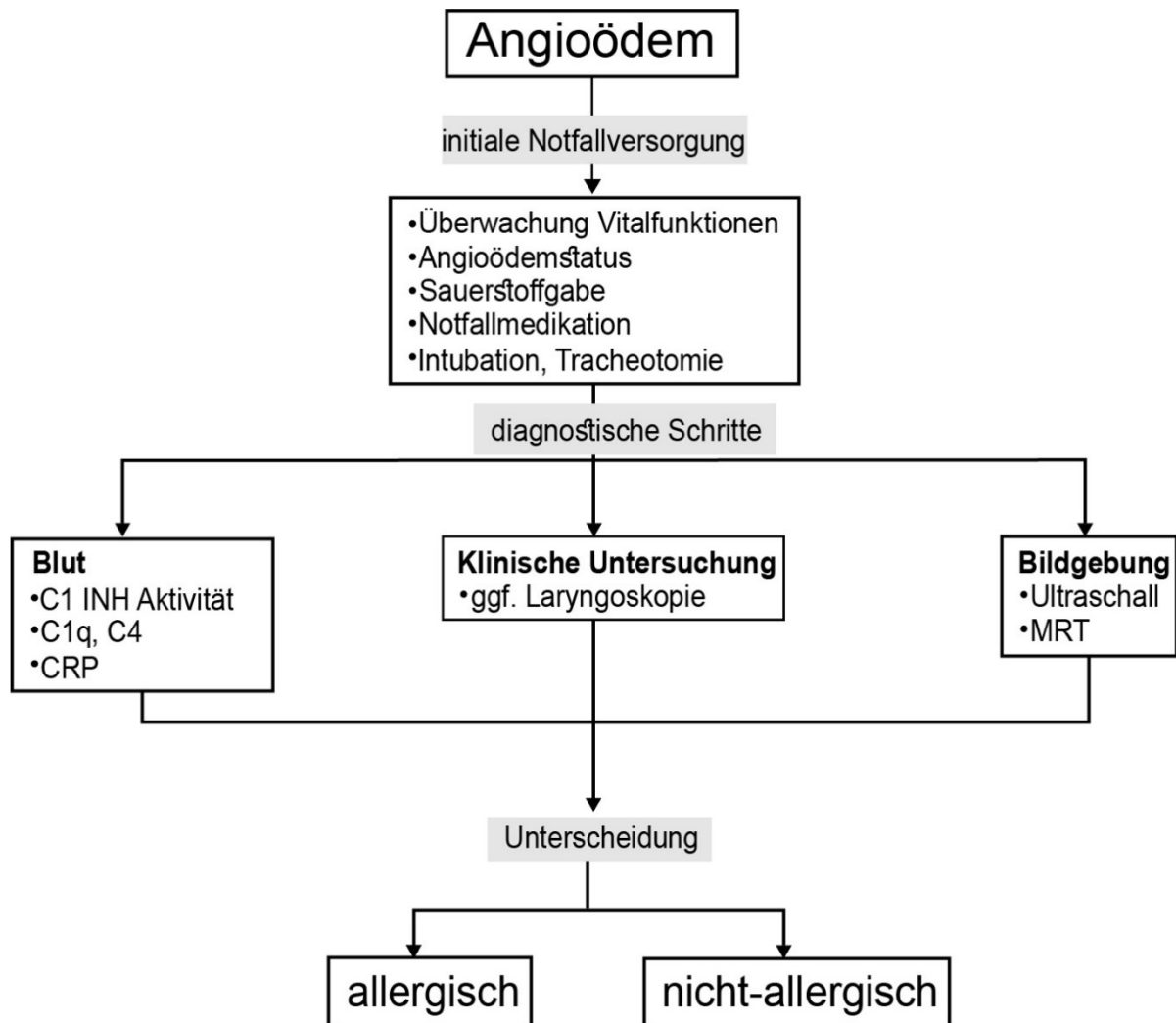


Abbildung 2: Diagnostische Algorithmen für das Angioödem

Abbildung modifiziert aus (Bas et al., 2007).

Ein medikamenteninduziertes nicht-allergisches Angioödem (Bradykinin-vermitteltes Angioödem) weist einige charakteristische Merkmale in der klinischen Präsentation auf. Es ist wichtig, ein nicht-allergisches von einem allergischen Angioödem zu unterscheiden, um den Patienten entsprechend behandeln zu können. Charakteristisch ist die Geschwindigkeit des Auftretens. Ein Histamin-vermitteltes Angioödem beginnt weniger als eine Stunde nach der Exposition, ein Bradykinin-vermitteltes Angioödem kann sich erst nach mehreren Stunden bis Tagen entwickeln. Bei einem Bradykinin-vermittelten Angioödem tritt nie Urtikaria auf. Abdominalmanifestationen sind bei medikamenteninduzierten nicht-allergischen Angioödem häufiger als bei medikamenteninduzierten allergischen Angioödem (Rubinstein et al., 2014).

Eine Beteiligung der Atemwege ist bei Bradykinin-vermittelten Angioödem selten. Die wichtigste Maßnahme bei Verdacht auf ein arzneimittelinduziertes nicht-allergisches An-

gioödem ist das Absetzen des verursachenden Arzneimittels (Bonner et al., 2017; Grigoriadou & Longhurst, 2009). Bei einem durch Histamin ausgelösten Angioödem klingen die Symptome innerhalb von 24 Stunden ab. Beim Bradykinin-vermittelten Angioödem dauern die Symptome länger an und können bis zu fünf Tage andauern (Craig et al., 2014). Es hat sich gezeigt, dass Antihistaminika, Epinephrin und Kortikosteroide die Dauer der Symptome nicht verkürzen (Bernstein et al., 2017). Wenn die Atemwege betroffen sind, wird eine unterstützende Behandlung durchgeführt.

Obwohl die Laborergebnisse häufig nicht früh genug vorliegen, um die Behandlung zu steuern, ist es wichtig, den C4-Spiegel und den Tryptase-Spiegel zu messen, um andere Ursachen auszuschließen und eine angemessene Nachsorge sicherzustellen. Der C4-Spiegel ist beim hereditären Angioödem immer erniedrigt. Die Diagnose eines hereditären Angioödems ist wahrscheinlicher, wenn es keine offensichtliche Ätiologie gibt. Bei allergischen Angioödemien ist die Tryptase erhöht (Bernstein et al., 2017; Craig et al., 2014). Ein Patient, bei dem weder die Zunge noch der Kehlkopf betroffen oder die Atemwege anderweitig beeinträchtigt sind, kann nach 12 bis 24 Stunden Beobachtung entlassen werden. Ein Patient, bei dem ein lebensbedrohliches Angioödem aufgetreten ist, sollte das Medikament auf unbestimmte Zeit absetzen. Die Blutwerte können ambulant mit dem Hausarzt ausgewertet werden. Wenn der Verdacht auf ein hereditäres Angioödem besteht, sollte der Patient zur weiteren Abklärung und prophylaktischen Behandlung an einen Immunologen überwiesen werden (Ishoo et al., 1999; Moellman et al., 2014).

1.1.3.2 Hereditäres Angioödem

Patienten mit diagnostiziertem HAE verfügen häufig über einen Notfallausweis. Bei noch nicht diagnostizierten Patienten berichten diese oft über eine familiäre Vorgeschichte von Angioödemien. Das HAE zeigt keine Behandlungsreaktion auf Kortikosteroide oder Antihistaminika. Die Messung der C1-INH-Werte und des Komplementfaktors C4 kann die Diagnose stützen, wobei die Ergebnisse möglicherweise erst nach einigen Tagen vorliegen (Maurer et al., 2022). Seltene Formen des HAE mit normalem C1-INH können nur durch genetische Tests oder anhand des klinischen Bildes und der Patientengeschichte diagnostiziert werden (Bork et al., 2023).

1.1.3.3 Akute Urtikaria

Urtikaria wird durch die Entwicklung von Quaddeln (Nesselsucht), Angioödem oder beidem charakterisiert. Die Differenzierung zwischen isoliertem Angioödem bei akuter spontaner Urtikaria und Bradykinin-vermitteltem Ödem ist nicht immer einfach. Routine-Diagnostetests sind nur bei chronischer Urtikaria (> 6 Wochen) notwendig (Zuberbier et al., 2022).

1.1.3.4 Allergisches Angioödem

Angioödem ist eines der häufigsten Symptome akuter allergischer Sofortreaktionen und Anaphylaxie. Wichtig ist die Anamnese bezüglich auslösender Faktoren, Verstärkungsfaktoren und bekannter Allergien. Begleitende Nesselsucht und Juckreiz sind häufig. Die Verwendung klinischer Kriterien zur Identifizierung einer Anaphylaxie wird empfohlen, mit einer Blutentnahme zur späteren Messung von Tryptase (Muraro et al., 2022).

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 Absetzen von ACE-Hemmern

Während für hereditäre Angioödeme bereits verschiedene pharmakotherapeutische Optionen gut etabliert sind, gibt es bisher kein zugelassenes Medikament speziell für die Behandlung von akuten Angioödem, die durch ACE-Hemmer induziert werden. Die primäre Behandlung eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems besteht in der akuten Sicherung der Atemwege, wenn Mund oder Rachen betroffen sind (bis die Angioödem-Episode abgeklungen ist), und im Absetzen des Arzneimittels. Wenn der Mund oder der Rachen betroffen ist, sollten die Atemwege sofort untersucht und wiederholt überwacht werden, bis die Schwellung eindeutig abklingt. Eine sofortige Intubation und mechanische Beatmung können erforderlich sein. Angioödeme, die durch ACE-Hemmer verursacht werden, klingen normalerweise innerhalb von 24 bis 72 Stunden ab. Wenn ACE-Hemmer weiter eingenommen werden, besteht eine erhöhte und unvorhersehbare Rate von Angioödem, die erneut auftreten und die Anfälle

können schwerer oder lebensbedrohlich werden (Beltrami, 2011, 2006). Eine retrospektive Studie an 82 Patienten zeigte, dass die Fortsetzung einer ACE-Hemmer-Therapie trotz eines durch ACE-Hemmer induzierten Angioödems mit einer etwa zehnfach höheren Rückfallrate verbunden ist (Brown et al., 1997). Patienten, die ein Angioödem haben, das auf einen ACE-Hemmer zurückzuführen ist, sollten nicht wieder mit dieser Medikamentengruppe behandelt werden (Erickson & Coop, 2016). Wenn die Ursache des Angioödems eines Patienten unklar ist, sollten ACE-Hemmer dennoch abgesetzt werden. Wenn der Patient über mehrere Monate hinweg immer wieder Angioödeme erleidet, ist die Ursache des Angioödems wahrscheinlich nicht der ACE-Hemmer und es sollte nach anderen Ursachen gesucht werden (Kostis et al., 2018).

Eine retrospektive Beobachtungsstudie mit 267.612 Patienten, die ACE-Hemmer einnahmen, ergab, dass bis zur Hälfte der Patienten nach dem ersten durch ACE-Hemmer induzierten Angioödem die Einnahme nicht einstellten (Mahmoudpour et al., 2015). Bei diesen Patienten war die Wahrscheinlichkeit eines wiederkehrenden Angioödems mehr als 100-mal höher (21,9–25,2 %) als die eines Erstereignisses (0,16 %). Es sollte daher ein „prophylaktischer“ Effekt des Absetzens des ACE-Hemmers im Sinne eines ausbleibenden wiederkehrenden Angioödems erwartet werden. Retrospektive Analysen zeigten jedoch überraschenderweise, dass dies nicht immer der Fall ist. So erlebten etwa 9 % der Patienten, die nach dem initialen Angioödem ACE-Hemmer absetzten, ein Rezidiv (Mahmoudpour et al., 2015). In einer Gruppe von 54 italienischen Patienten, die wegen eines durch ACE-Hemmer induzierten Angioödems auf Sartane, Kalziumantagonisten oder andere Medikamente umgestellt wurden, traten bei acht Patienten (15 %) weiterhin Angioödeme auf (Cicardi et al., 2004). Nur bei zwei Patienten waren Rezidive wahrscheinlich auf ein Sartan zurückzuführen. In einer weiteren retrospektiven Studie derselben Forschungsgruppe lag die Rezidivrate bei etwa 50 % bei 111 Patienten nach Absetzen des ACE-Hemmers, unabhängig davon, ob die Patienten mit Sartanen, Kalziumantagonisten, Betablockern oder anderen Medikamenten behandelt wurden (Beltrami et al., 2011). Etwa zwei Drittel dieser Patienten erlitten wiederkehrende Angioödeme mit einer Häufigkeit von einem bis fünf Anfällen pro Jahr. Die Autoren vermuten, dass Patienten, die ein durch ACE-Hemmer induziertes Angioödem erleiden, bereits eine Disposition für die Entwicklung von Angioödem haben, die durch die Therapie mit ACE-Hemmern manifest wird. Diese Ansicht wird durch einen Fallbericht unterstützt, in dem das erste Auftreten eines durch ACE-Hemmer induzierten Angioödems vier Wochen nach dem Absetzen

von Lisinopril aufgrund eines anhaltenden trockenen Hustens berichtet wurde, obwohl die Behandlung zuvor monatelang ohne Zwischenfälle verlief (Kainat et al., 2021).

1.1.4.2 Pharmakologische Therapie

Es gibt mehrere wirksame Therapien zur Unterbrechung von Angioödem-Attacken beim hereditären Angioödem, der am besten untersuchten Form des Bradykinin-vermittelten Angioödems. Zur Behandlung von Ödemattacken im Zusammenhang mit hereditärem Angioödem empfiehlt die Leitlinie der World Allergy Organization und der European Academy of Allergy and Clinical Immunology (WAO/EAACI) verschiedene spezifische Therapieoptionen (Maurer et al., 2022). Zu diesen gehören C1-Esterase-Inhibitoren, die entweder aus Plasma gewonnen oder rekombinant hergestellt werden, der Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist Icatibant und der Plasma-Kallikrein-Inhibitor Ecallantid. Ecallantid ist allerdings derzeit nur in den USA und einigen Ländern Lateinamerikas zugelassen (Weber & Messerli, 2008). **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die Wirkstoffe für die Behandlung des hereditären Angioödems.

Wirkstoff	Handelspräparat	Wirkmechanismus	Anwendung	Bemerkung
C1-Esterase-Inhibitor (aus Plasma)	Berinert®, Cinryze®	Proteinsubstitution	Akute Ödemattacke, Kurz- und Langzeitprophylaxe	Auch in der Schwangerschaft und Stillzeit geeignet
Conestat alfa (re-kombinant)	Ruconest®	Proteinsubstitution	Akute Ödemattacke	
Icatibant	Firazyr®	Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist	Akute Ödemattacke	
Ecallantid	Kalbitor®	Plasma-Kallikrein-Inhibitor	Akute Ödemattacke	In Deutschland nicht zugelassen
Lanadelumab	Takhzyro®	Plasma-Kallikrein-Antikörper	Langzeitprophylaxe	
Berotralstat	Orladeyo®	Plasma-Kallikrein-Inhibitor	Langzeitprophylaxe	Zur oralen Einnahme
Tranexamsäure	Cyklokapron®	Antifibrinolytikum, Hemmung der Plasminogenaktivierung	Langzeitprophylaxe, Mittel der 2. Wahl	Zur oralen Einnahme

Tabelle 2: Überblick über die Wirkstoffe für die Behandlung des hereditären Angioödems.

Theoretisch sollten diese Therapien auch bei ACE-Hemmer-induzierten Angioödemem hilfreich sein, aber die vorhandenen Studien sind widersprüchlich (Baş et al., 2015; Mohorn et al., 2021; Sinert et al., 2017; Straka et al., 2017). Hierfür kann es einige Gründe geben. Beispielsweise gibt es keinen diagnostischen Schnelltest, um festzustellen, ob das Angioödem eines Patienten bradykininvermittelt oder mastzell-/histaminvermittelt ist. Die Diagnose eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems ist bei einem Patienten mit Angioödem, der einen ACE-Hemmer einnimmt, präsumptiv, so dass es in jeder dieser Studien wahrscheinlich Patienten gibt, die fälschlicherweise als ACE-Hemmer-induziertes Angioödem eingestuft werden. Obwohl davon ausgegangen wird, dass sowohl HAE als auch ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme durch Bradykinin vermittelt werden, unterscheiden sich die Angioödem-Attacken wahrscheinlich in anderer Hinsicht (Erickson & Coop, 2016; Kostis et al., 2018). Patienten mit HAE erleiden immer wieder Angioödem-Attacken und lernen, Prodromalsymptome zu erkennen und sich selbst zu behandeln oder im Frühstadium einer Attacke den Notdienst aufzusuchen. Studien, in denen die Wirksamkeit von HAE-Therapien nachgewiesen wurde, setzten voraus, dass sich die Patienten innerhalb der ersten Stunden nach Auftreten der Symptome vorstellen. Im Gegensatz dazu haben die meisten Patienten mit einem ACE-Hemmer-induzierten Angioödem noch nie ein Angioödem erlebt und kommen

daher deutlich später zur Behandlung (Erickson & Coop, 2016; Kostis et al., 2018; Weber & Messerli, 2008).

Antifibrinolytika

Die Rolle von Antifibrinolytika, wie beispielsweise Tranexamsäure, in der Behandlung von Angioödem (HAE) ist insbesondere im Zusammenhang mit hereditärem Angioödem in einigen Ländern nach wie vor von Bedeutung. Die aktuellen internationalen Leitlinien raten jedoch im Allgemeinen von ihrem Einsatz zur Bedarfs- oder prophylaktischen Behandlung von HAE-Anfällen ab (Zuberbier et al., 2022). Dies begründet sich in der unzureichenden oder nicht überzeugenden Datenlage hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, obwohl das Sicherheitsprofil als gut eingestuft wird. Es muss jedoch anerkannt werden, dass in einigen Ländern keine anderen Behandlungsoptionen verfügbar sind. In einer retrospektiven Übersichtsarbeit wurden 33 Patienten untersucht, die mit einem schweren Angioödem in die Notaufnahme eingeliefert wurden, während sie einen ACE-Hemmer einnahmen und die entweder mit intravenöser oder oraler Tranexamsäure als Erstbehandlung behandelt wurden (Beauchêne, 2018). Die Dosen reichten von 0,5 bis 4 g, wobei die meisten Patienten 1 g erhielten. Bei 13 von 33 Patienten wurde innerhalb einer Stunde eine Besserung beobachtet und bei 27 Patienten reichte Tranexamsäure aus, um das Angioödem in den Griff zu bekommen, während bei 6 Patienten eine teilweise Besserung eintrat und sie anschließend entweder Icatibant (n = 5 Patienten) oder ein C1-Inhibitor-Konzentrat (n = 1 Patient) erhielten. In keinem Fall musste intubiert werden (Stoldt et al., 2022; Wu et al., 2022).

Ecallantide

Ecallantide, auch bekannt als DX-88, ist ein rekombinantes Protein aus 60 Aminosäuren, das spezifisch Plasmakallikrein hemmt, was darauf hindeutet, dass es ähnliche physiologische Effekte wie C1-INH hat. Allerdings gibt es Unterschiede in den biologischen Auswirkungen gegenüber C1-INH. Zum Beispiel hat Ecallantide eine deutlich schwächere hemmende Wirkung auf C1r und C1s, Plasmin, Faktor XIIa und Faktor XIa, obwohl es ein starker Plasmakallikrein-Inhibitor ist (Riha et al., 2017). Die Effektivität von Ecallantide in der Behandlung von akuten HAE-Attacken wurde nachgewiesen (Cicardi et al., 2010). Ecallantide ist für die akute Behandlung von HAE-Anfällen zugelassen. Ecallantid hemmt die Umwandlung von hochmolekularem Kininogen in

Bradykinin durch Hemmung von Plasmakallikrein (Cicardi et al., 2010). Das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem wird jedoch durch die Persistenz von Bradykinin aufgrund mangelnder Verstoffwechselung und nicht durch eine Überproduktion verursacht, so dass es nicht ganz intuitiv ist, dass Ecallantid wirksam sein könnte (Bas et al., 2007). Die Belege für den Nutzen von Ecallantid bei der Behandlung des ACE-Hemmer-induzierten Angioödems sind zum Teil widersprüchlich (Bernstein et al., 2015; Lewis et al., 2015). In einer randomisierten Studie wurde kein Unterschied in der Zeitspanne festgestellt, die Patienten benötigten, um nach einer Behandlung mit Ecallantid (in Dosen von 10 mg, 30 mg oder 60 mg) oder Placebo sicher entlassen zu werden (Lewis et al., 2015). Die Studie umfasste 76 Erwachsene, die unter der Einnahme eines ACE-Hemmers ein Angioödem entwickelten und sich innerhalb von 12 Stunden nach Auftreten der Symptome in der Notaufnahme vorstellten. In einer weiteren randomisierten Studie mit 50 Erwachsenen wurden die Probanden Ecallantid (30 mg) oder Placebo (zusätzlich zur konventionellen Therapie mit Glukokortikoiden und Antihistaminika) zugeteilt, wobei die Probanden innerhalb von 12 Stunden nach Auftreten der Symptome vorstellig wurden und sich die Symptome verschlimmerten oder innerhalb von zwei Stunden nach der ersten Beobachtung keine Besserung eintrat (Bernstein et al., 2015). Der primäre Endpunkt war die Möglichkeit, innerhalb von vier Stunden nach der Behandlung entlassen zu werden. Die Entlassungskriterien wurden bei 31 bzw. 21 Prozent der mit Ecallantid bzw. Placebo behandelten Patienten erfüllt. Es scheint also einen gewissen Nutzen der Therapie zu geben.

In einer multizentrischen, randomisierten und vergleichsweise großen Phase-II-Studie wurde der Nutzen von Ecallantide in drei verschiedenen Dosierungen bei 79 Patienten mit leichten bis mäßigen ACE-Hemmer-induzierten Angioödem untersucht (Lewis et al., 2015). Diese Studie zeigte jedoch keinen Unterschied zur „Standardtherapie“, die für die Studienärzte optional war. Die überwiegende Mehrheit der Patienten erhielt unabhängig von der Zuordnung Glukokortikoide (85 %) und/oder H1-Antihistaminika (85 %). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer zweiten randomisierten, kontrollierten Phase-II-Studie mit einem vergleichbaren Studienprotokoll erzielt (Bernstein et al., 2015).

C1-INH

Gereinigtes C1-Inhibitor-konzentrat schien in Fallberichten (Gelée et al., 2008; Lipski et al., 2015; Nielsen & Gramstad, 2006; Rasmussen et al., 2013; Steinbach et al., 2001) bei ACE-Inhibitor-induzierten Angioödemem hilfreich zu sein. In einer kleinen, randomisierten Studie erhielten jedoch 25 Patienten die Standardbehandlung mit dem Zusatz eines C1-Hemmers oder eines Placebos und die Ergebnisse zeigten keine Verkürzung der Zeit bis zur ersten Besserung oder der Zeit bis zum vollständigen Verschwinden der Symptome bei Verwendung des C1-Hemmers. Die Studie wies mehrere methodische Probleme auf, so dass die Autoren zu dem Schluss kamen, dass weitere Untersuchungen erforderlich seien (Strassen et al., 2023). Eine der Funktionen des C1-Inhibitors ist die Hemmung von Kallikrein. Ähnlich wie bei Icatibant ist diese Therapie wahrscheinlich am nützlichsten, wenn sie innerhalb weniger Stunden nach Auftreten der Symptome verabreicht wird.

In der Literatur wurden insgesamt mindestens 27 Fallberichte und Fallserien veröffentlicht, die auf einen vorteilhaften Effekt von C1-INH bei der Behandlung von durch ACE-Hemmer induzierten Angioödemem hindeuten (Riha et al., 2017). Zudem wurde eine randomisierte kontrollierte Studie durchgeführt, um die Wirksamkeit von humanem C1-INH-Konzentrat bei der Behandlung von akuten durch ACE-Hemmer induzierten Angioödemem zu bewerten. In dieser Studie wurden 30 Patienten (16 mit C1-INH, 14 mit Placebo) randomisiert und behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass C1-INH im Vergleich zu einem Placebo unterlegen war, wenn es um die Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Symptome ging, und das bei einer Basisanwendung von Steroiden und Antihistaminika (Strassen et al., 2023). Da die meisten akuten Angioödemem oft wie „allergische“ Angioödemem mit Kortikosteroiden und Antihistaminika behandelt werden, bleibt unklar, ob diese Behandlung zumindest einen geringen Effekt auf akute Bradykinin-vermittelte Angioödemem als Nebenwirkung von Medikamenten wie ACE-Hemmern hat.

Fresh-Frozen-Plasma

FFP enthält das Enzym ACE und es wird angenommen, dass die Verabreichung von FFP hohe Bradykininspiegel abbaut und das Angioödem anschließend reduziert wird (Chaaya et al., 2017). Die übliche Dosis beträgt zwei Einheiten für Erwachsene. In den beschriebenen Berichten klangen die Schwellungen in der Regel innerhalb von zwei bis vier Stunden nach der Verabreichung ab. In Fallberichten wurde beschrieben, dass

die Verabreichung von FFP zu einer raschen Besserung des ACE-Hemmer-induzierten Angioödems ohne erneutes Auftreten der Symptome führte (Hassen, 2013; Karim & Masood, 2002; Warriar et al., 2004). Die ACE-Konzentrationen in einzelnen Plasmaeinheiten können jedoch erheblich schwanken (Chen et al., 2019).

Icatibant

Icatibant ist ein synthetischer Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist, der für die akute Behandlung von HAE-Attacken zugelassen ist. Zur Behandlung des durch ACE-Hemmer induzierten Angioödems mit Icatibant wurden zehn Fallberichte und fünf Fallserien veröffentlicht, die auf klinisch nützliche Effekte hindeuten (Riha et al., 2017). Eine prospektive Fallserie mit acht Patienten zeigte, dass eine einmalige subkutane Verabreichung von 30 mg Icatibant die Zeit bis zum vollständigen Verschwinden der Symptome von durchschnittlich 33 Stunden auf 4,4 Stunden reduzierte (Bas et al., 2010). Eine retrospektive Fallserie zum Einsatz von Icatibant bei nicht-HAE-bedingtem Angioödem beschrieb 14 Patienten mit ACE-Hemmer-induziertem Angioödem, bei denen die Behandlung mit Icatibant zu einer medianen Auflösungszeit von 9 Stunden führte; allerdings gab es in dieser Studie keine Vergleichsgruppe (Le et al., 2021).

Drei randomisierte Studien haben die Wirksamkeit und Sicherheit von Icatibant ebenfalls bewertet und veröffentlicht (Bas et al., 2015; Sinert et al., 2017; Straka et al., 2017). In der AMACE-Studie, einer randomisierten doppelblinden Phase-II-Studie, wurden 27 Patienten mit ACE-Hemmer-induziertem Angioödem eingeschlossen, von denen 13 Patienten subkutan 30 mg Icatibant und 14 Patienten in der Kontrollgruppe intravenös 500 mg Prednisolon und 2 mg Clemastin erhielten (Bas et al., 2015). In dieser Studie waren alle Patienten hellhäutig und zwei Drittel waren männlich. Die Ödeme wurden visuell (endoskopisch) beurteilt. Alle Patienten wurden innerhalb von etwa 6 Stunden nach Symptombeginn behandelt. Der primäre Endpunkt der Studie war die Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Symptome. Die Behandlung mit Icatibant verkürzte signifikant diesen Endpunkt von 27,1 Stunden auf 8,0 Stunden.

Jedoch wurden die günstigen klinischen Ergebnisse der AMACE-Studie in nachfolgenden klinischen Studien nicht bestätigt. In einer zweiten randomisierten, doppelblinden Studie wurden 31 Patienten mit ACE-Hemmer-induziertem Angioödem eingeschlossen, von denen 13 Patienten 30 mg Icatibant subkutan und 18 Patienten ein Placebo

erhielten (Straka et al., 2017). Die Ödeme wurden nur anhand von Symptomen beurteilt und es wurde keine Endoskopie durchgeführt. Zusätzlich konnten die Patienten auch mit Glukokortikoiden und H1-Antihistaminika behandelt werden, wie von ihren Ärzten bestimmt. Im Gegensatz zur AMACE-Studie zeigte diese Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Placebo und Icatibant.

In einer dritten randomisierten Studie mit Icatibant wurden 121 Patienten mit ACE-Hemmer-induziertem Angioödem eingeschlossen, von denen 60 Patienten 30 mg Icatibant subkutan und 58 Patienten ein Placebo erhielten (Sinert et al., 2017). Auch in dieser Studie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem Placebo und Icatibant festgestellt.

Zusammenfassend könnte die therapeutische Wirksamkeit von Icatibant im ACE-Hemmer-induzierten Angioödem in der AMACE-Studie als eher zufälliges Ergebnis betrachtet werden. Wäre Icatibant andererseits unwirksam, würde dies bedeuten, dass das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem möglicherweise nicht durch die Überaktivierung von B2 verursacht wird. Jedoch ist Icatibant für die Behandlung von hereditärem Angioödem zugelassen, das durch Bradykinin verursacht wird (Cicardi et al., 2010). Darüber hinaus widersprechen diese Ansichten den nachfolgenden Ergebnissen der Studie von Straka et al. bei Patienten mit ACE-Hemmer-induziertem Angioödem (Hubers et al., 2018; Straka et al., 2017). Die Autoren berichteten, dass bei Patienten mit Angioödem die Plasmaspiegel von Bradykinin und das Verhältnis der Plasmaspiegel von Bradykinin zum ACE-Abbauprodukt Bradykinin1–5 erhöht waren, während die Plasmakonzentration von Bradykinin1-5 selbst mehr oder weniger konstant blieb. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur frühere Berichte, die nahelegen, dass die Plasmaspiegel von Bradykinin bei ACE-Hemmer-induziertem Angioödem erhöht sind (Nussberger et al., 2002), sie deuten auch darauf hin, dass der Abbau von Bradykinin reduziert ist, was auf den verbleibenden Effekt von ACE-Hemmern zum Zeitpunkt der Blutentnahme zurückgeführt werden kann. Schließlich konnte keine erhöhte Synthese von Bradykinin aus HMWK gefunden werden. Dementsprechend kann das Fehlen der klinischen Wirksamkeit von Icatibant zur Behandlung von ACE-Hemmer-induziertem Angioödem in den oben beschriebenen zwei randomisierten kontrollierten Studien (Sinert et al., 2017; Straka et al., 2017) wahrscheinlich nicht einem möglicherweise falschen pathophysiologischen Ansatz zugeschrieben werden. Wahrscheinlichere Gründe wären zwei andere wichtige Unterschiede zwischen diesen beiden Studien und AMACE, nämlich (1) das deutlich längere Zeitintervall zwischen dem Beginn der Symptome und der Behandlung mit dem

Studienmedikament und (2) die Behandlung mit Icatibant zusätzlich zu Glukokortikoiden und H1-Antihistaminika (Hahn et al., 2023).

Die klinische Erfahrung in der Behandlung von akutem HAE hat gezeigt, dass eine bessere und schnellere Reaktion erzielt wird, wenn die Pharmakotherapie früh nach dem Beginn der Symptome eingeleitet wird (Longhurst & Cicardi, 2012) und dies könnte auch bei ACE-Hemmer-induziertem Angioödem der Fall sein. Einer der zugrunde liegenden Gründe könnte die zeitabhängige Bildung eines interstitiellen, wasserfängenden Fibrinnetzes sein. Glukokortikoide und Antihistaminika wurden nie auf ihre Wirksamkeit bei nicht-allergischem Angioödem getestet und gelten im Allgemeinen als unwirksam (Agostoni et al., 1999). Andererseits führt die Aktivierung von B2 zur Bildung von Prostaglandinen durch Cyclooxygenasen, die Prostaglandin H2 erzeugen, den Vorläufer von Prostaglandinsynthasen (Busse & Fleming, 2003). Dementsprechend schwächt die unspezifische Hemmung von Cyclooxygenasen durch Ibuprofen die durch intradermale Injektion von Bradykinin-induzierte Plasmaextravasation ab (Gholamreza-Fahimi et al., 2020) und eine weitere Studie legt die Beteiligung der Phospholipase A2 α und der Cyclooxygenase-1-abhängigen Bildung von Prostacyclin nahe (Krybus et al., 2022). Glukokortikoide können Phospholipase A2 über die Induktion von Annexin A1 blockieren und damit die Freisetzung von Arachidonsäure, dem Ausgangsprodukt der Prostaglandinsynthese, hemmen (Yang et al., 2013). Es wurde auch beschrieben, dass Glukokortikoide die Expression von ACE induzieren (Fishel et al., 1995) und dieser Effekt könnte auch bei ACE-Hemmer-induziertem Angioödem nützlich sein. Ebenso zeigt eine Fallstudie zum laryngealen Knorpelangioödem, das mit der Verwendung von Lisinopril assoziiert war, eine vollständige Regression nach intravenöser Therapie mit Diphenhydramin und Methylprednisolon (Shiber, 2005). Schließlich deuten einige klinische Daten darauf hin, dass ACE-Hemmer-induziertes Angioödem mit entzündlichen Reaktionen verbunden ist. In einer Studie waren die Plasmakonzentrationen von C-reaktivem Protein in der akuten Phase von 25 Fällen im Vergleich zu 18 Fällen mit Angioödem unbekannter Herkunft um das 7,3-Fache erhöht (43,2 mg/l gegenüber 5,9 mg/l) (Bas et al., 2005). Ebenso berichtete eine 14 Jahre später veröffentlichte retrospektive Studie über abnorm erhöhte CRP-Spiegel bei 50 von 73 Patienten in der akuten Phase, wobei 18 Patienten Werte von > 15–60 mg/l und acht Patienten Werte von > 60 mg/l aufwiesen (Pfaue et al., 2019).

Es ist durchaus denkbar, dass die gleichzeitige Verabreichung von Glukokortikoiden in den beiden oben beschriebenen randomisierten Studien die Wirksamkeit von Icatibant gemindert hat. Ähnlich zeigten weder Ecallantid noch C1-INH eine klinisch signifikante Wirkung bei Patienten mit durch ACE-Hemmer induziertem Angioödem, die zuvor mit Glukokortikoiden behandelt wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der drei randomisierten klinischen Studien mit Icatibant bei ACE-Hemmer-induziertem Angioödem bedauerlich erscheinen mögen, sie könnten jedoch den Weg für eine fundiertere Etablierung der Notfallbehandlung von nicht-allergischem Angioödem mit hochdosierten Glukokortikoiden wie 500 mg Prednisolon als „Standardbehandlung“ ebnen (Hahn et al., 2023).

1.2 Das Kallikrein-Kinin-System (KKS)

Das KKS ist eine Kaskade von proteolytischen Enzymen, die vasoaktive Peptide freisetzen. Plasma-Kallikrein spaltet humanes hochmolekulares Kininogen und setzt Bradykinin frei. Bradykinin stimuliert Beta-2-adrenerge-Rezeptoren, die zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin führen (Marceau & Regoli, 2004; Meotti et al., 2012). Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin führt zu einer lokalen Vasodilatation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität, die zur Entwicklung eines Angioödems führt (Shariat-Madar et al., 2006). Das KKS antagonisiert in seiner vaskulären Wirkung das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Schmaier, 2002). KKS und RAAS sind durch das Angiotensin Converting Enzym (ACE) gekoppelt. Das ACE baut Bradykinin im KKS ab und synthetisiert Angiotensin II aus Angiotensin I im RAAS (Douglas et al., 2014).

Eine weitere Kaskade von proteolytischen Enzymen ist das Komplementsystem. Sobald es aktiviert ist, produziert das Komplementsystem Anaphylatoxine (C3a, C4a und C5a) und den Membranangriffskomplex. Anaphylatoxine und Bradykinin haben einen ähnlichen Wirkmechanismus. Sie erhöhen die lokale Gefäßdurchlässigkeit und bewirken eine Gefäßerweiterung. Der Membranangriffskomplex führt auch zur Zellyse (Holt et al., 2017; Khan et al., 2013; Nesargikar et al., 2012).

Das KKS ist auch über den C1-Inhibitor (C1-INH) an das Komplementsystem gekoppelt. C1-INH ist eine Serinprotease, die das KKS über die Inaktivierung von Faktor XIIa und Kallikrein hemmt und das Komplementsystem über die Inaktivierung von C1r und

C1s des klassischen Weges hemmt (Bossi et al., 2011; Kolte et al., 2011; Schoenfeld et al., 2016). Das Zusammenspiel von KKS, RAAS und Komplementsystem bei der Entstehung von Angioödemem ist in **Abbildung 3** dargestellt.

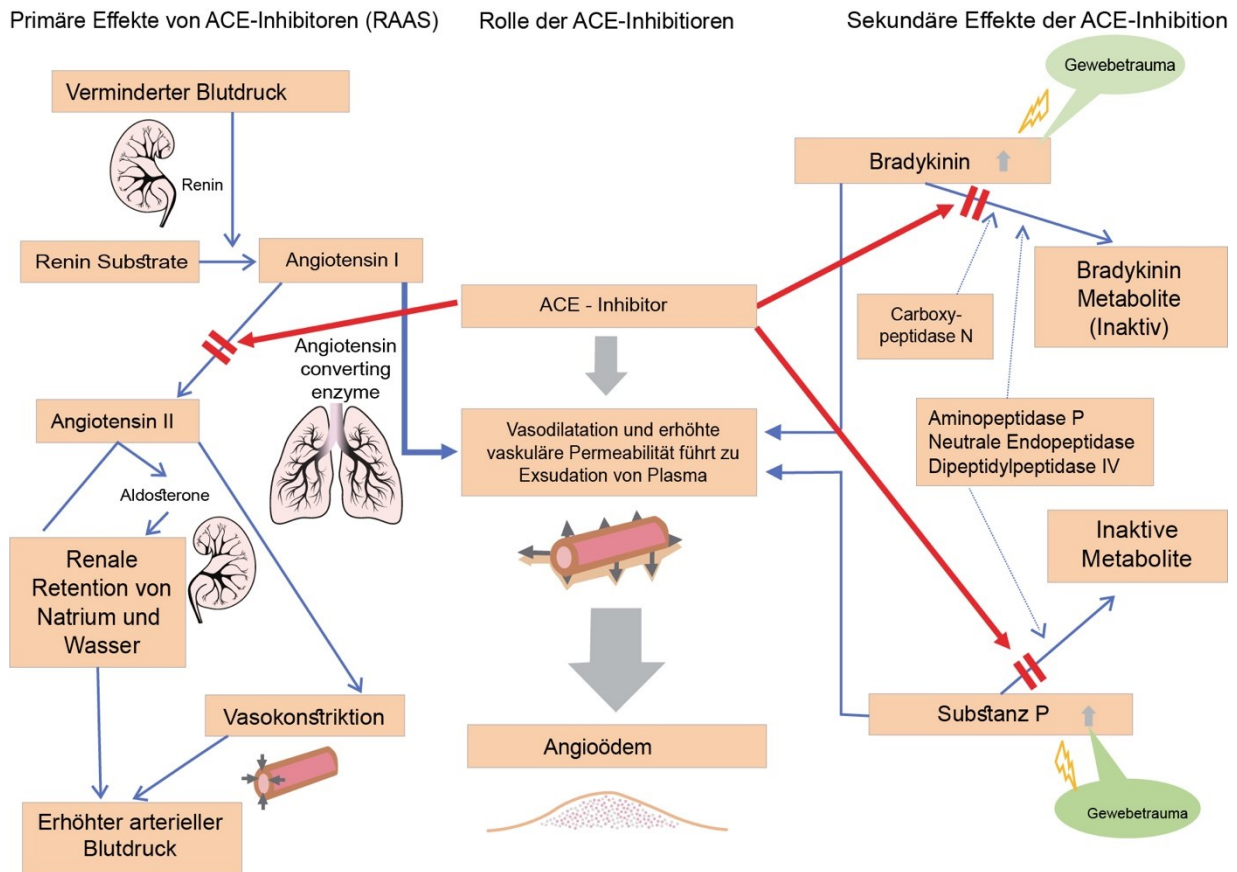


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mechanismen der Angioödembildung aufgrund der pharmakologischen Hemmung des Angiotensin Converting Enzyms (ACE).

Auf der linken Seite ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die blutdrucksenkende Wirkung der ACE-Hemmung dargestellt. ACE ist das Hauptenzym, das die gefäßaktiven Substanzen Bradykinin und Substanz P abbaut. Auf der rechten Seite der Abbildung ist dargestellt, wie andere Enzyme (gestrichelte Linien) den Prozess des Abbaus von Bradykinin und Substanz P während der ACE-Hemmung übernehmen. Die Hemmung oder Fehlfunktion eines dieser Enzyme führt zu einer lokalen Anhäufung von Bradykinin und Substanz P und damit zu einer erhöhten Kapillardurchlässigkeit und der Neigung zur Bildung eines Angioödems, wie in der mittleren Abbildung dargestellt. Ein Gewebetrauma kann die Freisetzung von Bradykinin und Substanz P verursachen, was wiederum das Risiko eines Angioödems erhöhen kann (Bas et al., 2007; Rasmussen & Bygum, 2013).

Abbildung modifiziert aus (Rasmussen et al., 2014).

1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist einer der stärksten kardiovaskulären Regulatoren und ein wichtiges Ziel für therapeutische Medikamente. Von der Entdeckung des Renins vor 120 Jahren (Tigerstedt & Bergman, 1898) bis vor 30 Jahren wurde nur ein Peptid als aktiv in diesem System angesehen: Angiotensin II (ANG II). Es wurde gezeigt, dass es durch den sukzessiven Abbau von Angiotensinogen

durch die Enzyme Renin und Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) mit ANG I als Zwischenprodukt gebildet wird und mit einem Rezeptor interagiert, der heute als ANG-II-Typ-1-Rezeptor (AT1R) bezeichnet wird. Physiologisch gesehen führt die Aktivierung des AT1R durch ANG II zu einer Vasokonstriktion, Wasseraufnahme und Na⁺-Retention. Pathophysiologisch wird die Aktivierung des ACE/ANG II/AT1R-Signalwegs mit oxidativem Stress, Hypertrophie, Fibrose und Entzündungen in Verbindung gebracht. Diese Sichtweise des RAAS begann sich zu ändern, als Santos et al. 1988 - die Bildung von ANG-(1-7) aus ANG I über einen ACE-unabhängigen Weg entdeckten und Schiavone et al. die vasopressinfreisetzende Aktivität dieses Heptapeptids in neuronalen Gewebeexplantaten zeigten (Santos et al., 1988; Schiavone et al., 1988). Ein Jahr später wurden die ersten In-vivo-Wirkungen von ANG-(1-7) beschrieben (Campagnole-Santos et al., 1989). Etwa zur gleichen Zeit wurde ein zweiter Rezeptor für ANG II (der ANG-II-Typ-2-Rezeptor [AT2R]) entdeckt (Chiu et al., 1989; Whitebread et al., 1989). In den folgenden 30 Jahren wurden die physiologischen Funktionen dieser beiden alternativen Wege des RAAS eingehend untersucht und es konnte gezeigt werden, dass ANG-(1-7) über seinen Rezeptor Mas sowie ANG II über AT2R dem klassischen RAAS entgegenwirken und zu Vasodilatation, Entzündungshemmung, Antifibrose und Antiapoptose führen, was sich bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen positiv auswirkt (Chappell, 2016; Santos et al., 2003; Saravi et al., 2021). Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der relativen Aktivitäten der RAAS-Achsen in einem Gewebe spielen die lokalen Spiegel des Enzyms ACE2, das ANG II in ANG-(1-7) umwandelt (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). Es war eine logische Konsequenz aus diesen Erkenntnissen, dass Verbindungen zur Aktivierung der protektiven Achse des RAAS entwickelt wurden, die derzeit klinisch untersucht werden (Bader et al., 2012). In **Abbildung 4** sind die Komponenten des RAAS und deren Wirkung sowie die Interaktion mit dem Abbau von Bradykinin dargestellt.

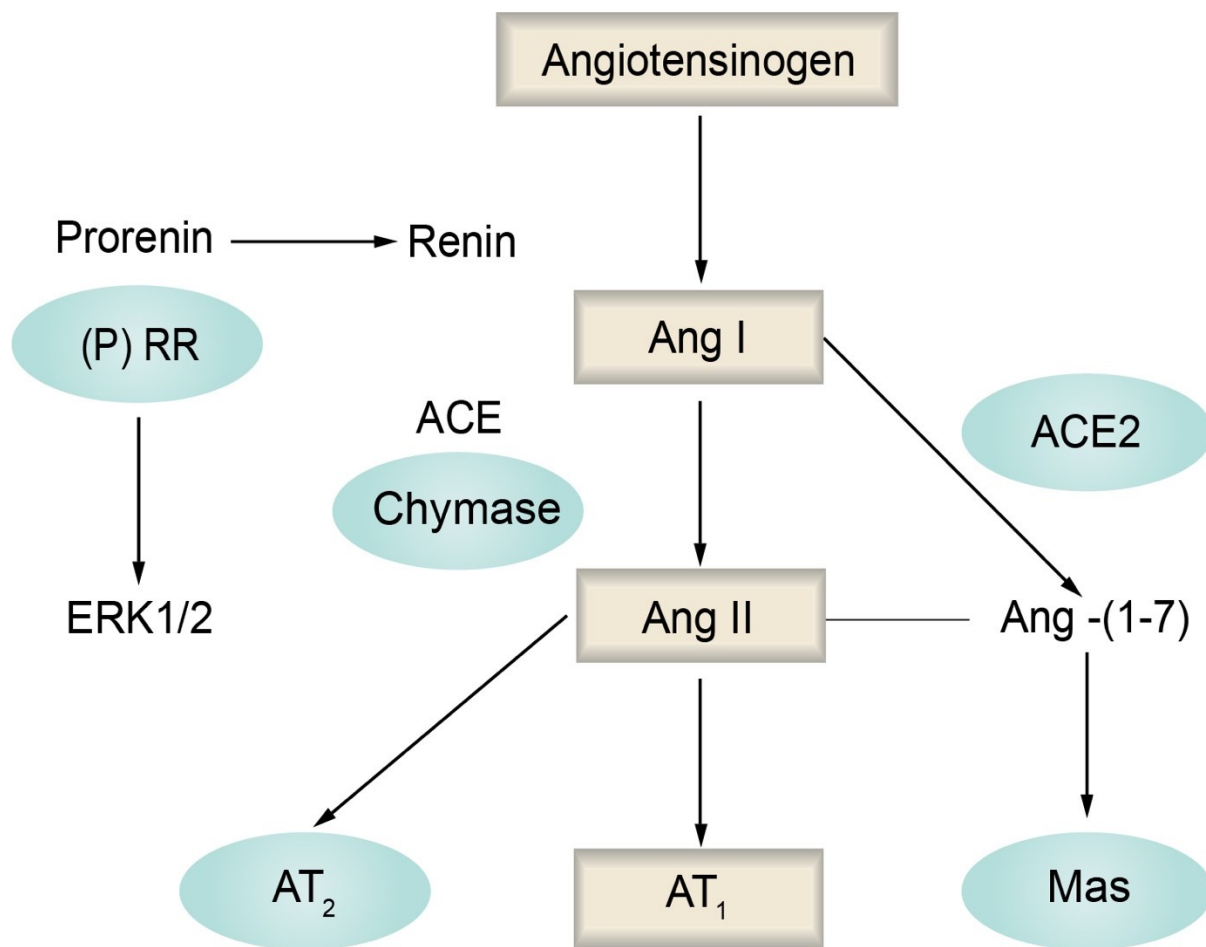


Abbildung 4: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Angiotensinogen ist eine Vorstufe von Angiotensin, das in der Leber produziert wird. Renin, ein Enzym, das von den juxtaglomerulären Zellen der Niere produziert wird, katalysiert den ersten Schritt im Aktivierungsweg von Angiotensinogen zu Angiotensin I. ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme), das hauptsächlich von der Lunge und der Niere produziert wird, spielt eine zentrale Rolle, indem es Angiotensin I zu Angiotensin II hydrolysiert. Dieses Produkt interagiert mit den Angiotensin-II-Rezeptoren und führt zu einer starken Gefäßverengung, zur Freisetzung von Aldosteron durch die Nebennierenrinde, zur Ausschüttung von ADH (antidiuretisches Hormon) durch die Hypophyse, zur Natrium- und Flüssigkeitsretention in den Nieren, zur Übersteuerung des Sympathikus und zu Durst. Es gibt zwei verschiedene Subtypen von Zelloberflächenrezeptoren, die Angiotensinrezeptoren Typ 1 und 2 (AT₁ und AT₂). Angiotensin II kann von ACE2 zu Ang-1-7 umgewandelt werden und Ang-1-7 ist der Agonist am Mas-Rezeptor (Abadir, 2011).

Abbildung modifiziert aus (Danser & Roks, 2012)).

1.4 Die endotheliale Permeabilität

1.4.1 Physiologie

Das vaskuläre Endothel, welches die innerste Auskleidung aller Blutgefäße bildet, hat die lebenswichtige Aufgabe, das darunter liegende Gewebe mit Nährstoffen zu versorgen und den onkotischen Druck des Gewebes aufrechtzuerhalten (Dudek & Garcia, 2001). Die Aufrechterhaltung der großenselektiven Siebeigenschaft des Endothels ist für mehrere physiologische Funktionen von entscheidender Bedeutung, darunter die

normale Gewebe-Flüssigkeits-Homöostase, die Angiogenese, der Gefäßtonus und die Wirtsabwehr (Mehta & Malik, 2006). Das Endothel ist für Moleküle mit einem Durchmesser von 0,1 nm (Natriumionen) bis 11,5 nm (Immunglobulin G [IgG]) durchlässig (Mehta & Malik, 2006; Vogel et al., 2012). Interessanterweise korrelierte die Siebeigenschaft des Endothels linear mit Molekülradien von 0,1 nm bis 3,6 nm, wurde aber oberhalb von 3,6 nm unabhängig vom Molekülradius (Mehta & Malik, 2006). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden zwei endotheliale Transportmechanismen definiert (Vogel et al., 2012). Der Transport von Makromolekülen, die größer als 3 nm sind, wie Albumin, IgG und andere Makromoleküle, erfolgt über den transzellulären Weg, der auch als Transzytose oder vesikulärer Transport bezeichnet wird (Komarova & Malik, 2010; Vogel et al., 2012). Moleküle, die kleiner als 3 nm sind, wie z. B. Glukose, Wasser und Ionen, können über den parazellulären Weg durch die interendothelialen Verbindungsstellen (IEJs) transportiert werden (Mehta & Malik, 2006; Predescu et al., 2001). Sowohl der transzelluläre als auch der parazelluläre Weg arbeiten zusammen, um den Gewebsdruck aufrechtzuerhalten und dadurch die endotheliale Barriere zu bewahren (Vogel et al., 2012).

Caveolae, ein kolbenförmiges Vesikel, das aus mehreren Caveolinen-1 zusammen mit anderen Proteinen wie Dynamin und Intersectin besteht, bildet den transzellulären Weg (Mehta & Malik, 2006). Der parazelluläre Weg wird durch eine komplexe Interaktion verschiedener Junctionsproteine und Aktomyosin-Motoren reguliert (Komarova & Malik, 2010; Machleidt et al., 2000). In einem ungestörten Endothel öffnen sich die IEJs dynamisch, um den Durchgang kleiner Moleküle und Entzündungszellen für die Gewebekomöostase und die Immunüberwachung zu ermöglichen (Komarova & Malik, 2010; Mehta & Malik, 2006). Entzündungsfördernde Agonisten wie Thrombin, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und plättchenaktivierender Faktor (Bates & Harper, 2002) desorganisieren die IEJs, indem sie an ihre Rezeptoren binden, was zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität führt.

Endothelzellen entstehen aus embryonalen Vorläuferzellen, den so genannten Hämagioblasten (Aird, 2012). Die Permeabilität von Endothelzellen unter basalen Bedingungen und als Reaktion auf ödemagene Substanzen variiert jedoch in verschiedenen Gefäßbetten erheblich (Mehta & Malik, 2006). Die Gefäßbetten der Koronar-, Lungen-, Milz- und Skelettmuskulatur bestehen aus kontinuierlichen, nicht fenestrierten Endothelzellen, die eine restriktive Barriere bilden (Aird, 2007). Organe wie Leber, Niere und

Lymphgefäße werden aus diskontinuierlichen und hochpermeablen Endothelmonolayern gebildet (Mehta & Malik, 2006). Außerdem werden segmentale Unterschiede zwischen der Permeabilität der endothelialen Barriere auf der Ebene von Zellkulturen und intakten Gefäßen desselben Gefäßbettes beobachtet (Aird, 2007). Die Messung des Koeffizienten der vaskulären Permeabilität über das Endothel in isolierten, perfundierten Lungenpräparaten unter basalen Bedingungen bei Versuchstieren zeigte eine Abstufung der Permeabilität über das mikrovaskuläre Bett, wobei der mikrovaskuläre Bereich etwa 42 %, der arterielle Bereich etwa 19 % und der venöse Bereich etwa 37 % ausmachte (Parker et al., 2006), was darauf hindeutet, dass das arterielle System restriktiver war als die venöse oder kapillare Auskleidung. In den pulmonalen Mikrogefäßen bildeten die Endothelzellen eine Monoschicht, die etwa viermal weniger durchlässig für Albumin war als die konfluente Monoschicht der Zellen aus dem venösen oder arteriellen Bereich (Mehta & Malik, 2006). Außerdem war der transendotheliale elektrische Widerstand, der ein Maß für die interendotheliale Adhäsion in Echtzeit ist, bei Zellen, die aus größeren Arterien isoliert wurden, geringer als bei mikrovaskulären Endothelzellen (Mehta & Malik, 2006).

Studien haben gezeigt, dass die Beschaffenheit von IEJs, extrazellulärer Matrix (ECM) und Zytoskelettproteinen zur segmentalen Variabilität des Endothels beitragen kann (Aird, 2007, 2012; Stevens et al., 2008). Das arterielle Segment weist etwa 18-mal mehr Occludin, eine Komponente der Tight Junctions (TJs), auf als sein venöses Gegenstück, wodurch die arterielle Endothelbarriere dichter ist als die venöse Barriere (Mehta & Malik, 2006). Außerdem wird Occludin in Endothelzellen des Gehirns stärker exprimiert als in jedem anderen Organ (Bolton et al., 1998; Mehta & Malik, 2006). Mikrovaskuläre Endothelzellen exprimieren Kollagen 4 α 1, Kollagen 4 α 2 und Laminin in ihrer ECM, während Kollagen 5 α 1 und Kollagen 5 α 2 eher in makrovaskulären Endothelien exprimiert werden (Chi et al., 2003; Mehta & Malik, 2006). Außerdem gibt es eine Fülle von Myosin-Leichtketten-Kinase (MYLK; Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, welche die regulatorische leichte Kette von Myosin II phosphoryliert), LIM-Kinase (aktinbindende Kinasen, die Mitglieder der Aktin depolymerisierenden Faktor/Cofilin-Familie von aktinbindenden Proteinen phosphorylieren), Rho-GTPasen und Myosin-Motor-Zytoskelett in mikrovaskulären Zellen (Dudek & Garcia, 2001; Mehta & Malik, 2006). Mikrovaskuläre Endothelzellen weisen auch eine höhere Dichte an Caveolae auf. Neben den oben erwähnten intrinsischen Mechanismen wurde auch gezeigt,

dass extrinsische Mechanismen, wie z. B. Scherstress durch linearen bzw. pulsierenden Blutfluss, die Permeabilitätsunterschiede zwischen mikrovaskulären und makrovaskulären Endothelzellen regulieren. Es wurde gezeigt, dass Scherstress die intrazelluläre Ca^{2+} und Inositoltriphosphat-(IP3)-Generierung erhöht und die Aktivitäten kleiner GTPasen wie Rac und RhoA sowie die Reorganisation von Aktinfasern induziert (Malek et al., 1999; Mehta & Malik, 2006). Somit können gut organisierte transzelluläre und parazelluläre Pfade durch Ausgleich der extrinsischen Flüssigkeitsdynamik die endothelialen Barrierephänomene beeinflussen. IEJs bestehen aus Adherens Junctions (AJs), TJs und Connexinen (**Abbildung 5**) (Mehta & Malik, 2006). IEJs sind von einer zusätzlichen Schicht faseriger Matrix bedeckt, die aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden besteht und als Glykokalyx bezeichnet wird (Mehta & Malik, 2006; Vogel et al., 2012).

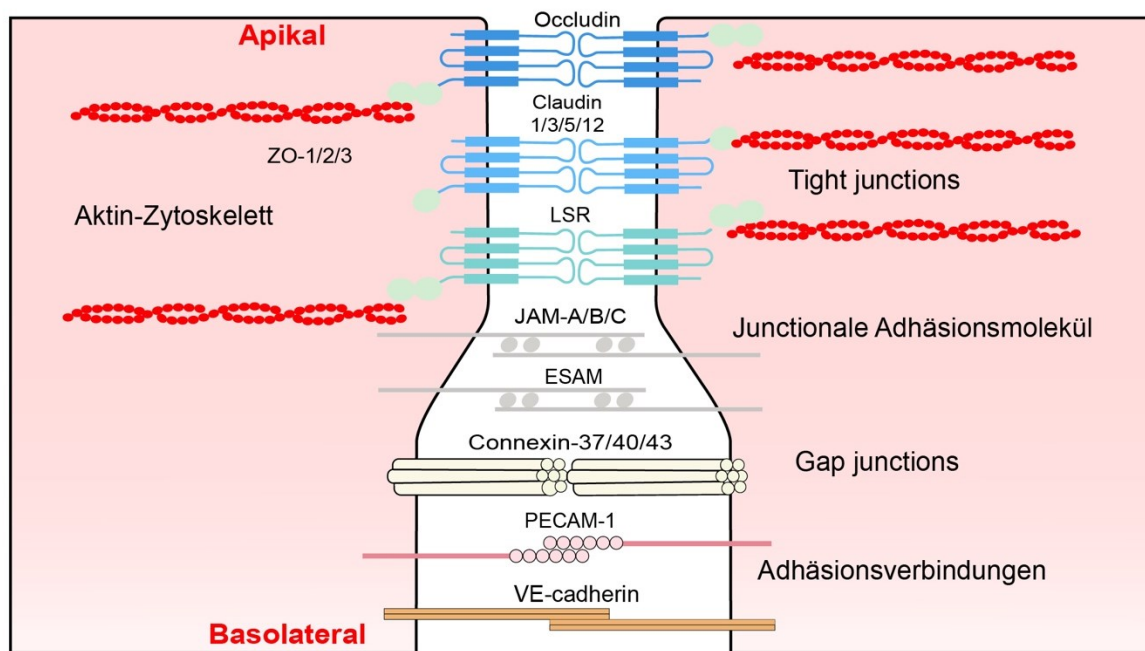


Abbildung 5: Darstellung der Interendothelial Junctions (IEJs)

Am nächsten an der apikalen Membran befinden sich die Tight Junction-Proteine, welche die parazelluläre Diffusion von Ionen und gelösten Stoffen begrenzen. Zonula occludens (ZO) binden an intrazellulären Domänen von Claudinen und Occludin und an das Aktinzytoskelett, wodurch die strukturelle Integrität der engen Verbindungsstelle gewährleistet wird. Gap Junctions bilden Hemikanäle zwischen gegenüberliegenden Endothelzellmembranen und tragen so zur interzellulären Kommunikation bei. Am nächsten an der basolateralen Membran befinden sich die Adherens Junction-Proteine. PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ESAM: Endothelial cell-selective adhesion molecule; VE-cadherin: vascular endothelial cadherin; JAM: junctional adhesion molecule.

Abbildung modifiziert aus (Greene et al., 2019).

1.4.2 Mediatoren der erhöhten Permeabilität

Es ist erwiesen, dass Histamin, Thrombin, Bradykinin, VEGF und Angiopoeitin-2 (Ang2) die AJs zerstören und dadurch die endotheliale Permeabilität erhöhen. Thrombin unterbricht AJs durch Bindung an seine Rezeptoren, PAR-1, auf Endothelzellen (Tiruppathi et al., 2002). Es induziert die Proteolyse der extrazellulären Verlängerung von PAR-1 (zwischen Arg 41 und Ser 42) und erzeugt PAR1-Ligand, der durch Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des heptahelischen PAR1 nachgeschaltete Signalprozesse auslöst (Coughlin, 2000). Drei weitere Isoformen von PARs, PAR2, PAR3 und PAR4, wurden in Endothelzellen identifiziert, von denen nur PAR3 und PAR4 durch Thrombin aktiviert werden (Ishihara et al., 1997). PAR-2 wird durch Trypsinase aktiviert (Mirza et al., 1996). Die Rolle der anderen PARs bei der Vermittlung von Erhöhungen der Permeabilität der Endothelbarriere ist noch nicht vollständig geklärt, aber diese PARs arbeiten möglicherweise mit PAR1 zusammen, um Veränderungen der Barrierefunktion zu erleichtern (Wells et al., 2002). Eine Studie zeigte, dass PAR2-Aktivität für die Umkehrung der PAR1-induzierten vaskulären Leckage nach einer Sepsis erforderlich ist (Kaneider et al., 2007). Ebenso wurde gezeigt, dass PAR2-Agonismus nach einer LPS-induzierten Lungenverletzung bei Nagetieren entzündungshemmende Wirkungen hat (Klarenbach et al., 2003). Obwohl also PAR1 die Thrombin-induzierte Erhöhung der vaskulären Permeabilität der Lunge vermittelt, muss die Rolle anderer PARs bei der Verstärkung oder Unterdrückung der Thrombin-induzierten Erhöhung der endothelialen Permeabilität noch verstanden werden. Die Rolle von PAR3 und PAR4 bei der Vermittlung eines Anstiegs der Endothelpermeabilität ist nicht geklärt, aber es gibt Hinweise darauf, dass sie möglicherweise mit PAR1 zusammenwirken, um die Endothelpermeabilität zu erhöhen. PAR1 führt zu einem vorübergehenden Anstieg der Gefäßpermeabilität, auf den eine ebenso schnelle Wiederherstellung der Barrierefunktion folgt. PAR1 koppelt an die heterotrimeren G-Proteine der Gq-, G12/13-, Gi- und Gs-Familien (Barr et al., 1997; Hung et al., 1992). Studien zeigten, dass alle G-Proteine die Erhöhung der Permeabilität der Endothelbarriere vermitteln. Es wurde allgemein angenommen, dass Thrombin die endotheliale Permeabilität durch die Aktivierung von MYLK und RhoA über die Gαq- und Gα12/13-Untereinheiten erhöht. Gas verbessert jedoch die Barrierefunktion durch die Erzeugung von cAMP (Vogel et al., 2000). Darüber hinaus haben sich dissoziierte Gβγ-Untereinheiten als barriereprotektiv erwiesen, indem sie die FAK-Aktivität induzieren (Knezevic et al.,

2009). Studien deuten auch darauf hin, dass die Spingosinkinase 1 die AJs verstärkt und die Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch Thrombin durch einen parakrinen Mechanismus umkehrt, der die Erzeugung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) beinhaltet (Tauseef et al., 2008).

Histamin erhöht die endotheliale Permeabilität durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums und eine MYLK-Aktivierung, vermittelt aber auch eine Src-abhängige Phosphorylierung von AJ- und TJ-Proteinen. Umgekehrt führt Bradykinin, das über B1- und B2-Rezeptoren wirkt, zu einer eNOS/iNOS-abhängigen Erhöhung der Permeabilität, obwohl unklar ist, ob die Nitrosylierung von Junctionsproteinen zu einer Destabilisierung der Barriere führt (Chavez et al., 2011).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zirkuliert in hohen Konzentrationen im Blut und sendet Signale über den G-gekoppelten Proteinrezeptor S1P-Rezeptoren (S1PR), einschließlich S1PR1, S1PR2 und S1PR3 (Thennes & Mehta, 2012). S1PR1 wird vorwiegend in Endothelzellen gefunden und stärkt nachweislich die Integrität der Endothelbarriere. Eine Arbeitsgruppe hat eine barrierezerstörende Rolle von S1PR3 nachgewiesen (Sun et al., 2013). Sie zeigten, dass menschliche Lungengefäß-Endothelzellen (ECs) S1PR3 in Mikropartikeln nach Aktivierung mit LPS oder niedermolekularem Hyaluronan ausscheiden. Die Exposition normaler Lungen-ECs gegenüber S1PR3-haltigen Mikropartikeln führte zu einer signifikanten Verringerung des transendothelialen Widerstands, was mit einer erhöhten Permeabilität einhergeht. Diese Veränderungen wurden durch RNAi-vermittelte Abreicherung von S1PR3 in ECs abgeschwächt. Interessanterweise wurden erhöhte S1PR3-Plasmakonzentrationen mit der Mortalität bei Sepsis und akutem Lungenversagen in Verbindung gebracht, was darauf hindeutet, dass S1PR3 ein neuartiger Biomarker ist, der mit der Schwere der Erkrankung und dem Outcome in Verbindung steht (Sun et al., 2013).

Langfristige Mediatoren der Permeabilität wie Endotoxin, LPS und Tumornekrosefaktor führen zur transkriptionellen Expression von Zytokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen durch NF- κ B (Mehta & Malik, 2006; Vandenbroucke et al., 2008). Die Aktivierung der ICAM-1-Zelloberfläche führt zur Bildung von RhoA-gesteuerten Stressfasern sowie zu einer erhöhten NO-Produktion, welche die erhöhte Permeabilität weiter verstärkt. Studien haben gezeigt, dass die ECs eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion der Lunge durch LPS spielen (Tauseef et al., 2012). LPS bindet den

endothelialen TLR4 über CD14, ein membrangebundenes Glycosylphosphatidyl-Inositol-verankertes Protein. TLR4 wiederum aktiviert Signalwege, die für die Bildung proinflammatorischer Zytokine über MyD 88 verantwortlich sind, das wiederum die NF- κ B-Signalisierung aktiviert und die proinflammatorischen Zytokine produziert. Es wurde zudem gezeigt, dass TRPC6 den Ca^{2+} -Eintritt in ECs vermittelt und zwar sekundär zur TLR4-induzierten DAG-Bildung, die an der Vermittlung sowohl der Störung der Lungengefäßbarriere als auch der durch Endotoxin induzierten Entzündung beteiligt ist (Tauseef et al., 2012).

VEGF induziert die vaskuläre Permeabilität durch mehrere Mechanismen, einschließlich des AJ-Umbaus, der Induktion von Fenestrae und der Bildung von Vesikulo-Vakuolären Organellen (VVOs) (Weis & Cheresch, 2005). VEGF aktiviert gleichzeitig mehrere Signalwege, die dem VEGFR2 nachgeschaltet sind und mit der vaskulären Permeabilität in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören die PLC-abhängige intrazelluläre Kalziumfreisetzung, die Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung/Internalisierung von Junctionsproteinen, die RhoGTPase-Aktivierung, die Umstrukturierung des Zytoskeletts und eNOS-Effekte (Bates, 2010). In-vivo-Daten haben gezeigt, dass VEGF diese Effekte durch die Induktion der VE-PTP/VE-Cadherin-Dissoziation (Nottebaum et al., 2008) und die FAK-abhängige β -Catenin-Phosphorylierung vermittelt (Chen et al., 2012). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der T-Zell-spezifische Adapter TSAAd für die Src-Aktivierung und die anschließende Phosphorylierung von junctionalen Proteinen stromabwärts von VEGFR2 essentiell ist (Sun et al., 2012). Der Beitrag der eNOS-Signalwege bei der VEGFR2-Aktivierung ist nach wie vor schwer fassbar, aber neuere Daten deuten darauf hin, dass die Nitrosylierung von β -Catenin durch NO ein zusätzlicher Mechanismus zur Destabilisierung IJEs sein könnte, indem sie die Dissoziation von β -Catenin von VE-Cadherin vermittelt (Thibeault et al., 2010).

Angiopoeitin-2 (Ang-2) sensibilisiert das Endothel sowohl für Wachstumsfaktoren als auch für Entzündungsmediatoren, was die vaskuläre Destabilisierung verstärkt (Scharpfenecker et al., 2005). Obwohl sowohl Ang-1 als auch Ang-2 die Anhäufung von Tie-2 an Zell-Zell-Kontakten vermitteln, könnten eine unterschiedliche Signaltransduktion ihre gegensätzlichen Auswirkungen auf die vaskuläre Stabilität erklären. Eine Arbeitsgruppe hat auch gezeigt, dass Ang-2 durch Tie-2-Phosphorylierung (Yuan et al., 2009) als partieller Agonist der Tie-2-Signalübertragung wirkt und die Barrierefunktion nach Endothelstress verbessern kann. Die Erzeugung von Mäusen mit endothelspezifischer Deletion von Ang-2 könnte laut Ziegler et al. dazu beitragen, seine physiologische

Rolle in vivo zu untersuchen und ein besseres Verständnis der homöostatischen Funktionen von Ang-2 im Endothel zu ermöglichen (Ziegler et al., 2013). Ang2-Antikörpern hat in einem Sepsis-Model die LPS-induzierten hämodynamischen Veränderungen abgeschwächt und die Sterblichkeitsrate nach 36 Stunden von 95 % auf 61 % reduziert. Diese Daten weisen eindeutig darauf hin, dass die Ang2-vermittelte mikrovaskuläre Desintegration zum septischen Schock beiträgt und legen nahe, dass die Hemmung der Ang2/Tie2-Interaktion während der Sepsis ein potenzielles therapeutisches Ziel darstellt (Ziegler et al., 2013).

1.4.3 Stabilisierende Mediatoren

Die Wiederherstellung der Barriere ist für die Aufrechterhaltung der Permeabilität und die Resolution nach akuten Entzündungsereignissen von entscheidender Bedeutung, doch das Verständnis, wie dieser Prozess auf molekularer Ebene abläuft, ist nach wie vor schwer zu erfassen. Im Folgenden werden einige der Vermittler der Barriestabilität und ihre bekannten Wirkmechanismen erörtert.

Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels verringert die vaskuläre Leckage durch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und des Guanin-Austauschfaktors Epac. Die Epac-vermittelte Rap1-Aktivierung führt zu verstärkten junktionalen Adhäsionen und einer Reorganisation der Aktinfilamente (Cullere et al., 2005). Erkenntnisse über Rap1 deuten darauf hin, dass es eine kooperative Verbindung mit VE-Cadherin hat, da beide die Reaktionen des jeweils anderen modulieren können. Interessanterweise kann Rap1 die Ausrichtung von Krev Interaction Trapped Gene 1 (KRIT-1) auf Endothelzell-Zellverbindungen erhöhen, wodurch die Bildung von Stressfasern unterdrückt und die Barriere stabilisiert wird (KRIT-1 bindet bekanntermaßen an Rap1, eine Guanosintriphosphatase, welche die Integrität von Endothelverbindungen aufrechterhält). Somit könnten Defekte in der Rap1-Signalübertragung, die dem mutierten KRIT-1-Protein nachgeschaltet sind, den Verlust der vaskulären Integrität erklären, der bei zerebralen kavernösen Malformationen beobachtet wird (Glading et al., 2007).

In jüngerer Zeit wurde festgestellt, dass der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) eine wichtige Rolle für die AJ-Integrität spielt. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von FGF-Signalen die Expression der Phosphatase SHP2 reduziert, was zu einer erhöhten

Phosphorylierung von VE-Cadherin führt und dessen Fähigkeit, p120 Catenin zu binden, beeinträchtigt (Hatanaka et al., 2011). VE-Cadherin selbst kann die Barrierenstabilität beeinflussen, indem es Wachstumsfaktor-Signalwege hemmt, einschließlich VEGF, TGF β und PDGF, welche die Permeabilität nach angiogenen Reaktionen fördern (Dejana & Giampietro, 2012).

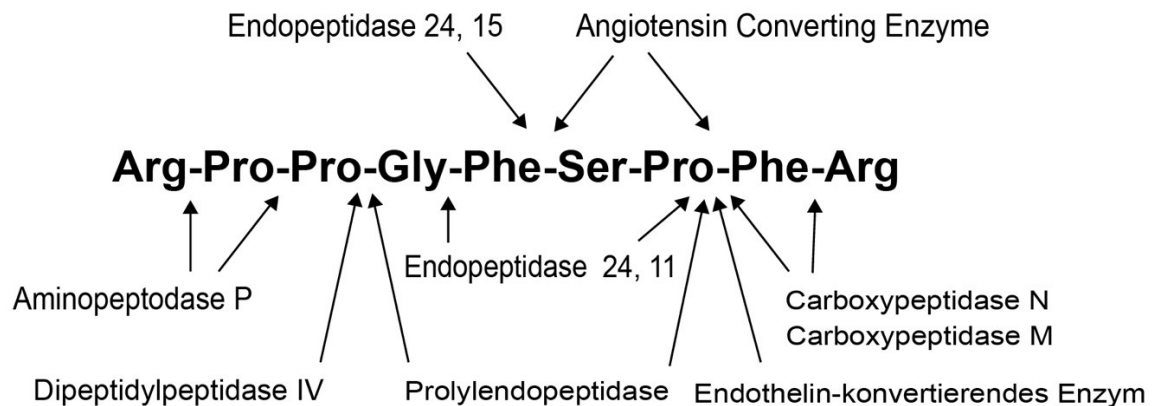
Ein weiterer zunehmend bedeutender und wirksamer barrirestabilisierender Faktor ist Sphingosin-1-phosphat (S1P). S1P vermittelt seine Wirkung auf Endothelzellen, indem es S1PR1 ligiert, um die kortikale Aktinorganisation über eine Reihe von nachgeschalteten Zielmolekülen zu induzieren, darunter Rac-1, Cortactin, FAK, Paxillin und Aktin 1 und 4 (Ramchandran et al., 2008). Die Wirkung von S1P auf die Barrirestabilität wurde in vivo nachgewiesen. Eine pharmakologische oder genetische Blockade der S1P-Signalachse führt zu einer Destabilisierung der AJs, Permeabilität und in einigen Fällen zu einer abnormen Angiogenese (Ramchandran et al., 2008).

Ang-Rezeptoren und ihre Liganden (Ang1-4) sind entscheidende Regulatoren der vaskulären Reifung und Ruhephase (Augustin et al., 2009). Eine der wichtigsten Fragen zum Verständnis der Ang-1-Signalübertragung ist, wie Ang-1 sowohl den Gefäßumbau als auch die Ruhephase steuern kann, indem es über denselben Rezeptor wirkt. Jüngste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation durch Ang-1 zu einer unterschiedlichen Lokalisierung und Signaltransduktion von Tie-2 führt, je nachdem, ob die Endothelzellen Zell-Zell-Kontakte haben oder nicht. Zellinteraktionen zwischen Endothelzellen lösen bei Ang-1-Exposition die Rekrutierung von Tie2 an Zell-Zell-Kontakte aus, was nach PKB-vermittelter eNOS-Phosphorylierung zu einer erhöhten Gefäßstabilität führt (Fukuhara et al., 2008).

1.5 Bradykinin und dessen Rezeptoren

Bradykinin (BK) und verwandte Kinine stammen von Kininogenen ab, bei denen es sich um Multidomänen-Proteine handelt, die neben der BK-Sequenz auch Domänen enthalten, die Ca²⁺ und Zelloberflächen binden können, Cysteinproteinasen hemmen und weitere Funktionen haben (Schmaier, 2004). Ein einziges menschliches Kininogen-Gen kodiert für die Produktion von hochmolekularem Kininogen (HK; 88-120 kDa) und niedermolekularem Kininogen (LK; 50-68 kDa) durch alternatives Spleißen. Zirku-

Kinine (BK-verwandte Peptide) werden durch die Spaltung von Kininogenen durch Enzyme freigesetzt, die als Kallikreine bekannt sind. Plasma-Präkallikrein ist an einer reziproken Aktivierungsreaktion mit dem Hageman-Faktor (auch bekannt als Faktor XII) und der Einleitung der Blutgerinnung beteiligt. Gewebekallikrein (hK1) gehört zu einer großen Familie von zellsekretierten Zymogenen. Die Substrate der anderen Familienmitglieder sind weitgehend unbekannt. Gewebekallikrein ist besonders in den Nieren von Menschen mit Salzangel aktiv (Margolius, 1998). Bei diesen Menschen haben die gebildeten Kinine gefäßerweiternde und natriuretische Wirkungen. Im Zusammenhang mit Entzündungen scheint das Gen, das für Gewebekallikrein kodiert, stark exprimiert zu werden (z. B. bei entzündlichen Darmerkrankungen) (Stadnicki, 2003). BK ist ein positiv geladenes Nonapeptid, das erstmals in den 1960er Jahren synthetisch hergestellt wurde. Die Primärstruktur von BK ist in **Abbildung 6** dargestellt.



Die Carboxypeptidase N wird als Kininase I und das Angiotensin-konvertierende Enzym als Kininase II bezeichnet. Die Carboxypeptidasen M und N spalten nacheinander die Aminosäuren vom Carboxy-Terminus des Peptids ab. Die Aminopeptidase P spaltet nacheinander Aminosäuren vom Amino-Terminus des Peptids ab. Angiotensin-converting enzyme ist eine Carboxy-Dipeptidase, die eine sequentielle Spaltung von Dipeptiden vom Carboxy-Terminus des Peptids bewirkt. Dipeptidylpeptidase IV spaltet Des-Arg1-Bradykinin. Zu beachten ist, dass das Angiotensin-konvertierende Enzym und Neprilysin die wichtigsten Proteasen sind, die Bradykinin spalten. Neprilysin ist eine Zink(II)-abhängige membrangebundene Metalloprotease.

Der Kininspiegel ist sehr schwer genau zu messen, zum Teil deshalb, weil das entnommene Blut alle notwendigen Komponenten enthält, um diese Peptide in vitro zu

erzeugen und zu zerstören (Blais Jr et al., 2000). So aktiviert beispielsweise der Kontakt mit Glas in Reagenzgläsern das Plasmakallikrein. Außerdem sind Kinine lokale Hormone (Autakoide), die nur in der Nähe ihres Entstehungsortes auf parakrine Weise aktiv sind, da sie in vivo über mehrere Wege sehr schnell hydrolysiert werden. Daher ist die BK-Konzentration im venösen Blut möglicherweise nicht biologisch relevant. Die besten verfügbaren Werte liegen unterhalb einer Schwellenkonzentration für biologische Aktivität (~60 pg pro ml BK im menschlichen Blut und etwas höher für immunreaktive des-Arg9-BK) und stammen von Antikörper-basierten Methoden (d. h. Enzym-Immunoassays) (Blais Jr et al., 2000).

Kinine beeinflussen Gewebe und Zellen durch Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Zwei Typen von Kininrezeptoren-B1 und -B2 sind derzeit anhand einer Reihe pharmakologischer und genetischer Kriterien vollständig definiert (Marceau et al., 1998; Regoli & Barabé, 1980). Bradykinin-B1 und -B2 sind Transmembranrezeptoren, die zur Superfamilie der rhodopsinartigen GPCR gehören (Marceau et al., 2020). In den 1970er-Jahren führten Arbeiten von Regoli und Kollegen zur Identifizierung und Charakterisierung der beiden Rezeptoren, einschließlich ihrer pharmakologischen Profile und Expressionsmuster (Regoli et al., 1977). Der B1-Rezeptor ist in gesundem Gewebe im Allgemeinen nicht vorhanden, und seine Expression wird durch Verletzungen und Entzündungen induziert (Qadri & Bader, 2018). Der B2-Rezeptor hingegen wird ubiquitär exprimiert und ist an der Vasodilatation, Osmoregulation, Kontraktion der glatten Muskulatur und Aktivierung von Nozizeptoren beteiligt (Lau et al., 2020). B1- und B2-Rezeptoren haben sich als therapeutische Ziele herauskristallisiert, da sie bei entzündlichen Erkrankungen, Vaskulopathie, Neuropathie, Adipositas, Diabetes und malignen Erkrankungen eine Rolle spielen (Marceau et al., 2020). B1- und B2-Rezeptoren können bei Krankheiten eine gegensätzliche Rolle spielen. Es wurden daher zahlreiche Agonisten und Antagonisten als Therapeutika untersucht (Lau et al., 2020). Sowohl B1- als auch B2-Rezeptoren sind in erster Linie mit der Aktivierung von Phospholipase C verbunden, die eine intrazelluläre Kalziummobilisierung durch Inositol-1,4,5-Triphosphat und weitere intrazelluläre Effekte bewirkt. Die sekundären Botenstoffe modulieren dann andere Signalprozesse (z. B. die Produktion von Stickstoffmonoxid oder Prostaglandin) (Rex et al., 2022). Die biologische Konsequenz der B1- oder B2-Rezeptor-Aktivierung hängt vom Zelltyp ab. B1- und B2-Rezeptoren können sich bei der Signalgebung gegenseitig kompensieren, wie in verschiedenen Knockout-Modellen gezeigt wurde (Duka et al., 2008; Savard et al.,

2013). Ein Beispiel ist die Koregulation des Blutdrucks (Duka et al., 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsniveaus von B1-Rezeptoren (induziert) und B2-Rezeptoren (konstitutiv) ist der B2-Rezeptor jedoch der Rezeptor, der die Kininreaktion im Körper hauptsächlich vermittelt. Dies hat einzigartige Auswirkungen auf die Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen.

Die in funktionellen oder Ligandenbindungsassays ermittelte Potenzreihenfolge der Agonisten zeigt, dass die Entfernung des carboxyterminalen Arginins für eine gute Affinität zu B1-Rezeptoren unerlässlich und für die Affinität zu B2-Rezeptoren äußerst nachteilig ist. Die einzige natürliche Kinin-Sequenz mit einer subnanomolaren Affinität für den menschlichen B1-Rezeptor ist Lys-des-Arg⁹-BK, was darauf hindeutet, dass dieser Rezeptortyp mit Gewebekallikrein zusammenarbeitet, der Isoform, die das Stammpeptid Lys-BK erzeugt. Die Des-Arg⁹-Metaboliten der Kinine stammen nicht aus dem Metabolismus der nativen Kinine durch ACE, sondern durch Arginin-Carboxypeptidasen, die kollektiv als Kininase I bezeichnet werden. Die Klassifizierung der Rezeptoren nach den Agonisten, die sie aktivieren, wurde mit Antagonisten validiert (Stewart, 2004).

Kinine sind potente (subnanomolare), kurzlebige (30 Sekunden oder weniger) Mediatoren (Marceau et al., 1998; Regoli & Barabé, 1980). Exogenes BK, das in menschliches oder tierisches Gewebe injiziert wird, erzeugt die klassischen Anzeichen einer Entzündung: Rötung, lokale Erwärmung, Schwellung und Schmerz. Die Identität der wichtigsten Zielzelltypen für Kinine erklärt dieses Profil: Die Rötung und die lokale Erwärmung werden durch die lokale endothelabhängige Vasodilatation bestimmt. Die Stimulierung der Endothelzellen führt auch zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität, die zur Exsudation von proteinreicher Flüssigkeit aus dem Blutkreislauf (Schwellung/Ödem) beiträgt. Nicht-myelinisierte afferente Neuronen besitzen ebenfalls Rezeptoren für Kinine, was die Fähigkeit dieses einfachen Peptids erklärt, direkt Schmerzen zu erzeugen und Reflexreaktionen des autonomen Nervensystems auszulösen (Pirahanchi & Sharma, 2022). Es ist nicht klar, ob Leukozyten wichtige Zielzellen für Kinine sind, insbesondere beim Menschen. BK bewirkt die Kontraktion verschiedener Arten von glatten Muskelzellen, darunter kleinen Bronchien und des Dickdarms und der Harnblase. Verschiedene andere Zelltypen werden mehr oder weniger von Kininen beeinflusst (wie Enterozyten, Fibroblasten, quergestreifte Muskeln und Kardiomyozyten), aber die medizinische Bedeutung dieser Befunde ist noch nicht ausreichend geklärt (Bennett, 2007).

Die meisten zirkulatorischen Wirkungen von BK-verwandten Peptiden werden durch die Stimulierung von Endothelzellen bestimmt, aus denen unter dem Einfluss von Ca^{2+} -sensitiven enzymatischen Kaskaden sekundäre Mediatoren freigesetzt werden, welche die glatte Gefäßmuskulatur beeinflussen (Marceau et al., 1998; Regoli & Barabé, 1980). Die BK-induzierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus den Endothelzellen, die mit einem anschließenden Anstieg von zyklischem GMP in den glatten Gefäßmuskelzellen verbunden ist, wurde in einer Reihe von Versuchen dokumentiert (Marceau et al., 1998; Regoli & Barabé, 1980). Prostaglandin I₂ (Prostazyklin) ist ein weiterer sekundärer Mediator, der häufig als Folge der Kininwirkung aus dem Endothel freigesetzt wird und die Produktion von zyklischem AMP in den Zellen der glatten Muskulatur bestimmt. Es werden auch andere Mechanismen der endothelabhängigen Vasorelaxation vermutet, wie z. B. die endothelabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen. Dies ist wahrscheinlich auch der Hauptmechanismus, der an der BK-induzierten Relaxation isolierter menschlicher Koronararteriolen beteiligt ist (Batenburg et al., 2004).

Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass B1-Rezeptoren in normalem Gewebe in der Regel nicht vorhanden sind, aber nach einigen Arten von Verletzungen schnell induziert werden (Christiansen, 2002; Marceau et al., 1998; Passos, 2004; Souza, 2004). Die Expression des entsprechenden Gens wird nachweislich durch Zytokine und einige zelluläre, stressbedingte mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Wege und Transkriptionsfaktoren wie den Nuklearfaktor- κB (NF- κB) gesteuert. Beispielsweise werden B1-Rezeptoren in der Immunpathologie und während einer Sepsis hochreguliert, sind aber in physiologischen Situationen nicht auffällig, mit möglichen Ausnahmen in Verbindung mit bestimmten Geweben und Tierarten (Bennett, 2007). Die zeitabhängige Induktion des B1-Rezeptors könnte als Mechanismus zur Verstärkung der Gewebewirkung von Kininen angesehen werden, da dieser Rezeptortyp im Allgemeinen in denselben Zelltypen wie der B2-Rezeptor exprimiert wird, ähnliche Signalwege rekrutiert, aber weniger empfindlich auf Desensibilisierung reagiert und biologische Aktivität auf relativ häufig vorkommende Metaboliten überträgt. Die Resistenz des B1-Rezeptors gegenüber einer Desensibilisierung könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieses Molekül im Gegensatz zum B2-Rezeptor nach einer Agonistenstimulation weder phosphoryliert noch internalisiert wird (Blaukat, 1999). Ein fluoreszierendes Proteinkonjugat des B2-Rezeptors ermöglichte die Visualisierung der agonistisch induzierten Endozy-

tose der Liganden-Rezeptor-Komplexe, auf die ein umfassendes Recycling der Rezeptoren an der Zelloberfläche folgte (Bachvarov, 2001). Lys-des-Arg⁹-BK induziert eine Kondensation von fluoreszierenden B1-Rezeptoren an der Zelloberfläche zu Lipid-Raft-verwandten Aggregaten, die mit der Plasmamembran assoziiert bleiben (Sabourin et al., 2002). Die Bedeutung dieser neuen Form der Anpassung ist nicht ganz klar.

In Bezug auf den Metabolismus sind mehrere Stoffwechselwege für Kinine bekannt. ACE hydrolysiert ein carboxyterminales Dipeptid von BK und ein Tripeptid von des-Arg⁹-BK, was zu Fragmenten führt, die an beiden Rezeptortypen inaktiv sind. Die relative Bedeutung des Kininase-I-Wegs im Blut und Kreislauf ist wahrscheinlich gering (Blais Jr et al., 2000). Endothel-gebundene Enzyme wie ACE und neutrale Endopeptidase haben wahrscheinlich eine größere Bedeutung.

1.6 Ziel der Studie

Die aufgeführte Evidenz aus dem Eingangskapitel verdeutlicht, dass nicht-allergische Angioödeme eine bekannte Nebenwirkung von ACEI, z. B. Captopril und Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptorblockern wie Losartan sind (ONTARGET Investigators et al., 2008). Neben der Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz mit verminderter Auswurfraction, linksventrikulärer Dysfunktion, Diabetes einschließlich Nephropathie und Schlaganfall werden diese Medikamente weltweit zur Behandlung von vielen Millionen Patienten eingesetzt (Schmieder et al., 2007).

RAAS-Blocker verursachen häufig nicht-allergische Angioödeme, die übersehen oder fehldiagnostiziert werden, obwohl sich diese Erkrankung zu einem ernsten, lebensbedrohlichen Zustand entwickeln kann, wenn beispielsweise Schwellungen im Kehlkopfbereich auftreten (McMurray et al., 2014). Während intestinale Manifestationen von nicht-allergischen Angioödemem, die durch ACEi verursacht werden, beschrieben wurden (Palmquist & Mathews, 2017), treten die meisten RAAS-Blocker-induzierten Fälle im oberen Aerodigestivtrakt auf. Infolge solcher Schwellungen ist häufig eine Notfallbehandlung erforderlich. Es wurde auch von tödlichen Fällen berichtet (Atalay et al., 2015; Dean et al., 2001; Oike et al., 1993; Ulmer & Garvey, 1992). Aufgrund der häufigen Anwendung von RAAS-Blockern und der hohen Inzidenz von nicht-allergischen Angioödemem im Zusammenhang mit diesen Arzneimitteln ist in Deutschland mit etwa

35 000 Fällen pro Jahr zu rechnen. Eine evidenzbasierte Diagnostik fehlt derzeit (Bas et al., 2010), so dass wahrscheinlich viele Fälle unerkannt bleiben.

Die Pathophysiologie des durch ACE-Hemmer induzierten nicht-allergische Angioödem wird hauptsächlich durch die von ACE-Hemmern resultierende erhöhte Bradykinin-induzierte Aktivierung von vaskulären Bradykinin-Rezeptors Typ II (B2) vermittelt (Bas et al., 2007), wobei die spezifischen nachgeschalteten Signalwege unklar sind. Ein wichtiger Faktor für die Unklarheit der nachgeschalteten Signalwege ist die Schwierigkeit einer direkten und genauen Messung der Plasma-Bradykinin-Konzentrationen an Probanden mit nicht-allergischem Angioödem. Zum einen kommt es nach einer Venenpunktion zu einer Kontaktaktivierung über Faktor XII und somit zur Aktivierung von Kallikrein und schließlich zur Bildung von Bradykinin (Kaplan & Joseph, 2014) und zum anderen wird Bradykinin durch mehrere Proteasen einschließlich Aminopeptidase P, neutrale Endopeptidase, Carboxypeptidase N und Dipeptidylpeptidase IV abgebaut. Die Aktivität dieser Proteasen während der Blutentnahme ist schwierig zu kontrollieren. Ausserdem ist die Konzentration von Bradykinin im Kreislauf sehr gering und schwierig zu messen (Nussberger et al., 1998, 2002). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass lokale Konzentrationen von Bradykinin in Angioödem-Gewebe erheblich von Konzentrationen in venösem Blut abweichen können (Nussberger et al., 1999).

Im Hinblick auf die dargestellte Evidenz war das Ziel dieser Dissertation zu untersuchen, ob die Aktivierung von B2-Rezeptoren durch endogenes Bradykinin zur physiologischen Extravasation beiträgt und welche spezifischen nachgeschalteten Signalwege an der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation beteiligt sind. Diese Ergebnisse könnten ein neues Licht auf die Annahme werfen, dass die Behandlung mit einem Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer zu einer Veränderung der vaskulären Barrierefunktion führt, die für ein nicht-allergisches Angioödem prädisponiert.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Alle Medien, Enzyme und Puffer sowie Antibiotika, die für die Experimente benutzt wurden, stammten von der Firma GIBCO Life Technology (Karlsruhe). Sämtliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden in bester verfügbarer Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Zur Herstellung der Puffer und der Lösungen wurde demineralisiertes und frisch destilliertes Wasser eingesetzt.

Die Zusammensetzung der genutzten Puffer und Lösungen war wie folgt:

- **TE-Puffer:**
10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0
- **10x TBE-Puffer:**
890 mM Tris
89 mM Borsäure
20 mM EDTA
- **TAE-Puffer:**
40 mM Tris
0,1 % Essigsäure
10 mM EDTA
pH 8,0
- **DNA-Auftragspuffer:**
50 % Glycerin
50 mM EDTA
0,1 % Bromphenolblau
ad 50 ml 10x TBE-Puffer
- **Puffer für Membranpräparationen**
150 mM Tris-HCL
2 mM PMSF

2 mM EDTA

2 mM EGTA

Proteaseinhibitoren: 10 µg ml⁻¹ Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin
pH 7,4

- **Lysispuffer für Proteine aus Organen:**

5 mM Tris

1 mM EDTA

1 mM EGTA

2,5 mM Na₂P₂O₄

1 mM β-Glycerolphosphat

1 mM Na₃VO₄

5 mM NaF

1 mM PMSF

Proteaseinhibitoren: 10 µg ml⁻¹ Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin
pH 7,6

- **Bradford-Reagenz:**

0,02 % Coomassie Blue G 250

10 % v/v Phosphorsäure

5 % v/v Ethanol

- **4x Trenngelpuffer, pH 8,8**

150 mM Tris-HCl

0,4 % SDS

pH 8,8

- **Sammelgelpuffer**

250 mM Tris-HCl

0,2 % SDS

pH 6,8

- **SDS-Probenpuffer**

50 mM Tris

2 % SDS

10 % Glycerin

0,005 % Bromphenolblau

- **10x SDS-Laufpuffer**

250 mM Tris-HCl

1,92 mM Glycin

1 % SDS

pH 8,6

- **TBST-Puffer**

20 mM Tris

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween 20

pH 7,6

- **Lysispuffer für Mausschwanzspitzen**

50 mM Tris

100 mM EDTA

100 mM NaCl

1 % SDS

pH 8,0

- **Western-Blotting-Puffer**

25 mM Tris

200 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

- **Stripping-Puffer**

5 mM Tris

2 % SDS

0,75 % β -Mercaptoethanol

- **Saliner Phosphat-Puffer (PBS = Phosphate Buffered Saline)**

140,0 mM NaCl

10,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2,7 mM KCl 1,8 mM KH_2PO_4

- **Coomassie Gel-Färbung**

Lösung 1: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G 250, 90 % Ethanol

Lösung 2: 20 % Essigsäure

Fixierlösung: 40 % Ethanol

Entfärbungslösung: 20 % Ethanol

10 % Essigsäure

- **Krebs-HEPES-Puffer**

99 mM NaCl

4,69 mM KCl

1,87 mM CaCl₂

1,2 mM MgSO₄

25,0 mM NaHCO₃

1,03 mM K₂HPO₄

20 mM Na-HEPES

11,1 mM Glucose

pH 7,4

2.2 Versuchstiere

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend § 8 des Tier-schutzgesetzes vom 18. Mai 2006 beantragt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (AZ 50.05-230-3-65/99, AZ 50.05-230-3-94/00, AZ 50.05-230-18/06, AZ 84-02.04.2012.A194, AZ 84-02.04.2016.A114). Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57Bl/6 verwendet. Sie wurden von der Firma JANVIER LABS (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen oder stammten aus der eigenen Zucht der Tierversuchsanlage (ZETT, UKD Düsseldorf). Neben diesen Wildtyp-Tieren wurden auch transgene Tiere mit endothelspezifischer Überexpression des Bradyki-nin-Rezeptors Typ II (B2^{tg}) verwendet. Die verwendeten Versuchstiere waren männ-lich, 1012 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 22–25 g. Alle Mäuse, außer den extern bezogenen, wurden in der Tierversuchsanlage in einem speziellen pathogen-freien Bereich (SPF) geboren. Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgten unter stan-dardisierten Bedingungen wie Raumtemperatur 20 °C und einer relativen Luftfeuchtig-keit von 55 % ± 5 %. Alle Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus durch Kunstlicht in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und hatten freien Zugang zu keimfreien Trinkwasser pH 3 ad libitum und pel-letiertem Trockenfutter. Die Tiere standen unter tierärztlicher Kontrolle und wurden re-gelmäßig auf Infektionen und anderen Erkrankungen kontrolliert. Eine Voraussetzung für die Durchführung aller Versuche war ein einwandfreier körperlicher Zustand (Kör-pergewicht, Fell, Augen, Vibrissen) der Tiere. Alle Tiere wurden vor Einschluss in die Studie nochmals genotypisiert. Bei der Durchführung der Versuche wurde außerdem

die Richtlinie „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des US National Institute of Health beachtet (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

2.2.1 Fütterungsversuche

In einigen Experimenten wurden die Mäuse per oral (p.o.) mit NG-Nitro-L-Arginin (L-NA, 100 mg·kg⁻¹ KG) für 7 Tage, gefolgt von einer kombinierten Behandlung mit L-NA (100 mg·kg⁻¹ KG, Sigma-Aldrich, München) und Diclofenac (10 mg·kg⁻¹ KG, Sigma-Aldrich, München) für weitere 4 Tage gefüttert. Das Trinkwasser wurde täglich ausgetauscht.

2.2.2 B2^{tg} und ihre Genotypisierung

Um den Einfluss des Bradykinin-Rezeptors Typ II (B2) auf die arzneimittelinduzierte Extravasation zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit außerdem transgene Mäuse verwendet. Folgende transgene Mäuse wurden während der Forschungsarbeit untersucht:

- B2^{tg} (endothelspezifische Bradykinin-Rezeptor Typ II (B2) Überexprimierung)
- B2ⁿ (transgen negatives Geschwister tier)

Zur Generierung der neuen transgenen Linie mit endothelspezifischer Überexpression des B2-Rezeptors wurde die etablierte Plattenepithel-Karzinomzelllinie UDSCC 2 (squamous carcinoma cells, HNO-Klinik, HH-Universität Düsseldorf) verwendet, die den Bradykinin-Rezeptor Typ II (B2) exprimiert. Das daraus verwendete Genkonstrukt ist aus dem B2-Rezeptor aufgebaut, der unter Kontrolle des murinen Tie-2-Promotors steht und einem 10 kbp großem Fragment des ersten Introns des Tie-2-Gens (Tie-2-Enhancer), der für die endothelspezifische Expression in adulten Mäusen wichtig ist. Die Generierung der B2^{tg}, ist in der Arbeit von Dr. rer. nat. Vu Thao-Vi Dao ausführlich beschrieben (Dao, 2011). Die transgene B2-Rezeptor-Mauslinie (B2^{tg}) einschließlich ihrer transgenen negativen Wurfgeschwister (B2ⁿ) wurden über 10-mal auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

2.2.2.1 Genomische DNA-Isolierung aus der Schwanzspitze

Für die Isolierung genomischer DNA wurden Schwanzspitzen dreiwöchiger Versuchsmäuse verwendet. Hierfür wurde die Schwanzspitze mit 750 µl Lysispuffer (s. 2.1) und 17,5 µl Proteinase K QIAGEN® (0,5 mg·ml⁻¹) versetzt. Zur kompletten Lyse aller Proteine wurde das Gemisch 16 Stunden lang über Nacht bei 56 °C inkubiert. Der Zusatz von 250 µl einer 6 M NaCl-Lösung und einer darauffolgenden Schüttel-Inkubation von 5 min dienten zur Proteindenaturierung. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur und 13.000 xg zentrifugiert. Durch Zugabe von 500 µl kaltem (–20 °C) absolutem Ethanol und einer nachfolgenden Zentrifugation für 30 min bei 13.000 xg und 4 °C wurde die DNA gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 750 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Zur Abtrennung des Ethanols wurde anschließend für 5 min bei 13.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment bei Raumtemperatur vollständig getrocknet, in 80 µl TE-Puffer (s. 2.1) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration und Reinheit wurde mithilfe des BioPhotometers (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm UV-spektrophotometrisch bestimmt. Die DNA-Reinheit wurde mittels des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm überprüft. Um eine Verunreinigung auszuschließen, sollte der Wert von ca. 1,8 nicht unterschritten werden. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei –20°C.

2.2.2.3 Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR

Zur Genotypisierung und Bestätigung der transgenen Mauslinie B2^{tg} wurde die PCR-Methode mit genomischer DNA (s. 2.2.2.1) durchgeführt. Die Primer wurden derart gewählt, dass der sense-Primer im artifiziellen Tie-2-Promotor-Konstrukt und der antisense-Primer in humanen B2-Rezeptor-DNA bindet (**Abbildung 7**).

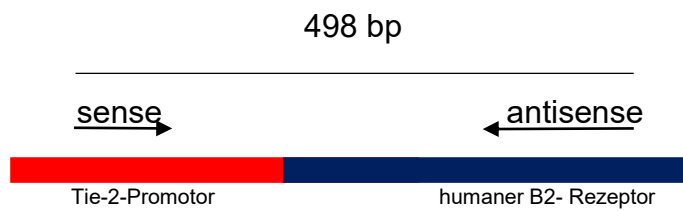


Abbildung 7: Schema des transgenen Konstruktes der Genotypisierungs-PCR.

Die Primer wurden so gewählt, dass der sense-Primer im Tie-2-Promotor und der antisense-Primer in der humanen B2-Rezeptor DNA bindet. Das Produkt hat eine Größe von 498 Basenpaaren.

Auf diese Weise wird nur aus der DNA transgen-positiver Mäuse (B2^{tg}, **Abbildung 8**) ein Reaktionsprodukt erhalten, da eine entsprechende DNA-Kombination in Wildtyp-Mäusen nicht vorkommt. Dabei wurden als Primerpaar Sense: 5'-AACAAAGAGCGAGTGGAC-3' und Antisense: 5'-CCAAAGAGCCAGTCGAAGTT-3' ausgewählt. Die transgenspezifische PCR erfolgte mit etwa 100-200 ng genomischer DNA, 0,4 µM Primerkonzentration und dem Mastermix 2,5 x' (Eppendorf, Hamburg) unter folgenden Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung: 94°C, 3 min
2. Denaturierung: 94°C, 30 sec
3. Annealing: 60°C, 30 sec
4. Elongation: 72°C, 30 sec
5. Die Schritte 2 bis 4 werden 35 mal wiederholt.

2.2.2.4 DNA-Elektrophorese

Die erfolgreiche Amplifikation der DNA-Sequenz wurde anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft, indem die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Hierbei werden Größe und Masse durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe verglichen. Dabei wurde das Agarosepulver durch kurzes Aufkochen in einem Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer s. 2.1) gelöst. Nach Zugabe von 0,5 µl ml⁻¹ Ethidiumbromid und Befüllen der Gelelektrophoresekammer bildete sich ein Gel durch Abkühlen. Je nach DNA-Fragmentgröße werden unterschiedliche Gelkonzentration (0,5 und 3 % (m/V)) verwendet. Je kleiner die DNA-Fragmentgröße, desto höher muss die

Konzentration des Agarosegels ausgewählt werden. Die Moleküle werden nach ihrer Größe durch das Gel getrennt. Je stärker das Molekül zurückgehalten wird, desto größer ist die Größe des Moleküls. Vor der Elektrophorese wurde die amplifizierte DNA mit DNA-Auftragspuffer (s. 2.1) im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Geltaschen des 2 %-igen Agarosegels aufgetragen. Um die DNA-Fragmentgröße einordnen zu können, wurde eine 100- oder 1000-Basenpaarleiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Größenstandard mit aufgetragen. Die DNA-Elektrophorese fand in einer Kammer von BioRad (München, 90 V, 30 min) statt. Nach ca. 30 min waren die DNA-Fragmente deutlich aufgetrennt. Um die fluoreszierenden Banden detektieren zu können, erfolgte die Auswertung im UV-Transilluminator bei 254 nm UV-Licht und wurde fotografisch dokumentiert.

A



B

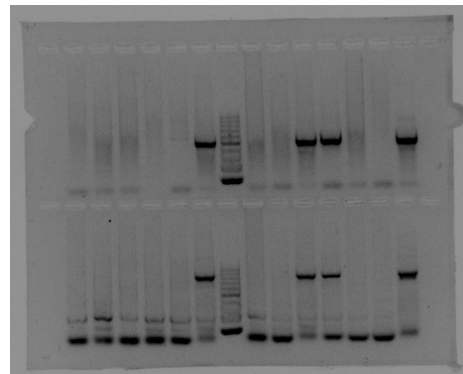


Abbildung 8: A Eine B2^{tg} Maus mit endothelspezifischer Überexprimierung des B2-Rezeptors. B Ein Beispielgel als Abbildung für die Mauslinie (B2^{tg})

2.2.3 Präparation der Tiere und Entnahme der Organe

Zwecks Organentnahme wurden die Versuchstiere durch eine 30-sekündige CO₂-Inhalation euthanasiert, so dass kein Lidreflex mehr bestand. Krebs-Hepes-Puffer fand als Standard-Präparationspuffer für die nachfolgenden Schritte Verwendung. Nach Entfernung des Fells wurden die Mäuse auf einem Präparationstisch fixiert (**Abbildung 9 A**). Der Thorax wurde durch Trennung des Corpus sterni und der Rippen geöffnet, sodass das Herz frei lag (**Abbildung 9 B**). Zur Vorbereitung der Organentnahme wurden die Organe durch den rechten Herzventrikel mithilfe einer 23G-Kanüle (0,6 mm Durchmesser) mit 100 µl Heparin (Ratiopharm, Ulm, 5000 U ml⁻¹) durchspült.

Die Lungenflügel und das Herz wurden entfernt und vorübergehend in kaltem Krebs-Hepes-Puffer überführt. Um die Aorta zu isolieren, wurde die Bauchhöhle weiter geöffnet, der gesamte Darm zur rechten Körperhälfte verschoben und die Bauchöffnung in Krebs-Hepes-Puffer getränkt. Anschließend wurde mit einer Schere die Aorta vom Aortenbogen bis zur Abzweigung im Beckenbereich entnommen und in Krebs-Hepes-Puffer vorsichtig mit einer Pinzette und einer Schere von anhaftendem Fett- und Bindegewebe isoliert. Zuletzt wurde die Aorta langsam durchspült, um das im Lumen vorhandene Blut zu entfernen. Damit die Endothelzellschicht unversehrt blieb, musste darauf geachtet werden, dass die Aorta während der Präparation nicht allzu stark gestreckt oder gedrückt wurde. Für Organbadversuche wurde die Aorta in 5 mm breite Ringe geschnitten. Als Kontrollversuch für die Organbadversuche wurde einer der Aortenringe behutsam mit einem dünnen Holzstäbchen durch mehrmaliges Reiben das Endothel entfernt. Für die Weiterverarbeitung zur Protein-Isolierung wurden die Organstücke in Krebs-Hepes-Puffer gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Organe, die zur RNA-Isolierung dienten, wurden in der RNA Later-Lösung® (Ambion, Darmstadt) bei -80°C aufbewahrt.

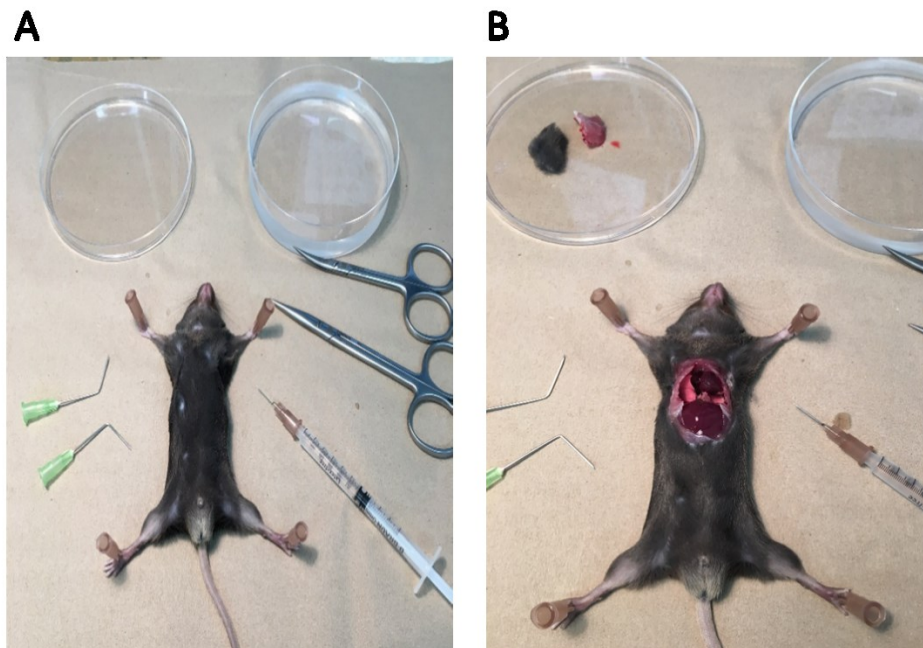


Abbildung 9: Euthanasierte C57BL/6-Maus A. vor und B. nach Entfernung des Brustfells zur Vorbereitung der Organentnahme

2.3 Präparation und Analyse von Proteinen

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels der Western-Blot-Methode. Die Untersuchung der Expression des B2-Rezeptors erfolgte in der Lunge als auch der Aorta transgener Versuchstiere und C57BL/6.

2.3.1 Proteinisolierung aus Geweben der Maus

Für die Herstellung von Homogenaten und Isolierung der Proteinfractionen wurde das bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Gewebe (Lunge, Aorta) in einem in Stickstoff getränkten Metallmörser pulverisiert und umgehend in eisgekühlten Lysispuffer für Proteine (s. 2.1) aufgenommen. Daraufhin wurde mittels eines Mikrogewebe Handhomogenisators (Neolab, Heidelberg), die zuvor in Lysispuffer aufgenommenen pulverisierten Organe, dispergiert und auf Eis für 10 min beschallt (50 Hz). Fraktionen, in denen die membranständigen Proteine untersucht werden sollten, wurden anschließend bei $100 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit äquivalenten Mengen eines 150 mM Tris-HCL-Puffers für Membranpräparationen bei $20.000 \times g$ für 20 min unter $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Zur Abtrennung der membranären Bestandteile von der zytosolischen Fraktion wurde schließlich das Pellet in RIPA-Puffer (s. 2.1) für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ extrahiert und bei $20.000 \times g$ für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Für eine mehrfache Detektion der Proteine wurden die Überstände aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Methode ist eine photometrische Messung. Die quantitative kalorimetrische Methode nach Marion Bradford diente der Bestimmung der Proteinkonzentration von Organlysaten (Bradford, 1976). Durch Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Biorad, München) in saurer Lösung von seiner ungebundenen (kationischen) rotbraunen Farbe in seine blaue unprotonierte (anionische) Sulfonatform überführt und stabilisiert. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine. Daraufhin

verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm (rotbraun) auf 595 nm (blau). Dabei ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm proportional zu der Menge an gebundenem Farbstoff und somit auch zu der Proteinkonzentration in der Probe. Für eine Kalibrierung zur Konzentrationsmessung wurde Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma, München) verwendet. Zur Erstellung einer BSA-Eichgeraden wurden Konzentrationen von $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $140 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 5 mM Tris (pH 7,6) verwendet (**Abbildung 10**). Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der Proteinlösungen hergestellt. Die Vermessung der Proteinmischung (100 μl Proteinlösung mit 400 μl Bradford-Reagenz, s. 2.1) erfolgte in Standard-VIS-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht) und bei 595 nm im Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld). Die verwendete Kontrolle war eine Mischung aus 100 μl Tris mit 400 μl Bradford-Reagenz. Nur die Verdünnungen, die im mittleren Bereich der Kalibriergeraden (**Abbildung 10**) lagen, fanden zur Berechnung der Proteinkonzentration Verwendung. Das Hintergrundrauschen wurde vor Beginn der Messreihe mit einem Blank von 100 μl Tris und 400 μl Bradford-Reagenz eliminiert.

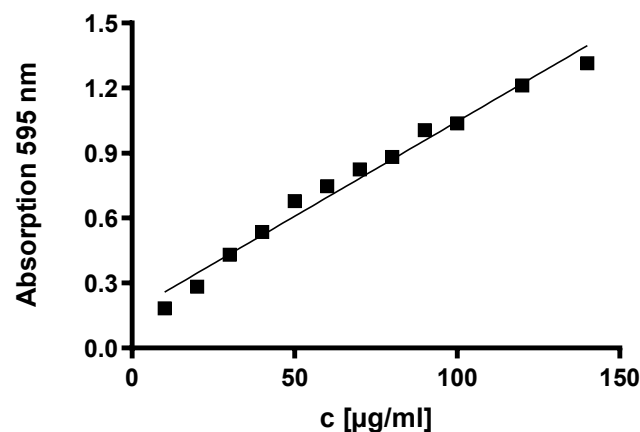


Abbildung 10: Beispiel einer Bovines Serumalbumin (BSA)-Kalibrierkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Organlysaten in der Maus.

Die Kalibriergerade ließ sich mittels linearer Regression bilden. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der Proteinfraktionen ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $140 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 5 mM Tris (pH 7,6)) gemessen. Zur Berechnung wurden diejenigen Verdünnungen verwendet, die sich im mittleren Bereich der Kalibriergeraden befanden.

2.3.3 Western Blot

Mittels der Western-Blot-Methode erfolgte die Analyse der Proteinexpression in verschiedenen Gewebelysaten, die von Towbin im Jahre 1979 erstmalig publiziert wurde

(Towbin et al., 1979). Dabei wird ein Proteingemisch mithilfe einer Gel-Elektrophorese-technik auf einer Gelmatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend werden die separierten Proteinbanden auf eine Trägermembran (Western-Blot) durch Blotting übertragen und über eine Antikörperbindung und Detektion direkt nachgewiesen.

2.3.3.1 SDS-Page

Das Verfahren erfolgte nach dem Prinzip der denaturierenden, diskontinuierlichen „Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“ kurz SDS-Page (Maizel et al., 1970). Für die Elektrophorese wurde das Gel durch radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (im Verhältnis 37,5:1) hergestellt, wobei N,N'-Methylenbisacrylamid zur Quervernetzung diente. TEMED (Tetramethylethylen-diamin, Polymerisierungskatalysator) sowie APS (Ammoniumperoxodisulfat, Radikalstarter) waren Starter der Vernetzung. Die Porengröße der Gelmatrix wurde durch die Konzentration des Acrylamids und des Bisacrylamids bestimmt. Mit steigender Acrylamid Konzentration nahm die Porengröße ab.

2.3.3.2 Western-Blot-Protokoll

Das Gel bestand aus einem engporigem Trenngel (10 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, pH 8,8), über das eine schmale Schicht weitporiges Sammelgel (4,5 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, pH 6,8) gegossen wurde. Letztere diente der Einwanderung der Proteingemische in das Trenngel, um einen gleichmäßigen Start des Laufs durch das Trenngel zu gewährleisten. Die Elektrophorese fand in einer mit SDS-Laufpuffer (s. 2.1) gefüllten Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad (München) mit zwei Gelen statt. Die eingefrorenen Probenlysate wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1:1 SDS-Probenpuffer-Gemisch (440 µl SDS-Probenpuffer, 60 µl Mercaptoethanol und einer Pipettenspitze Bromphenolblau, s. 2.1) versetzt. Die zu untersuchenden Proteine wurden bei 95 °C für 5 min hitzedenaturiert und in die entsprechenden Vertiefungen des Sammelgels mit jeweils 20 bis 80 µg Gesamtproteinmischung beladen. Bei jeder Proteintrennung diente als Molekulargewichtsmarker ein farbmarkierter Protein-Größenstandard (Precision Plus, Bio-Rad, München). Für die Stapelung der Proteine

wurden anfänglich 90 Volt angelegt. Sobald die Proben die Trennzone zwischen Sammelgel und Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Die Trennung der Proteine wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front vom Gel abgelaufen ist.

2.3.3.3 Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran

Die nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine wurden mithilfe einer Blotting Apparatur (Bio-Rad, München) bei 90 V über 90 min in eiskaltem Western-Blotting-Puffer (s 2.1) geblottet. Dabei wurden die Proteine auf eine zuvor mit PBS aktivierte Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,4 μ M; Millipore, Schwalbach) transferiert (**Abbildung 11**). Während der Prozedur wurde die Apparatur durchgehend mit Eisakku gekühlt.

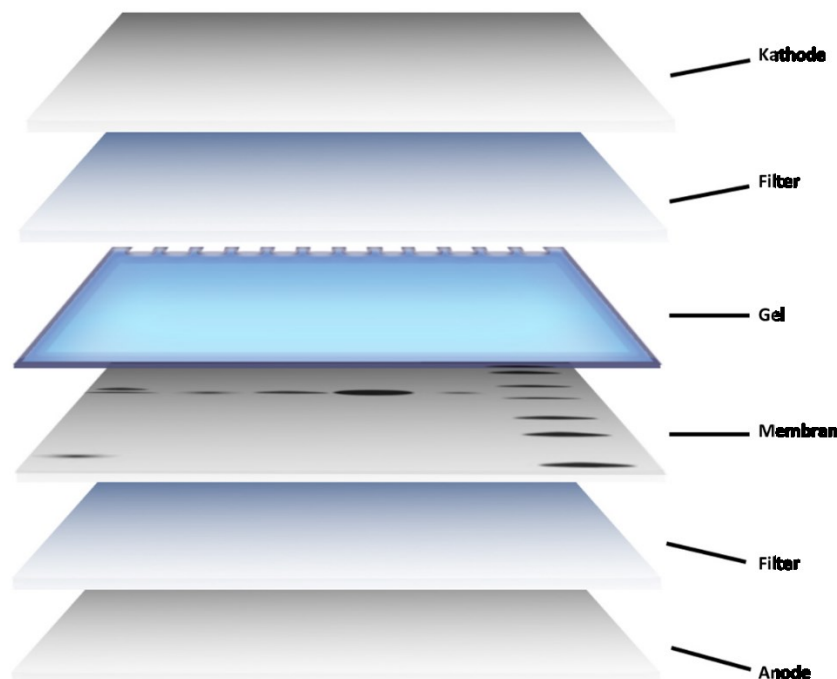


Abbildung 11: Sandwich-Verfahren zum Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran

Die aufgetrennten Proteine wurden mithilfe einer Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) bei 90 V geblottet. Dabei wurden die Proteine auf dem Gel auf eine zuvor mit PBS aktivierte Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,4 μ M; Millipore, Schwalbach) mittels eines Sandwich-Verfahren transferiert.

2.3.3.4 Antikörperdetektion

An der Luft wurde die Membran getrocknet und in PBS aktiviert. Die Membran wurde in zwei Teilen geschnitten wobei der untere Abschnitt zur Standardisierung auf eine Ladekontrolle (Anti-Actin und Anti-GAPDH, Sigma-Aldrich, München) diente. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Membranen in einer einstündigen Inkubation mit 10 ml Odyssey®-Blocking Puffer (Licor Biosciences, Bad Homburg) und PBS (1:1) geschwenkt. Für die Detektion spezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen nach dem Blocken mit PBST (3 mal, 5 min) gewaschen und mit dem Erstantikörper (s. **Tabelle 3**) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es fanden jeweils monoklonale Antikörper aus der Maus oder polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen oder aus der Ziege Verwendung. Nach einer Waschphase von 4 x 5 min mit PBST wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Anti-rabbit IR Dye® 800 CW und Anti-mouse IR Dye® 680 LT, Licor Biosciences, Bad Homburg, **Tabelle 3**) im Dunkeln inkubiert. Der einstündigen Inkubation folgten vier Waschschrte für jeweils 5 min in PBST. Zur Entfernung des Tween 20 wurden die Membranen daraufhin mehrmals mit PBS gewaschen.

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller	
anti-B2	Hu-	1:2000	Abcam, Cambridge	1. Antikörper
anti-Actin	Kaninchen	1:5000	Sigma, München	1. Antikörper
anti-GAPDH	Maus	1:8000	Sigma, München	1. Antikörper
anti-rabbit IR Dye® 800	Ziege	1:10000	Licor Biosciences, Bad Homburg	2. Antikörper
anti-mouse IR Dye® 680	Ziege	1:10000	Licor Biosciences, Bad Homburg	2. Antikörper

Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper zur Protein-Detektion im Westernblot aus den Organlysaten (Lunge und Aorta) : Antikörper, Quelle, Verdünnung und Hersteller.

2.3.3.5 Detektion mit dem Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner

Nach Auflegen der Membranen auf die Messplatte des Licor Odyssey® Gerätes (Licor Biosciences, Bad Homburg, **Abbildung 12 A**) und Auswahl des geeigneten Fluoreszenzkanals wurde die Fluoreszenz mithilfe des Licor Odyssey® Fluoreszenzscanners vermessen. Anhand der Application Software Version 3.0 (Licor Odyssey®, Licor

Biosciences) erfolgte die Quantifizierung der Proteinexpression. Nach der Detektion wurden die Membranen (**Abbildung 12 B**) in PBST im Kühlschrank aufbewahrt.

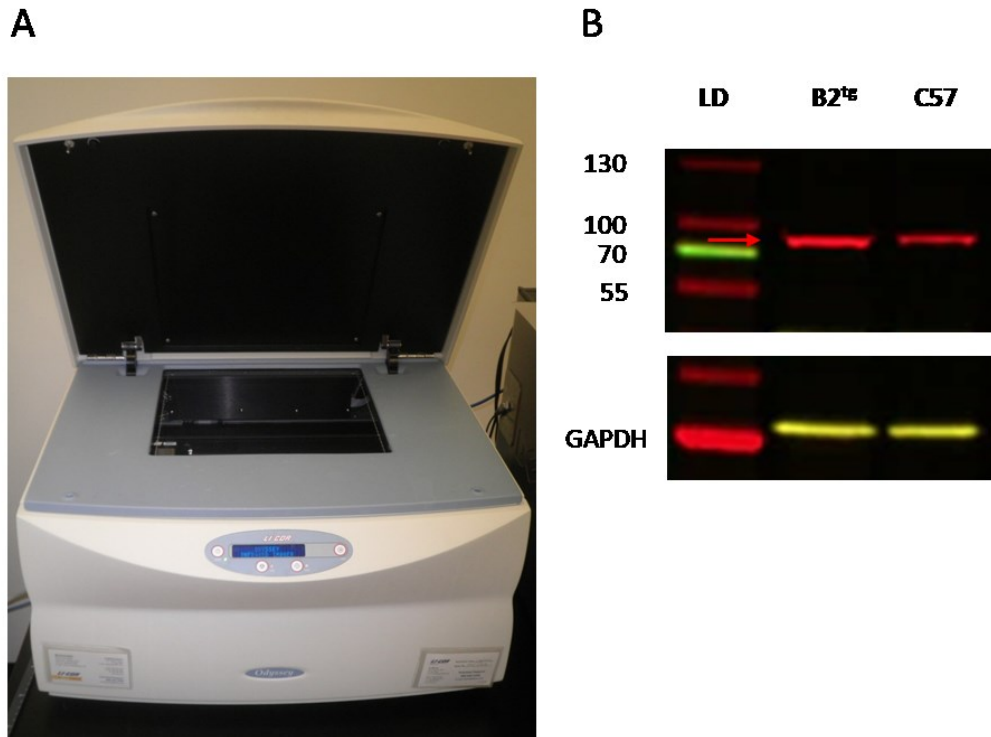


Abbildung 12: A. Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner. B. Beispiele für eine fluoreszierende Membran (Western Blot) nach Aufnahme im Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner, der die Expression von B2-Rezeptorproteinen in Aortengewebe zeigt (Leiter (LD) links ist in kDa angezeigt).

Der rote Pfeil zeigt das B2-Rezeptorsignal an, GAPDH-Signal wurde bei 36 kDa mit einem anderen sekundären Antikörper nachgewiesen und ist separat dargestellt.

2.4 Präparation und Analyse der RNA (rtPCR)

Voraussetzung für die Genexpressionsanalyse ist die RNA-Isolierung aus RNA-Later® stabilisierten Proben (tierischem Gewebe) und die anschließende cDNA-Synthese. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene diente die cDNA als Template für die Realtime-RT-PCR.

2.4.1 RNA-Isolierung aus der Lunge

Die Isolierung der RNA aus der Lunge der Maus erfolgte mithilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden). Für die RNA-Isolierung wurde die Lunge nach Organentnahme

in RNA-Later®-Lösung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die in RNA-Later®-Lösung eingefrorenen Lungenproben wurden mit eiskaltem, β -Mercaptoethanol (1 %) enthaltenen denaturierenden RLT®-Lysispuffer versetzt und mithilfe eines ausschließlich für die RNA-Gewinnung verwendeten Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Zur Vorbeugung einer Kontamination zwischen den Proben wurde der Ultra-Turrax zwischen den unterschiedlichen Proben mit NaOH (0,1 %) und Nuklease-freiem Wasser ausgespült. Die aufbereiteten Homogenate wurden auf QIAshredder®-Säulen überführt und bei $13.000\text{ }xg$ für eine Minute zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand abgenommen und mit $590\text{ }\mu\text{l}$ Nuklease-freiem Wasser und $10\text{ }\mu\text{l}$ Proteinase K (Qiagen, Hilden) für 10 min bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Ausfällung der RNA erfolgte durch Zugabe einer 0,5-fachen Menge an 70 %igem (V/V) Ethanol zum Überstand und Resuspendierung der Probe. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf RNeasy®-Säulen überführt und bei $10.000\text{ }xg$ zentrifugiert. Die RNA wurde auf der Säule gebunden und mit einem Mix von $10\text{ }\mu\text{l}$ DNase und $70\text{ }\mu\text{l}$ RDD-Puffer inkubiert und mit $350\text{ }\mu\text{l}$ RW1-Puffer und $500\text{ }\mu\text{l}$ RPE-Puffer mit dazwischen geschalteten Zentrifugations-Schritten ($10.000\text{ }xg$, 1 min, RT) gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit $30\text{--}50\text{ }\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt) und einer Zentrifugation bei $10.000\text{ }xg$ (1 min, RT).

2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde fotometrisch mithilfe des BioEppendorf (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dabei wurde die Absorption im UV-Bereich bei $\lambda = 260\text{ nm}$ (A_{260} , Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren), sowie bei $\lambda = 280\text{ nm}$ (A_{280} , Absorptionsmaximum für Proteine) ermittelt. Durch Bestimmung des Quotienten A_{260} / A_{280} war es möglich, Rückschlüsse auf Verunreinigungen mit Proteinen zu ziehen. Der OD 260 / 280 Quotient von 1,8–2,0 entspricht dabei einer reinen und sauber extrahierten RNA, während Werte unter 1,8 auf Verunreinigungen, unter anderem durch Proteine, hinweisen. Um diese Verunreinigungen auszuschließen, wurden nur Proben verwendet deren OD 260 / 280 Quotient zwischen 1,8 und 2 lag. Nach Vermessung wurde die Probe verworfen.

2.4.3 cDNA-Synthese

Um die gewonnene RNA mittels real-time PCR quantifizieren zu können, war es erforderlich, die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Je Ansatz wurden 10 µl 2× Reverse Transcription Master Mix (2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25× dNTP-Mix (100 mM), 2 µl 10× RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor, 3,2 µl Nuclease-free H₂O) vorgelegt und 10 µl der RNA-Probe hinzu pipettiert. Durch langsames auf und ab pipettieren wurde die Lösung gut durchmischt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) unter folgenden Bedingungen:

1. Step 1: 25 °C, 10 min
2. Step 2: 37 °C, 120 min
3. Step 3: 85 °C, 5 min
4. Step 4: 4 °C, ∞

Die erhaltene cDNA ließ sich dann als Template für die Realtime-RT-PCR einsetzen und wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.4.4 Real-time-RT-PCR

Die Echtzeit-PCR oder auch real-time PCR genannt erlaubt es, den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion während ihres Fortschreitens also in Echtzeit aufzunehmen. Sie ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die cDNA quantifiziert. Daher erfolgt die Vervielfältigung erst nach der reversen Transkription, bei der die RNA durch das Enzym reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird (s. 2.4.3). Die amplifizierte DNA (cDNA) dient dann als Matrizenstrang in der real-time PCR. Das Prinzip der real-time PCR beruht auf der Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen, die während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit gemessen werden. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit der Menge des synthetisierten PCR-Produktes zu. Die Quantifizierung der mRNA-Expression wird anhand der Fluoreszenzsignale der exponentiellen Phase der real-time

PCR vorgenommen. Das Prinzip basiert zum einen auf der Technologie des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und zum anderen auf die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Die fluorogene Oligonukleotidsonde TaqMan® Probe (Applied Biosystem, Weiterstadt) besteht aus einem am 5'-Ende befindlichen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor) und einem am 3'-Ende markierten Quencher-Farbstoff einem Rhodamin-Derivat (Akzeptor), der mit einem Phosphatrest blockiert ist. Solange die Sonde intakt ist, reduziert die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs die vom Reporter-Farbstoff abgegebene Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) Technologie. So erfolgt kein entsprechendes Reportersignal. Außerdem befinden sich im PCR-Ansatz sense- und antisense-Primer, die an dem Matrizen-Strang hybridisieren. Die Sonde ist zwischen den zwei Primern auch an dem Matrizen-Strang hybridisiert (**Abbildung 13 A**). Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde in der Extensionsphase verdrängt und hydrolisiert (**Abbildung 13 B**). Somit entfernen sich Quencher und Reporter voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden (**Abbildung 13 C**). Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sollte proportional zur gebildeten DNA-Menge sein (**Abbildung 13 D**).

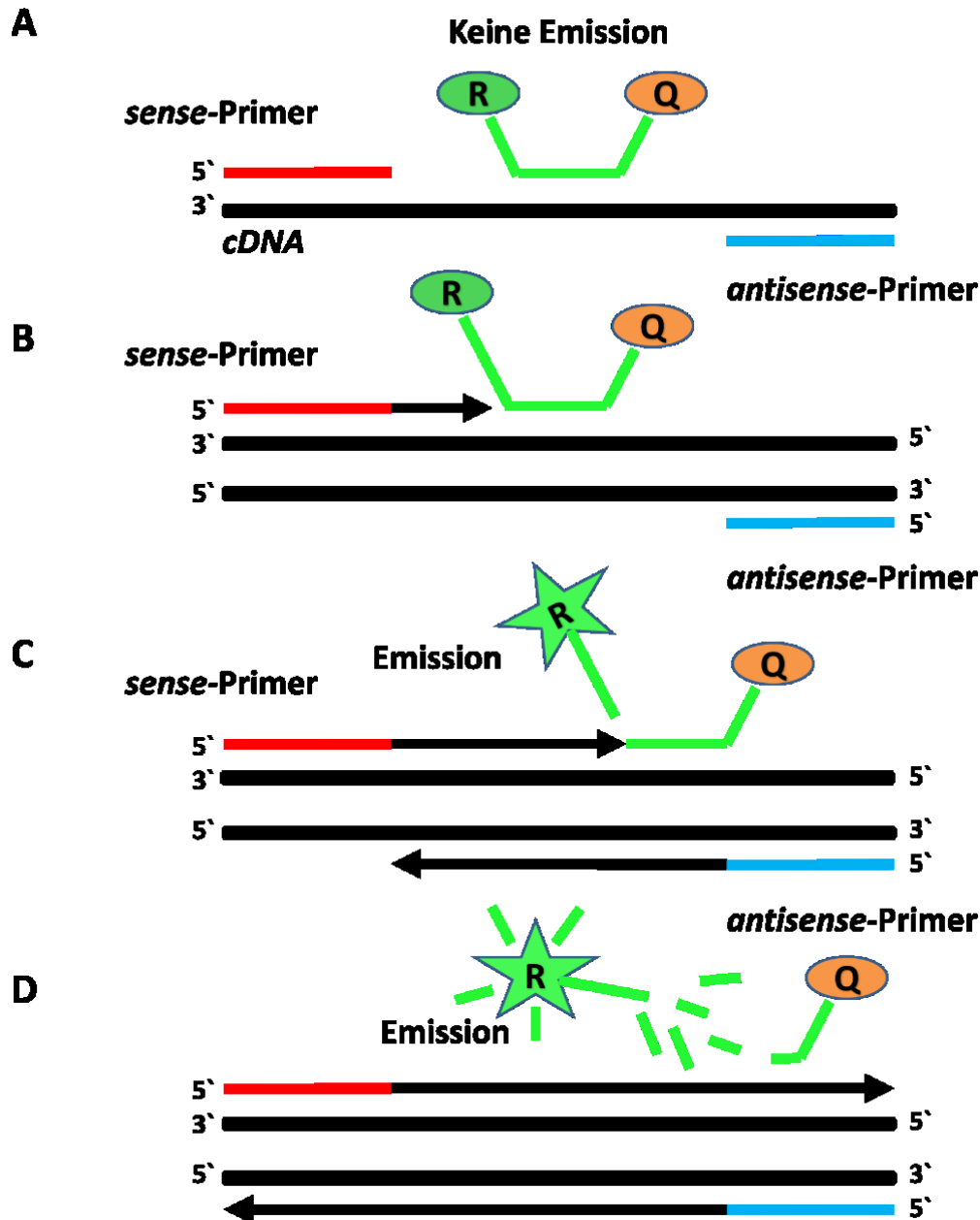


Abbildung 13: Bildliche Darstellung des Realtime-RT-PCR-Prinzips mit dem TaqManAssay® (Applied Biosystem, Weiterstadt).

A. Im denaturierten Zustand erfolgt eine Unterdrückung der Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe vom Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor) zum Quencher-Farbstoff (Akzeptor). Während der Annealingphase bindet die TaqMan Sonde spezifisch an eine komplementäre Sequenz zwischen den beiden Primer. B. Durch den synthetisierten DNA-Strang und der 5'-Nuklease –Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde aus ihrer Bindungsstelle während der Extensionsphase verdrängt. C. Die Sonde wird durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut, somit wird der Reporter vom Quencher getrennt und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 488 nm. D. Nach der vollendeten Polymerisation entsteht ein Reportersignal für jede neu entstehende DNA-Kopie.

2.4.5 Versuchsaufbau

Die Quantifizierung der B2-Rezeptor mRNA-Expression erfolgte in Geweben der Lunge der B2^{tg} und B2ⁿ Maus. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgten wie

in 2.4.1 und 2.4.3 beschrieben. In der **Tabelle 4** sind die für die Realtime-RT-PCR verwendeten Primer, Sonden, Reaktionsansätze und die PCR-Bedingungen aufgelistet. Alle hierfür verwendeten Materialien wurden von Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen. Beide Primer binden Intron-übergreifend und können somit keine DNA detektieren. Der verwendete Reporterfarbstoff ist mit 6-Carboxyfluorescein (FAM™) markiert. Zur Standardisierung des B2-Rezeptors wurde das Haushaltsgen Hypoxanthin-guanin Phosphoribosyltransferase 1 (hprt1) ko-amplifiziert. Hierfür wurde das TaqMan® Gene Expression System (Mm01339967_m1 und Mm00446968, Applied Biosystems/Life Technologies) verwendet. Die Realtime-RT-PCR-Experimente wurden mit einem 7300-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt.

TaqMan®Gene Expression	B2R (Maus)	Hprt1 (Maus)	B2R (Human)	Hprt1 (Human)
Assay	Mm01339907_m1	Mm00446968	Hs00176121_m1	Hs02800695
Reaktionsansatz:	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Primer (10µM)	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
Sonde (10µM)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
cDNA-Probe (100-500 ng)	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Realtime-PCR-Lauf:				
Polymerase Aktivierung	95 °C 10 min	95 °C 10 min	95 °C 10 min	95 °C 10 min
Denaturierung	95 °C 15 s	95 °C 15 s	95 °C 15 s	95 °C 15 s
Annealing/Extension	60 °C 60 s	60 °C 60 s	60 °C 60 s	60 °C 60 s
Zyklen	50	50	50	50

Tabelle 4: Details für die Detektion der B2-Rezeptor mRNA-Expression verschiedener Gene mittels der Realtime-RT-PCR-Methode

2.4.6 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Der C_t -Wert ist der Cycle of threshold. Er entspricht dem Zyklus, bei welchem zum ersten Mal messbare cDNA-Konzentrationen durch Fluoreszenz detektierbar war. Je höher die cDNA-Konzentration bzw. die vorhandenen RNA von Beginn an ist desto

weniger Amplifikationszyklen werden benötigt. Somit ist der Ct-Wert niedriger, je höher die Zahl der Kopien des Zielgens ist.

Bei einer relativen Quantifizierung werden die Änderungen der Genexpression in einer bestimmten Probe relativ zu einer Referenzprobe (unbehandelte Probe) gemessen. Hierfür erfolgt zunächst eine Normalisierung auf die endogene Kontrolle (hprt 1) durch:

$$1. \text{ Ct B2-Gen} - \text{ Ct hprt 1-Gen} = \Delta\text{Ct}$$

um anschließend die Ct-Werte beider Proben (B2^{tg} und B2ⁿ) miteinander zu vergleichen:

$$2. \Delta\text{Ct B2}^{\text{tg}} - \Delta\text{Ct B2}^{\text{n}} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

Die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds erfolgte durch die Formel (Livak & Schmittgen, 2001): $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Dieser Wert gibt die Transkriptionsmenge in dem B2^{tg} im Vergleich zur B2ⁿ Kontrollgruppe an.

2.5 Morphologische Parameter der B2^{tg} Maus

Die Mäuse wurden durch Inhalation von Kohlendioxid euthanasiert und das Körpergewicht, das Gewicht der linken Lunge und das Herzgewicht wurden gemessen. Um den Wassergehalt der Lungen zu bestimmen, wurde zuerst das gesamte Nassgewicht der linken Lunge bestimmt. Hierbei wurde das Lungengewebe bei 58 °C in einem Trockenschrank auf ein konstantes Gewicht getrocknet und darauf das Trockengewicht des Lungengewebes gewogen. Der relative Wassergehalt des Lungengewebes wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Lungenwassergehalt} = \frac{(\text{Lungenfeuchtgewicht} - \text{Lungentrockengewicht}) \times 100 \%}{\text{Lungenfeuchtgewicht}}$$

2.6 Funktionelle Untersuchungen an der isolierten Aorta

Um die funktionelle Bedeutung des B2-Rezeptors auf das vaskuläre System zu untersuchen, wurden Organbadexperimente durchgeführt.

2.6.1 Organbad-Messapparatur

Die Bestimmung der vaskulären Reaktivität der isolierten Aorten fand in einer Organbad-Messapparatur statt. Die Apparatur bestand aus vier 20 ml fassenden doppelwandigen Glasgefäßen, die für die Experimente mit genau 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (s. 2.1) gefüllt waren und in die Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid; Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim) über Glasfritten strömte (**Abbildung 14**). Die Temperatur des Puffers wurde mittels einer Umwälzthermostat-Wasserbad-Kombination (NB22; Haake, Karlsruhe) konstant bei 37 °C gehalten. Ein weiteres doppelwandiges, begasbares Vorratsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1,5 Liter, das ebenfalls an den Warmwasserkreislauf angeschlossen wurde, diente als Reservoir für den vorgewärmten Puffer. Die Kontraktionen der Aorta konnten über Kraftaufnehmer (Stratham, USA), die an den Verstärker (DCB-4B, Mannheim) angeschlossen waren, registriert werden und mittels des Verstärkers an den Schreiber SE-120 (ABB, Mannheim), wie in **Abbildung 14** dargestellt, weitergeleitet werden.

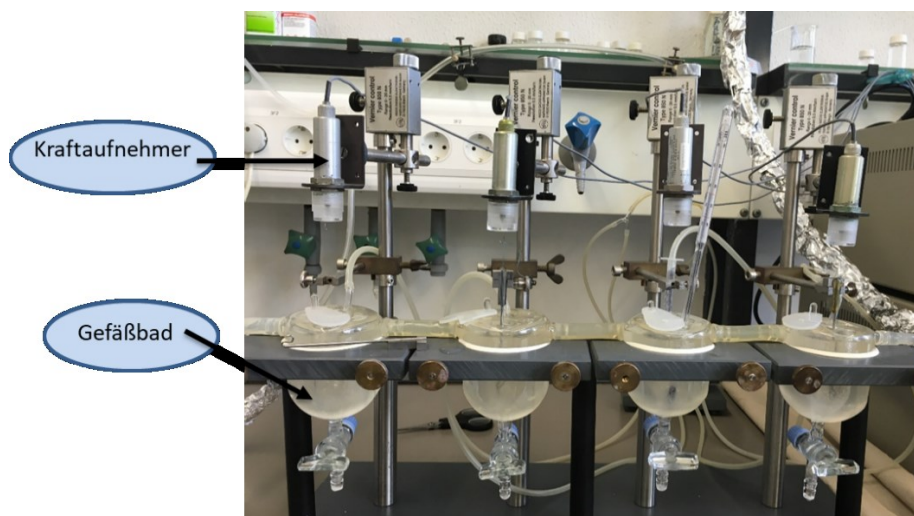


Abbildung 14: Eine Organbadapparatur mit vier Gefäßbädern und den dazu gehörigen Kraftaufnehmer

2.6.2 Kalibrierung

Vor jedem Versuch wurde die Messapparatur mit Standardgewichten zur Kalibrierung geeicht. Bei der Aorta der Maus entsprach der Nullwert dabei der Gewichtskraft von 1 g (9,81 mN). Für die weitere Belastung wurde pro 1 g ein Schreiberausschlag von

7,5 cm festgelegt. Hierbei entsprach die Belastung einer Kontraktion der Aorta. Für die Versuchsdurchführung wurden die Aortenringe vorsichtig zwischen zwei triangelförmig gebogene Drähte (Durchmesser 0,1 mm) aus Edelstahl eingespannt. Hierbei wurde das untere Element an einer Halterung fixiert und das obere mit dem Kraftaufnehmer über einen Polyesterfaden verbunden (**Abbildung 15 A**). Um eine endothelabhängige Aortenkontraktion durch Bradykinin zu bestätigen, wurden ein intakter Ring und ein Ring mit entferntem Endothel eingespannt. Das Endothel wurde durch sanftes Reiben der inneren Aortenfläche entfernt. Bei einer Registrierung der Kontraktionen der Aorta über einen Kraftaufnehmer, der an den Verstärker angeschlossen ist, wird infolge der Zugkraft diese im Messfühler registriert und über Verstärker und Schreiber aufgezeichnet (**Abbildung 15 B**).

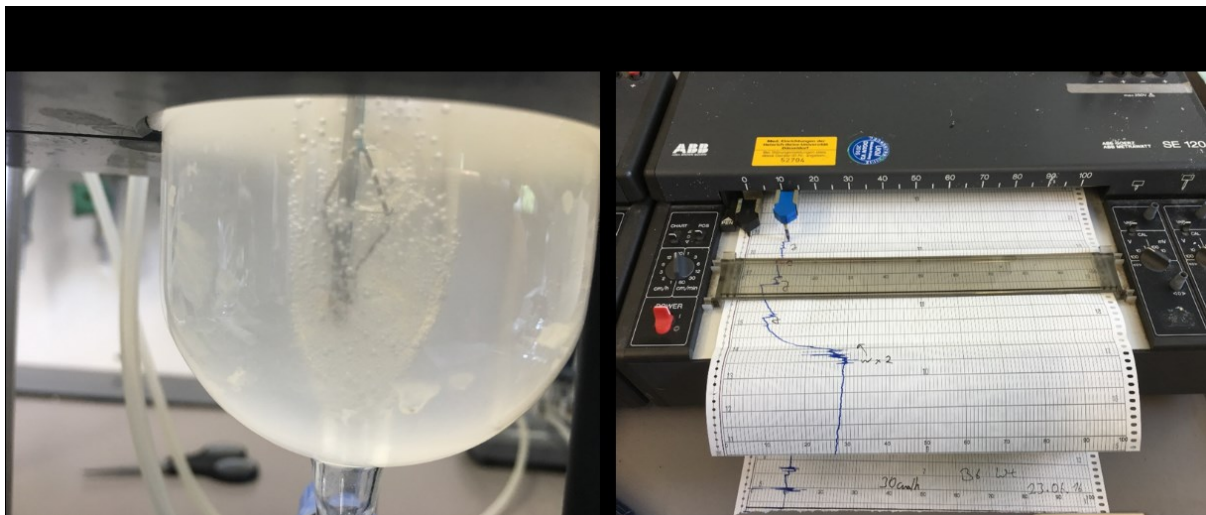


Abbildung 15: A. Das Detail eines Gefäßbades mit eingespannter Mauseaorta. B. Verstärker und Schreiber

Bei einer Registrierung der Kontraktionen der Aorta über einen Kraftaufnehmer, der an den Verstärker angeschlossen ist, wird infolge der Zugkraft diese im Messfühler registriert und über Verstärker und Schreiber aufgezeichnet.

2.6.3 Versuchsprotokoll

Die Aortenringe wurden eingespannt und über ca. 60 min äquilibriert. In der Äquilibrationsphase wurde die gewählte Vorspannung über Mikrometerschrauben eingestellt, bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan verändert. Während dessen wurde der Puffer alle 20 min ausgetauscht. Für die Überprüfung der Funktionalität der Gefäße und der Äquilibration der glatten Muskelzellen wurden die Aortenringe zweimal mit 80 mM KCl depolarisiert und somit kontrahiert. Anschließend wurde mehrmals ausgewaschen, die Vorspannung erneut eingestellt und gewartet bis sich die Gefäßspannung

nicht mehr änderte. Die endothelabhängige Relaxation wurde nach einer Testkontraktion mit 10 μM Phenylephrin überprüft. Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde zunächst mit 0,2 μM Phenylephrin vorkontrahiert und anschließend durch Zugabe von kumulativen Dosen des Azetylcholins (1 nM bis 10 μM) die Relaxation gemessen. Erst nach Erreichen des Maximaleffektes wurde die Folgekonzentration titriert. Nach Auswaschen und Äquilibration wurde die Aortenreaktivität auf Bradykinin (BK) in den Aorten der B2^{tg} und B2ⁿ durch Zugabe von kumulativen Dosen von Bradykinin (0,01 nM - 0,1 mM, Sigma-Aldrich, München) nach Vorkontraktion mit 0,2 μM -Phenylephrin überprüft. Darüber hinaus wurde der nicht-selektive COX- Inhibitor Diclofenac (10 μM) allein, Diclofenac und der selektive B2-Rezeptorantagonist Icatibant (10 μM , Sigma-Aldrich, München) oder Diclofenac (10 μM) und der NOS-Inhibitor L-Nitroargininmethyl-Ester (L-NAME, 100 μM , Sigma-Aldrich, München) 30 min vor Bradykinin Zugabe als Vorinkubation verwendet.

2.7 Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen an der Maus

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden an wachen 3 Monate alten männlichen B2^{tg}- und B2ⁿ-Mäusen mithilfe eines automatisierten Schwanzmanschetensystems (Visitech Systems, Apex) gemessen (Kojda et al., 1999). Hierbei wurde die Druckmanschette um den Schwanz der Maus gelegt (BP-2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems). Mittels einer Lichtquelle und einem Photosensor am Schwanz wurde der Blutfluss als Änderung der Lichtdurchlässigkeit gemessen und zunächst als Pulsamplitude dargestellt. Erhöht sich der Druck in der Manschette, verringert sich entsprechend die Pulsamplitude des Blutflusses. Der systolische Blutdruck entspricht dabei dem Druck der Manschette, bei dem die Amplitude für zehn Herzschläge in einem Bereich kleiner als 10 % der Ausgangsamplitude liegt. Mittels eines angeschlossenen PC und der Software 'Blood pressure analysis' (Visitech Systems, Apex, USA) wurden die Daten erfasst. Um die systolischen Blutdruckwerte für jede Maus zu erhalten wurden drei Messreihen á jeweils 10 einzelnen Messungen pro Tag von 3 aufeinanderfolgenden Tagen nach 7 Tagen Eingewöhnung zusammengefasst. Das arithmetische Mittel dieser Werte stellte den individuellen Blutdruck einer Maus dar. Die Messungen erfolgten immer zur selben Tageszeit in der Aktivphase der Mäuse (Dunkelphase). In einigen Experimenten wurden die Mäuse per oral (p. o.) mit NG-

Nitro-L-Arginin (L-NA, 100 mg·kg⁻¹ KG) für 21 Tage, gefolgt von einer kombinierten Behandlung mit L-NA (100 mg·kg⁻¹ KG) und Diclofenac (10 mg·kg⁻¹ KG) für weitere 4 Tage vermessen. Das Trinkwasser wurde täglich ausgetauscht.

2.8 Miles Assay

Der Miles Assay wurde zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität von Mäusen als Versuchsmodell verwendet. Er wurde ursprünglich von Miles und Miles entwickelt (Miles & Miles, 1952). Nach intravenöser Injektion bindet der blaue Farbstoff, Evans Blue (Sigma-Aldrich, München), an Albumin. Das Albumin kann unter physiologischen Bedingungen die Endothelbarriere nicht durchdringen, damit wird das an Evans Blue gebundene Albumin im Blutgefäß zurückgehalten. Durch ein intaktes Endothel wird die Extravasation des Farbstoffes in das benachbarte Gewebe verhindert. Unter pathologischen Bedingungen oder induzierter Extravasation durch bestimmte Substanzen wie beispielsweise Bradykinin, kann die Endothelbarriere unterbrochen werden. Dadurch verlieren die Endothelzellen teilweise ihren engen Kontakt zueinander und das Endothel wird durchlässig für Proteine wie Albumin und in dem Fall auch für das Evans Blue gebundene Albumin. Folglich kommt es zu einer Extravasation von Evans Blue gebundenem Albumin in das Gewebe, wodurch Organe mit erhöhter Durchlässigkeit eine deutlich erhöhte Blaufärbung im Vergleich zu Organen mit intaktem Endothel aufweisen. Die Gefäßdurchlässigkeit lässt sich hierdurch einfacher visualisieren und durch eine photometrische Messung quantifizieren. Die Messung erfolgte in einer Glasküvette OS 1000 und bei 620 nm, dem Absorptionsmaximum von Evans Blue im Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld). Hierfür wurde der Farbstoff aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid (Sigma-Aldrich, München) extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. Die Evans-Blue-Menge in den experimentellen Proben wurde durch Interpolation aus einer erstellten Evans Blue Kalibrierkurve berechnet. Mittels statistischer Analyse wurden signifikante Unterschiede der Gefäßpermeabilität anschließend bewertet (Radu & Chernoff, 2013; Brash et al., 2018).

2.8.1 Versuchsprotokoll

Es wurden intravenös (i. v.) und intradermal (i. d.) verschiedene Pharmaka injiziert (**Tabelle 5**) und Permeabilitätsmessungen durchgeführt. Nach der Anästhesie wurde entweder eine Mischung aus Evans Blue mit PBS oder Evans Blue mit unterschiedlichen Arzneistoffen in die Schwanzvene injiziert. 20 min später erfolgte die Erhöhung der Kapillarpermeabilität durch intradermale Injektion. Wieder 30 min später wurden die Tiere euthanasiert und das in die Haut permeierte Evans Blue quantifiziert. In einigen Experimenten wurden C57BL/6 2 Stunden vorher intraperitoneal (i. p.) mit Icatibant, Labradimil und Moexipril (jeweils Sigma-Aldrich, München) und PBS als Kontrolle behandelt und in den Akutversuch überführt. Anschließend wurde die dorsale Haut zur Quantifizierung der Extravasation präpariert.

Behandlung		Nach Vorbehandlung	Ohne Vorbehandlung	Kontroll- Gruppe	Kontroll- Gruppe	
Dosis				C57BL/6	B2 ⁿ	B2 ^{tg}
Icatibant	0,1;1 mg·kg ⁻¹ KG	x, i. p.		x	x	x
Labradimil	18 µg·kg ⁻¹ KG	x, i. p.		x		
Moexipril	0,3; 1 mg·kg ⁻¹ KG	x, i. p.		x		
Diclofenac	5 mg·kg ⁻¹ KG		x, i. v.	x	x	x
Ibuprofen	12 mg·kg ⁻¹ KG		x, i. v.	x	x	x
Rofecoxib	10 mg·kg ⁻¹ KG		x, i. v.	x		
Celecoxib	10 mg·kg ⁻¹ KG		x, i. v.	x		
SC560	5;10 mg·kg ⁻¹ KG		x, i. v.	x		

Tabelle 5: Arzneistoffe die entweder als intraperitoneale Vorbehandlung oder intravenös direkt mit Evans Blue verschiedenen Mäusen injiziert worden sind

2.8.1.1 Akutversuche

Nach der Betäubung mit Rompun (5 mg·kg⁻¹ KG, Bayer) und Ketanest (100 mg·kg⁻¹ KG, Pfizer) intraperitoneal (i. p.) wurde intravenös (i. v.) in die Schwanzvene eine Kombination aus steril hergestelltem Evans-Blue (30 mg·kg⁻¹ KG in 100 µl PBS) und einem Arzneimittel aus **Tabelle 3** injiziert. Während der 20-minütigen Einwirkzeit wurden die Rückenhaare rasiert (**Abbildung 16 A**). Die restlichen Haare wurden mit einer Enthaarungscreme entfernt (ISANA sensitiv, Rossmann, **Abbildung 16 B**). Anschließend wurden an 4 verschiedenen Stellen der Haut intradermal 30 µl mit einer 27G Nadel PBS (Vehikel), Bradykinin (0,2 nmol, 0,6 nmol, 1 nmol oder 2 nmol), Histamin

(2 nmol; Sigma-Aldrich, München), Labradimil (0,2 nmol, 0,6 nmol, 1 nmol oder 2 nmol; Sigma-Aldrich, München) und eine Mischung aus Bradykinin-Icatibant (jeweils 2 nmol) appliziert (**Abbildung 16 C**). 30 min nach der intradermalen Behandlung wurden die Tiere euthanasiert.



Abbildung 16: A. Ein elektrisches Rasiergerät und die anästhesierte Maus. B. Maus nach einer groben Rückenrasur und aufgetragener Enthaarungscreme. C. Nach der Rasur, Enthaarung des Rückens und der intradermalen Injektion von 30 µl PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (2 nmol).

2.8.1.2 Versuche nach Vorbehandlung

Einige C57BL/6 Mäuse wurden zwei Stunden vorher mit Icatibant, Moexipril, Labradimil oder PBS intraperitoneal als Kontrolle behandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Tiere den Akutversuchen (siehe oben) zugeführt. Intravenös wurde nur noch Evans-Blue ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ in 100 µl PBS) injiziert (**Tabelle 6**).

2 Stunden vorher	Injektion	20 min	50 min
1.mit Vorbehandlung	Narkose+Inj	Injektion i.d	Töten der Tiere
2.ohne Vorbehandlung	Narkose+Inj	Injektion i.d	Töten der Tiere

Tabelle 6: Ablauf der Versuche

2.8.1.3 Quantifizierung von Evans Blue

30 min nach der intradermalen Injektion wurde die Maus durch zervikale Dislokation euthanasiert. Für die Quantifizierung der Extravasation wurde die dorsale Haut ausgeschnitten und umgedreht (**Abbildung 17 A**) um die Injektionsstellen zu erkennen. Daraufhin wurden die Stellen der intradermalen Injektion mit einem 9 mm breitem speziellen kreisförmigen Fräser ausgestanzt (**Abbildung 17 B, C**). Die kreisförmigen Hautstücke wurden gewogen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) überführt. Die

Extraktion von Evans Blue aus den Hautstücken erfolgte durch Zugabe von N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, München), über Nacht, lichtgeschützt in einem Eppendorf Thermomixer comfort bei 750 xg und 56 °C. Die Quantifizierung des Farbstoffgehalts geschah photometrisch bei 620 nm in einem Beckman DV 640 Spektrometer unter Verwendung einer Glasküvette OS 1000. Anhand einer Kalibrierkurve wurde die Menge des in die Haut permeierende Evans Blue ermittelt.



Abbildung 17: A. Abbildung der dorsalen Haut einer Maus nachdem sie ausgeschnitten und umgedreht wurde. B. Spezieller kreisförmiger Fräser mit einer Öffnung zum Ausstanzen der Injektionsstellen. C. Dorsalen Haut einer Maus nach dem Ausstanzen der Hautproben mit dem speziellen Fräser.

2.8.1.4 Kalibrierkurve

Zunächst wurde eine Evans Blue Stammlösung (30 mg / ml) hergestellt. Diese Stammlösung wurde mit Formamid (1:1000, Sigma-Aldrich, München) verdünnt, so dass eine $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Evans Blue Lösung entsteht. Durch weitere Verdünnungen mit Formamid wurden 8 Evans blue-Konzentrationen hergestellt ($12,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $6,45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3,225 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1,6125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,806 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,403 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,2015 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Menge an Evans blue in den experimentellen Proben wurde durch Interpolation aus der Standardkurve (**Abbildung 18**) berechnet und auf das Gewicht ihrer entsprechenden Hautstücke bezogen.

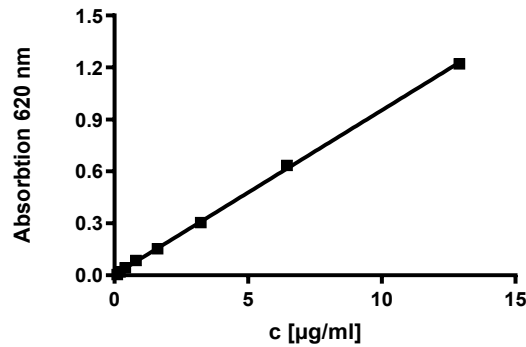


Abbildung 18: Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration von Evans Blue aus den ausgestanzten runden Hautstücken der dorsalen Haut der Maus

2.9 Two Photon-Laser-Scanning-Mikroskopie (TPLSM)

Mithilfe des oben beschriebenen Miles Assays ist es nicht möglich die spontan ablaufende physiologische Extravasation zu untersuchen. Dagegen ermöglicht die TPLSM eine Quantifizierung der Endothelpermeabilität in lebendem Gewebe. Erst durch die Kombination von Multiphotonentechnik und Intravitalmikroskopie wurde es möglich, Interaktionen von Geweben und Zellen in vivo unter physiologischen Bedingungen über verschiedene Zeiträume zu beobachten (Cahalan et al., 2002). Das auf dem Prinzip der Zwei-Photonen Anregung durch ein gepulstes Nahinfrarot-Laser System, ermöglicht Fluoreszenzaufnahmen von optischen Schichten mit subzellulärer Auflösung bis zu 1000 μm Tiefe in intaktem Gewebe (Theer et al., 2003). Daher kann tiefer in das streuende Gewebe eingedrungen werden und somit können tiefe Bildaufnahmen entstehen. Durch die Abtastung des Lasers der Oberfläche in der eingestellten Ebene über einen definierten Tiefenbereich werden Bildstapel erstellt. Diese Bildstapel sind für die räumliche Rekonstruktion notwendig, um fluoreszierende Strukturen in 3D zu visualisieren. Die erzeugten 3D-visualisierten fluoreszierenden Strukturen können in Echtzeit beobachtet werden (Potter, 1996). Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wird jedoch nur eine Eindringtiefe von 50–80 μm erzielt. Bei TPLSM wird rotverschobenes Anregungslicht verwendet, welches Fluoreszenzfarbstoffe anregen kann. Die Anregung des Elektrons wird durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen hervorgerufen. Die Hintergrundsignale werden durch die Mehrphotonenabsorption unterdrückt. Dies führt zu einer effizienten Lichtdetektion, einer reduzierten Phototoxizität und schließlich einer bis zu 1000 μm tieferen Gewebepenetration (Denk et al., 1990). Zur Visualisierung der Gefäßdurchblutung und der Extravasion unter

physiologischen Bedingungen in intaktem Zustand wurden 8-12 Wochen alte männliche Mäuse der Linien C57Bl/6, B2^{tg} und B2ⁿ intraperitoneal mit einer Mischung von Rompun (5 mg·kg⁻¹ KG; Bayer) und Ketavet (100 mg·kg⁻¹ KG; Pfizer) anästhesiert. Die Betäubung hat eine Wirkungszeit von 30–40 min, eine erforderliche Nachdosierung erfolgte mit einem Drittel der Ausgangsdosis. Die anästhesierte Maus wurde zunächst auf eine speziell hergestellten Einlegeapparat im Bereich der Einstichstelle gut fixiert und ggf. mit einer Wärmelampe bestrahlt (**Abbildung 19 A, B**). Dabei wurde die Maus leicht dorsal gedreht und das Ohrläppchen mit Gewebekleber fixiert (**Abbildung 19 C**).

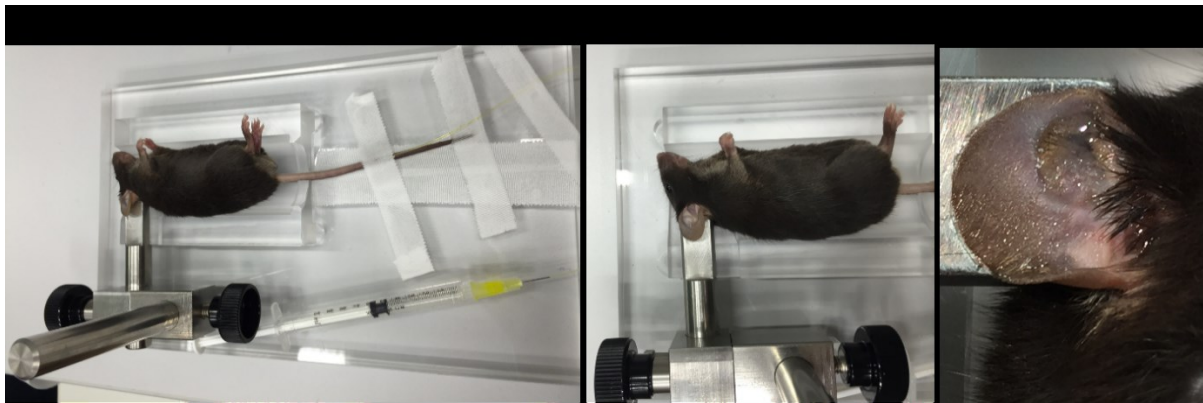


Abbildung 19: A. Die anästhesierte Maus wurde auf einer speziell hergestellten Einlege-Apparatur an der Schwanzvene fixiert.

Die Injektion erfolgte mittels eines speziell angefertigten Katheters (20 cm langer Schlauch), an dessen Spitze eine 30G Kanüle (BD Microlance) befestigt und am Ende eine 1 ml Insulin Spritze angebracht wurde B. Das Ohr der Maus wurde mit Gewebekleber an die Apparatur fixiert. C. Nahaufnahme des mit Gewebekleber fixierten Ohrläppchens.

Mittels zweier Magneten wurde ein Deckglas auf dem Ohrläppchen befestigt (**Abbildung 20 A**). Die zufällig ausgewählte Position im inneren Teil des Ohrläppchens wurde mit einem Olympus FV1000MPE Two-Photon-Laser (Tokyo, Japan) gemessen (**Abbildung 20 B, C**). Die Mäuse erhielten zwei verschiedene fluoreszierende Farbstoffe unterschiedlichen Molekulargewichts, einen grünen Fluoreszenzfarbstoff mit 250 kDa Dextran (Fluorescein Isothiocyanate-Dextran [FITC-Dextran], Sigma-Aldrich, München, 1,5 mg in 50 µl), der das endotheliale Lumen nicht verlassen kann und einen roten Fluoreszenzfarbstoff mit 10 kDa Dextran (Alexa Fluor® 594 Dextran, Fisher Scientific, Schwerte, 250 µg in 50 µl), der die Endothelbarriere im Laufe der Zeit leicht durchläuft. Die Photomultiplier wurden abhängig auf die jeweiligen Emissionsspektren der zwei verwendeten Fluorochrome eingestellt (FITC Dextran: 495–530 nm; Alexa Fluor® 594 Dextran: 590–650 nm). Die Injektion erfolgte mittels eines speziell angefertigten Katheters (20 cm langer Schlauch), an dessen Spitze eine 30G-Kanüle (BD

Microlance) befestigt und am Ende eine 1 ml Insulin Spritze angebracht wurde (**Abbildung 19 A**). Als Lösungsmittel diente in beiden Fällen NaCl (0,9 %, Braun).

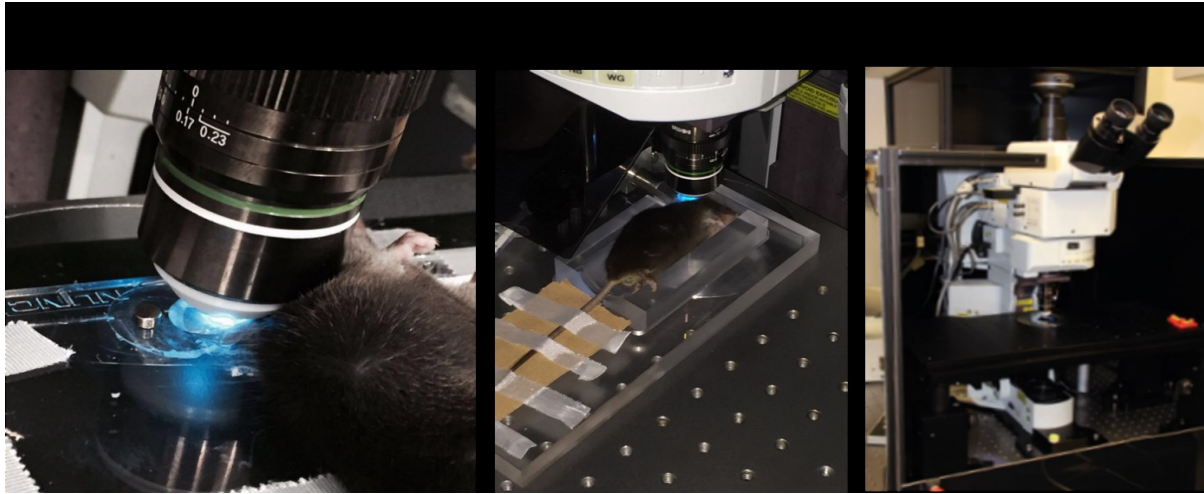


Abbildung 20: TPLM: A. Mittels zweier Magneten wurde das Ohrläppchen mit einem Deckglas darüber fixiert und nach Injektion von FITC-Dextran ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, in $50 \mu\text{l}$ 0,9 % NaCl) und Alexa 594 Dextran ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, in $50 \mu\text{l}$ 0,9 % NaCl) B. wurde die zufällig ausgewählte Position im inneren Teil des Ohrläppchens mit einem C. Olympus FV1000MPE Two-Photon-Laser (Tokyo, Japan) gemessen.

Mittels des grünen Fluoreszenzsignales (250 kDa Fluorophors) wurden die Blutgefäße zunächst visualisiert (**Abbildung 21 A**) und das Objektiv positioniert. Der rote Farbstoff wurde injiziert, sobald eine geeignete, stabile Aufnahme des grünen Farbstoffes möglich war (das heißt kein Wandern bzw. Absacken im Fokusbereich sowie gut sichtbare Fluoreszenz). Um die Extravasation zu visualisieren, wurden alle 30 Sekunden über 60 min nach Injektion des rot markierten Fluoreszenzfarbstoffs kinetische Zeitreihen nachfolgender Bildstapel aufgezeichnet (**Abbildung 21 B, C, D**). Jeder Rahmen bestand aus acht Teilen, die aus nacheinander gescannten $3 \mu\text{m}$ dicken Gewebeschnitten in unterschiedlichen Tiefen bestanden. Die 3D-Rekonstruktionen und Bildanalysen wurden mit Imaris Software (Bitplane, Zürich, Schweiz) durchgeführt. Die Software war in der Lage, den Gefäßraum anhand des Signals des 250 kDa-Fluorophors zu identifizieren, dass während der gesamten Aufzeichnung im Gefäßlumen verblieb. Daraus ließen sich dann Berechnungen für den 10 kDa-Fluorophor durchführen, der im Gegensatz zum 250 kDa-Fluorophor im gleichen definierten Gefäßraum allmählich an Intensität verlor. In einigen Experimenten erhielten Mäuse vor dem Eingriff $0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ Moexipril oder $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ Icatibant intraperitoneal. Anschließend wurde das Versuchstier durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet.

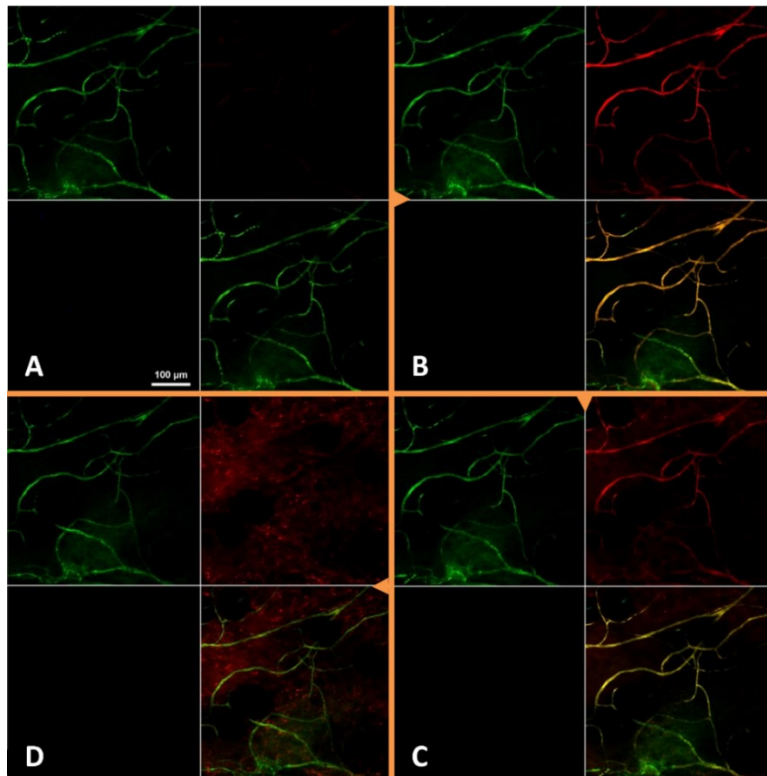


Abbildung 21: Die Abbildung zeigt kleine dermale Blutgefäße des Ohrs einer anästhesierten C57BL/6-Maus.

Hierbei wird etwa 200 µm unter der Oberfläche aufgenommen. Die Mäuse bekamen eine 1,5 mg i. v. Injektion des 250 kDa Dextran und grün fluoreszierenden Chromophor. In jedem der vier Bilder zeigt der obere linke Quadrant eine grüne Fluoreszenz, der obere rechte Quadrant eine rote Fluoreszenz und der untere rechte Quadrant die Überlagerung in Gelb (der untere linke Quadrant ist ein leerer Kanal). Die Aufzeichnungen wurden in A. nach der Injektion des 250 kDa Dextran und grün fluoreszierenden Chromophor und vor der Injektion von 250 µg des 10 kDa Dextran, markiert mit einem rot fluoreszierenden Chromophor, gemacht. B. wurde nach der Injektion von 250 µg des 10 kDa Dextran, markiert mit einem rot fluoreszierenden Chromophor und vor der Extravasation (Zeitpunkt 0 min) aufgenommen. C. Die Extravasation nach 10 min wird durch die roten Wolken um die Gefäße dargestellt. D. Die Extravasation nach 45 min (hierbei wurde die intravaskuläre Überlagerung wieder grün).

2.10 ABRASE-Studie

Um herauszufinden, ob sich die Ergebnisse aus den Tierversuchen auf den Menschen übertragen lassen, wurde eine multizentrische klinische Studie „A Bradykinin in Skin Edema Trial (ABRASE)“ mit 30 gesunden Probanden an folgenden drei verschiedenen Zentren in Deutschland durchgeführt:

- Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
- Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Ulm

- Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München

Die Genehmigung für diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität erteilt (Studennummer im klinischen Studienregister der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf: 2015-11-4583, Abstimmungsnummer der Ethikkommission: 5339R). Jeder Proband musste nach einer ausführlichen Aufklärung und vor der Teilnahme an der Studie eine Einverständniserklärung unterschreiben. Eingeschlossen wurden gesunde männliche als auch weibliche erwachsene Probanden mit einer intakten Haut am Unterarm. Ausschlusskriterien waren akute oder chronische Erkrankungen wie Allergien oder Dermatitis als auch die Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten innerhalb der letzten sieben Tage. Schwangere oder stillende Frauen wurden in dieser Studie nicht erfasst.

2.10.1 Versuchsverlauf

Die Studie wurde über zwei Tage durchgeführt. Während des gesamten Versuchs saßen die Probanden entspannt an einem Tisch (Raumtemperatur 21–23 °C) und legten den Unterarm auf eine medizinische Unterlage (MoliNea S, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland), so dass die Innenseite des Unterarms nach oben zeigen konnte (**Abbildung 22**). Der Unterarm wurde mit Kodan® forte (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Jeder Proband bekam zwei intradermale Injektionen in die Innenseite des Unterarms. Nach 15 Sekunden Einwirkzeit wurde die Wirkung jeder intradermalen Injektion von 18,9 nmol Bradykinin gelöst in 20 µl einer 0,9 % sterilen isotonischen NaCl-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) mit der Wirkung einer intradermalen Injektion von 20 µl 0,9 % NaCl (interne Kontrolle, Placebo) verglichen. Die intradermalen Injektionen wurden an zwei unterschiedlichen Stellen des inneren Unterarms appliziert. Ein Abstand zwischen den Injektionsstellen von ca. 3–4 cm wurde eingehalten. Wenn eine Spritze in die Innenseite des Unterarms verabreicht wurde, wurde die Spritze fast parallel zum Unterarm ausgerichtet, um besser sicherzustellen, dass das Arzneimittel zwischen die Hautschichten gelangt. Für jede Injektion wurde eine neue sterilisierte

Hamilton™-Spritze verwendet (Hamilton Syr 50 µl, 1705 LT, DURATEC GmbH, Hockenheim). Die erste Messung der entwickelten Quaddelgröße erfolgte 5 min nach Injektion der Bradykinin-Lösung, weitere Messungen nach 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min. Genau 180 min nach den ersten intradermalen Injektionen nahmen die Probanden oral 600 mg Ibuprofen (IbuHEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen) ein. Weitere 60 min später wurde das gleiche Verfahren wie oben beschrieben über einen Zeitraum von 120 min gemessen. Am darauffolgenden Tag erfolgte das gleiche Procedere mit dem COX-2-Hemmer Celecoxib (Celebrex 200 mg Axicorp Pharma, Friedrichsdorf).

2.10.2 Messung und Berechnung der Quaddel

Durch die intradermale Injektion entsteht eine tastbare Quaddel. Die Messung der Quaddelgröße erfolgte mittels einer Schieblehre in mm an der Stelle der größten (GA) und der Stelle der kleinsten Ausdehnung (KA) (**Abbildung 22**). Aus diesen Werten wurden der mittlere Durchmesser ($d = (GA+KA)/2$) sowie der Umfang ($U = \pi d$) und die Gesamtfläche der Quaddel ($A = \pi d^2/4$) berechnet.

$$\text{Mittlerer Durchmesser: } d = ((GA+KA)/2)$$

$$\text{Umfang } U = \pi \times d$$

$$\text{Kreisfläche } A = (\pi \times d^2/4).$$

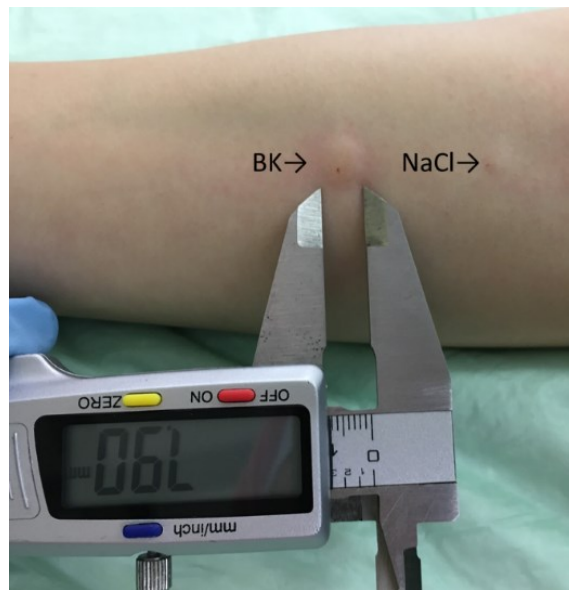


Abbildung 22: Beispiel für Quaddeln nach intradermaler Injektion von 18,9 nmol Bradykinin und 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl) in den oberen inneren Unterarm eines Probanden.

Die Messung der Quaddelgröße erfolgte mittels einer Schieblehre in mm an der Stelle der größten und der Stelle der kleinsten Ausdehnung.

2.10.3 Dokumentation und Endpunkte der Studie

Die Erfassung der Probandendaten erfolgte mittels standardisierten Dokumentationsblättern, sowie photographischer Dokumentation mit aufgelegtem Lineal zu jedem Zeitpunkt der Vermessung.

Der primäre Endpunkt war die Zeit in min bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel. Der sekundäre Endpunkt war eine Änderung der mittleren maximalen Quaddelgröße in mm^2 vor als auch nach der Einnahme von Ibuprofen oder Celecoxib im Verlauf der Untersuchungszeit von zwei Stunden. Die maximale Quaddelgröße wurde als der höchste berechnete Wert der Gesamtfläche der Quaddel innerhalb des gemessenen Zeitraums definiert.

2.11 Statistik

Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte $\pm$ Standardfehler angegeben, wobei n die Anzahl der Versuche bezeichnet. Sowohl die statistische als auch die grafische Auswertung wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism, Version 6.07 (La Jolla, CA, USA) analysiert. Die Daten und die statistische Analyse entsprechen den Empfehlungen zum experimentellen Design und zur Analyse in der Pharmakologie (Curtis et al., 2015). Statistische Vergleiche zwischen Gruppen erfolgten entweder mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-tests oder einer einfaktoriellen Varianzanalyse dem Tukey's multiple comparison post hoc test nach einer One-way ANOVA (für mehr als zwei Gruppen). Um bei der klinischen Studie den zeitlichen Verlauf von drei oder mehr Behandlungsgruppen zu vergleichen, wurde eine Two-way ANOVA verwendet. In diesem Fall wurde der Šídák-multiple-comparison-Post-hoc-Test angewendet. Der primäre Endpunkt von ABRASE ergab einen nicht parametrischen Datensatz. Die Daten wurden durch einen Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Test analysiert. Änderungen der Quaddelgröße vor und nach der Intervention mit COX-Inhibitoren (sekundärer Endpunkt) wurden durch gepaarten zweiseitigen t-Test berechnet. Die Änderung der Quaddelgröße über die Zeit wurde durch Two-way-ANOVA und anschließend mit Šídák-multiple comparison-Post-hoc-Test analysiert. Ein $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der B2^{tg}-Maus

Um den Zusammenhang des B2-Rezeptors und der vaskulären Permeabilität in den Versuchstieren untersuchen zu können, wurde zunächst eine transgene Mauslinie generiert. Bei der B2^{tg} kommt es zu einer endothelspezifischen Überexpression des humanen B2-Rezeptors. Dieser steht unter der Kontrolle des murinen Tie-2-Promotors, sowie einem 10 kbp großem Fragment des ersten Introns des Tie-2-Gens (Tie-2-Enhancer), welcher für die endothelspezifische Expression in adulten Mäusen wichtig ist (Dao, 2011).

3.1.1 B2-Proteinexpression in der Aorta und der Lunge der B2^{tg}

Zur Überprüfung der B2-Proteinexpression in der transgenen Mauslinie mit endothelialer Überexpression des humanen Bradykinin-B2-Rezeptors (B2^{tg}) und der Spezifität des monoklonalen anti-B2-Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK) wurden sowohl Aorten- als auch Lungenhomogenate der B2^{tg} im Vergleich zur C57BL/6 verwendet. Zur Detektion des B2-Rezeptors wurden Western Blots, wie unter 2.3.3 beschrieben, durchgeführt. In Aortengewebe der B2^{tg} konnte eine zweite Bande nur wenig unterhalb des murinen B2-Rezeptorsignals nachgewiesen werden. Die Bande wurde ausschließlich bei B2^{tg}-Mäusen beobachtet und konnte bei der C57BL/6 nicht nachgewiesen werden (s. **Abbildung 23 A**). Überraschenderweise zeigte die Western-Blot-Analyse im Lungengewebe der B2^{tg}- als auch in der C57BL/6-Maus (Aorten und Lungenhomogenate) keinen Unterschied in der B2-Rezeptor-Expression (s. **Abbildung 23 B**). **Abbildung 23 C** zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied der B2-Rezeptorproteinexpression in Aortenhomogenaten zwischen der B2^{tg} und der C57BL/6 ($n = 5$, $*P < 0.05$ One-way-ANOVA). Dieser Unterschied konnte im Lungengewebe der B2^{tg} nicht bestätigt werden ($n = 5$, One-way ANOVA, nicht signifikant gegen C57BL/6).

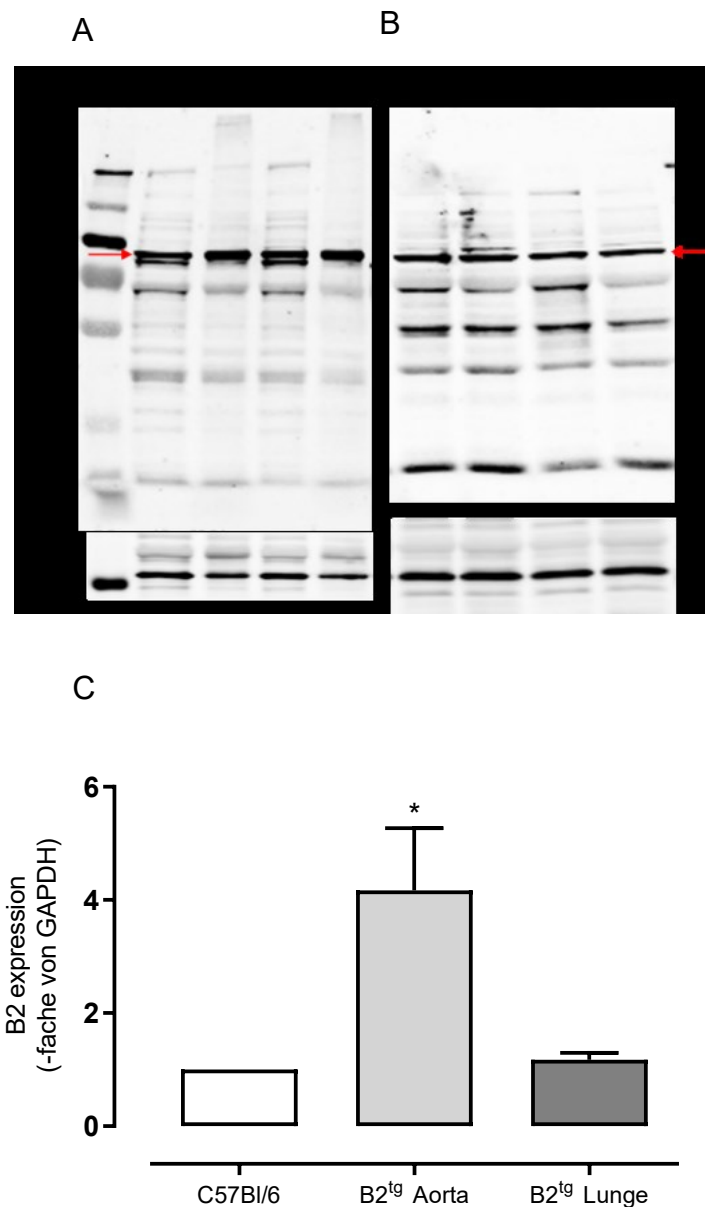


Abbildung 23: Representatives Beispiel für einen vollständigen Western Blot, der die Expression von B2-Rezeptorproteinen in Aortengewebe und im Lungengewebe der B2^{tg} und C57BL/6 zeigt (die linke Protein Leiter ist in kDa angezeigt).

Die roten Pfeile zeigen die B2-Rezeptorsignale an, die mit dem monoklonalen anti-B2 Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) detektiert wurden. Die unteren GAPDH- Signale wurden bei 36 kDa mit einem anderen sekundären Antikörper nachgewiesen und sind separat dargestellt. A. Im Aortengewebe konnte eine zweite Bande nur wenig unterhalb des murinen B2-Rezeptorsignals nachgewiesen werden. Die zweite Bande konnte ausschließlich in B2^{tg} Mäusen beobachtet werden. B. Allerdings konnte im Lungengewebe kein Unterschied in den Signalen zwischen B2^{tg}- und C57BL/6 Mäusen detektiert werden. C. Quantitative Evaluierung der Western-Blots. B2-Rezeptorproteinexpression in Aorten- und im Lungengewebe der B2^{tg} Maus im Vergleich zur C57BL/6 (n = 5, nicht signifikant versus Lunge, *P < 0.05 versus Aorta, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way-ANOVA).

3.1.2 B2-Rezeptor-mRNA-Expression in der Lunge der B2^{tg}

Für die Quantitative realtime-PCR wurden Lungenhomogenate der B2^{tg} wie unter 2.4.1 aufbereitet. Es wurden Primer verwendet, die für die humane- oder für die murine-B2-Rezeptor-cDNA spezifisch sind. Das Ergebnis war eine 16,4-fache höhere hoch signifikante Expression des humanen B2-Rezeptors in B2^{tg} Mäusen, während in transgennegativen Geschwistertieren (B2ⁿ) keine Expression humaner B2-Rezeptoren nachweisbar war ($n = 6$, nicht signifikant, One-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus murine B2-Rezeptor mRNA, Tukey's Multiple Comparison Test, **Abbildung 24**). Darüber hinaus veränderte die stark erhöhte Expression des humanen B2-Rezeptors nicht die Expression des murinen B2-Rezeptors in B2^{tg} Mäusen. Was darauf hindeutet, dass der humane B2-Rezeptor keinen Einfluss auf die murine B2-Rezeptorexpression hat. Basierend auf den B2-Rezeptor mRNA Ergebnissen in der Lunge der B2^{tg} Maus liegt es nahe zu vermuten, dass der Nachweis des humanen B2-Rezeptorproteins im Lungengewebe möglicherweise maskiert war.

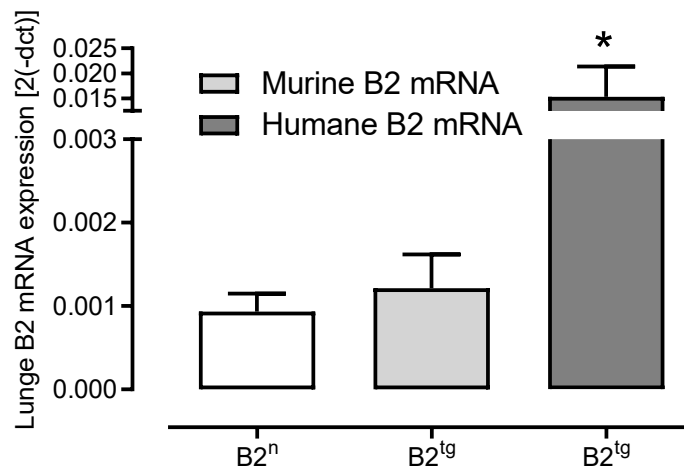


Abbildung 24: Quantitative Auswertung der Realtime-RT-PCR-Messung in den Lungengeweben. Expression der murinen und humanen B2-Rezeptor mRNA, die aus den Lungengeweben der B2^{tg} und ihren transgennegativen Geschwistertieren B2ⁿ isoliert wurde.

Es gab eine starke Expression der humanen B2-Rezeptor mRNA in B2^{tg} Mäusen, während in den B2ⁿ Geschwistertieren keine Signale gesehen wurden. Trotz der 16,4-fach stärkeren Expression der humanen B2-Rezeptor-mRNA in den B2^{tg} gab es keinen Unterschied in der murinen B2-Rezeptor mRNA zwischen B2ⁿ und B2^{tg} ($n = 6$, nicht signifikant, One-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus murine B2-Rezeptor-mRNA, Tukey's Multiple Comparison Test).

3.1.3 Morphologische Daten der B2^{tg}

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von B2-Rezeptoren die Plasmaextravasation beeinflusst, wurde das Feuchtgewicht in den B2^{tg}- und den B2ⁿ Geschwistertieren vermessen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden ($n = 6$, nicht signifikant, Student unpaired t-Test, **Tabelle 7**). Ebenso gab es keinen Unterschied im Prozentsatz des Lungen- und Herzgewichtsverlusts zwischen B2ⁿ und B2^{tg} nach dem Trocknen der Gewebeproben. Hierbei wurde festgestellt, dass der Lungen- und Herzwassergehalt identisch war.

Parameter (mean $\pm$ SEM)	B2 ⁿ	B2 ^{tg}
Körpergewicht (KG), g	30.2 $\pm$ 1.1	29.5 $\pm$ 0.7
Linksventrikuläres Myokardgewicht (LVG), mg	110.7 $\pm$ 4.7	102.9 $\pm$ 4.0
LVG / KG, mg·g ⁻¹	3.5 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1
Lungengewicht, mg	162.5 $\pm$ 7.0	182 $\pm$ 6.7
Lungenwassergehalt, %	79.7 $\pm$ 1.9	81.7 $\pm$ 2.2
Herzgewicht, mg	151.5 $\pm$ 4.5	149.9 $\pm$ 3.1
Herzwassergehalt, %	77.5 $\pm$ 2.2	72.4 $\pm$ 3.5

Tabelle 7: Morphologische Daten von B2^{tg} im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren B2ⁿ.

Es konnte kein signifikanter Unterschied erfasst werden ($n = 6$, nicht signifikant, Student unpaired t-Test).

3.1.4 Veränderung der vaskulären Bradykinin-Aktivität in B2^{tg}

Um die funktionelle Aktivität und Bedeutung der humanen endothelspezifischen B2-Rezeptor-Expression in B2^{tg} auf das vaskuläre System zu untersuchen, wurden Organbadexperimente durchgeführt. Für die Versuchsdurchführung wurden die Aortenringe zwischen zwei triangelförmig gebogene Drähte eingespannt. Die Aortenreaktivität auf Bradykinin wurde in den Aorten B2^{tg} und B2ⁿ durch Zugabe von Bradykinin und durch Vorinkubation mit Diclofenac, Icatibant und dem NOS-Inhibitor L-Nitroargininmethyl-Ester (L-NAME) untersucht.

Frühere Experimente in C57BL/6 haben gezeigt, dass Bradykinin konzentrationsabhängige Verengungen von Aortenringen mit maximaler Wirkung bei 1 μ M Bradykinin Gabe induziert, die mit 0,2 μ M Phenylephrin leicht vor kontrahiert waren (Khosravani et al., 2015). Weiterhin führte die Entfernung des Endothels zu einer starken Reduktion

der maximalen Verengung, während die Behandlung mit L-NAME die kontraktile Reaktion verstärkte. Die Bradykinin-bedingte Kontraktion wurde durch Icatibant und Diclofenac vollständig gehemmt, was darauf hindeutet, dass sie durch die Aktivierung endothelialer B2-Rezeptoren vermittelt wird und von der COX-Aktivität abhängt (Khosravani et al., 2015). Weitere Organbadversuche in den Aortenringen der B2ⁿ zeigten durch eine kumulative Titration von Bradykinin (0,01 nM -0,1 mM) eine B2-Rezeptor vermittelte erhöhte Bradykinin-induzierte vaskuläre Kontraktion (n = 9, P < 0.05, Two-way ANOVA, *P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test, **Abbildung 25**) und eine signifikante verminderte Bradykinin-induzierte vaskuläre Kontraktion nach einer Vorinkubation mit 10 µM Diclofenac (**P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test). In B2^{tg} Mäusen wurde zwar eine geringe, jedoch nicht signifikante Verminderung der maximalen Verengung nach kumulativer Applikation von Bradykinin im Vergleich zu ihren transgennegativen Geschwistertieren festgestellt (n = 9; P > 0.05, Šídák Multiple Comparison Test). Im Gegensatz zu ihren transgennegativen Geschwistern B2ⁿ wurde eine signifikante Aortendilatation in B2^{tg} nach Vorinkubation mit Diclofenac (n = 9, #P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test, **Abbildung 25**) gefunden.

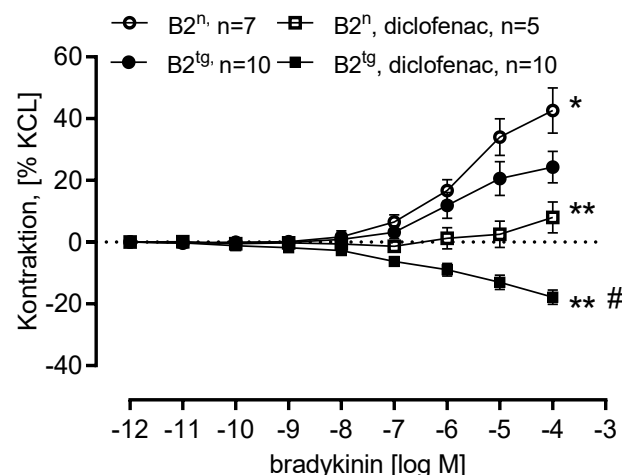


Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Organbadversuche. Vaskuläre Reaktivität auf steigende Bradykinin-Konzentrationen der Maus-Aortenringe, die leicht mit Phenylephrin (0,2 µM) vorverengt sind.

A. Bradykinin-induzierte einen Anstieg des Gefäßtonus, der in B2ⁿ signifikant stärker war (n = 9, P < 0.05, Two-way ANOVA, *P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test) und durch Vorinkubation mit 10 M Diclofenac signifikant verringert wurde (n = 9, **P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA). In B2^{tg} wurde eine Vasodilatation mit Diclofenac vorinkubierten Aortenringen beobachtet, die einen signifikanten Unterschied zu B2ⁿ zeigte (n = 9, #P < 0.05 Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA).

Die Aortendilatation in B2^{tg} nach Vorinkubation mit Diclofenac konnte durch das Entfernen des Endothels der Aortenringe oder der Inkubation mit dem NOS-Hemmer L-NAME (100 μ M) als auch der Inkubation mit dem B2 Blocker Icatibant (10 μ M) vollständig aufgehoben werden ($n = 9$, $P < 0.05$ Two-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus Vorbehandlung mit Diclofenac/L-NAME und Diclofenac/Icatibant oder Diclofenac/Entfernung des Endothels, Šídák Multiple Comparison Test, **Abbildung 26**). Diese Daten weisen darauf hin, dass die B2-Rezeptor Überexpression in Leitungsgefäßen von B2^{tg} funktionell aktiv ist und dass die Diclofenac bedingte Dilatation in B2^{tg} durch die Aktivierung endothelialer B2-Rezeptoren vermittelt wird und von der COX-Aktivität abhängt. In ähnlicher Weise tritt in Aortenringen von B2ⁿ- und B2^{tg}-Mäusen eine funktionell aktive NO-Erzeugung als Antwort auf Bradykinin auf.

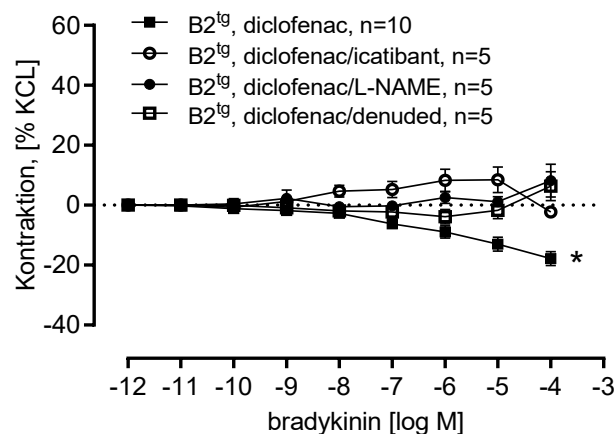


Abbildung 26: Quantitative Auswertung der Organbadversuche.

Vaskuläre Reaktivität auf steigende Bradykinin-Konzentrationen der Maus-Aortenringe, die leicht mit Phenylephrin (0,2 μ M) vorverengt sind. Die in Diclofenac vorinkubierten Aortenringen der B2^{tg} beobachtete Vasodilatation, wurde durch B. Entfernen der Endothelzellen in den Aortenringen der B2^{tg}, Vorinkubation mit 10 μ M Icatibant oder 100 μ M L-NAME aufgehoben ($P < 0.05$ Two-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus Vorbehandlung oder Entfernung der Endothelzellen, Šídák Multiple Comparison Test).

3.1.5 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung in der B2^{tg}

3.1.5.1 Blutdruckmessung

Wie in **Abbildung 27** dargestellt, führte die Überexpression des B2-Rezeptors zu einer signifikanten Verringerung des systolischen Blutdrucks bei wachen Mäusen ($n = 6$,

$P < 0.05$, One-way ANOVA, $*P < 0.05$ Tukey's Multiple Comparison Test). Um zu beurteilen, ob die Überexpression von B2-Rezeptoren die Bioverfügbarkeit von endogenem NO verändert, wurden B2^{tg}- und B2ⁿ-Mäuse 7 Tage lang mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NA behandelt. Wie erwartet erhöhte L-NA den Blutdruck signifikant bei B2ⁿ und B2^{tg} ($n = 6$, $\#P < 0.05$ Tukey's Multiple Comparison Test). Der prozentuale Anstieg war jedoch zwischen den Stämmen nicht unterschiedlich, da sich der bei B2ⁿ Mäusen beobachtete Anstieg des Blutdrucks um $16,9 \pm 2,9 \%$ nicht signifikant von dem Anstieg des Blutdrucks um $12,5 \pm 2,8 \%$ bei B2^{tg} unterschied (jeweils $n = 6$, Student's t-Test). Die Zugabe von Diclofenac in das L-NA-Trinkwasser für 4 Tage führte zu keiner weiteren signifikanten Veränderung des systolischen Blutdrucks bei beiden Stämmen.

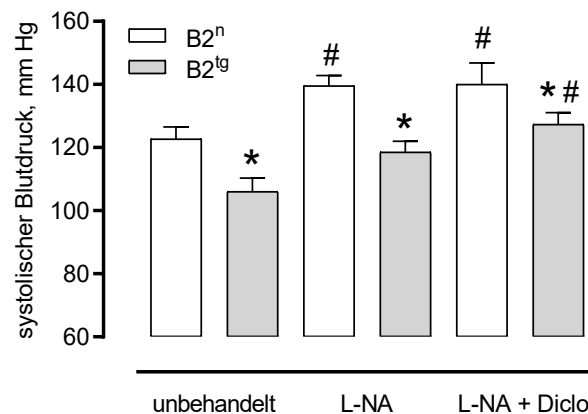


Abbildung 27: Effekte von L-NA und die Kombination von L-NA und Diclofenac auf den systolischen Blutdruck von transgennegativen B2ⁿ und transgenpositiven B2^{tg} Mäusen.

Die Überexpression des B2-Rezeptor Transgens führte zu einer signifikanten Senkung des systolischen Blutdrucks (jeweils $n = 6$, $P < 0.05$, One-way ANOVA, $*P < 0.05$ Tukey's Multiple Comparison Test). Die 7 tägige orale Behandlung mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) erhöhte den systolischen Blutdruck signifikant (jeweils $n = 6$, $\#P < 0.05$ Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA). Allerdings blieb der Unterschied des systolischen Blutdrucks zwischen den Stämmen unverändert. Eine zusätzliche 4 tägige orale Behandlung mit Diclofenac ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) hatte keine weitere Wirkung.

3.1.5.2 Herzfrequenzmessung

Im Gegensatz zu den erhobenen Blutdruckdaten in B2^{tg} kam es zu keiner veränderten Herzfrequenz im Transgen (**Abbildung 28**), während die Behandlung mit L-NA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) oder die Kombination von L-NA und Diclofenac ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{KG}$) in beiden Stämmen (B2^{tg} und B2ⁿ) zu einer signifikanten Verringerung der Herzfrequenz führte (jeweils $n = 6$, $*P < 0.05$, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA). Außerdem gab es keine Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen den

Stämmen nach der Behandlung mit L-NA oder einer Kombination von L-NA und Diclofenac, obwohl diese Behandlungen zu einer signifikanten Verringerung der Herzfrequenz führten, wie zuvor bei Mäusen (Kojda et al., 1999) und Ratten (Müller-Strahl et al., 2000) berichtet wurde.

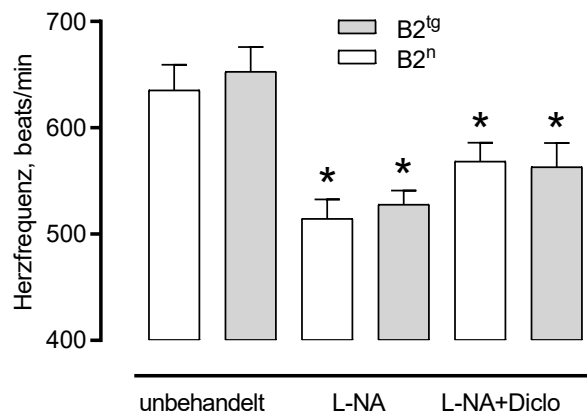


Abbildung 28: Effekte von L-NA und der Kombination von L-NA und Diclofenac auf die Herzfrequenz.

Es war kein Unterschied in der Herzfrequenz zwischen B2^{tg} und B2ⁿ messbar ($n = 6$, nicht signifikant, Tukey's -multiple comparison Test nach One-way ANOVA), während die Behandlung mit L-NA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) oder die Kombination von L-NA und Diclofenac ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) in beiden Stämmen (B2^{tg} und B2ⁿ) zu einer signifikanten Verringerung der Herzfrequenz führte (jeweils $n = 6$, $^*P < 0.05$, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA).

3.2 Miles Assay: Bradykinin-induzierte Extravasation

Um zu untersuchen, ob der Einfluss des B2-Rezeptors auf die Aortenringe auch auf die dermalen Mikrogefäße zutrifft, wurde der Miles Assay verwendet. Die Bradykinin-Signalübertragung in kleinen dermalen Blutgefäßen wird durch den B2-Rezeptor vermittelt und führt zu einer erhöhten Extravasation, die schließlich ein nicht allergisches Angioödem verursacht. Während die physiologische Gefäßpermeabilität den selektiven Transport von Plasma, Elektrolyten, Proteinen und Zellen durch eine intakte Endothelbarriere vermittelt, führt eine pathologische Gefäßpermeabilität zum Verlust der Integrität der Endothelbarriere. Im pathologischen Zustand kommt es häufig vor, dass die Endothelzellen teilweise ihren engen Kontakt zueinander verlieren und die Gefäßpermeabilität erhöht wird. Dabei wird das Endothel durchlässig für Albumin. Hierbei wird die entstandene Permeabilität genutzt und der Prozess durch Bindung des Evans blue ans Albumin visualisiert. Somit ist es möglich, das Ausmaß der Gefäßpermeabilität durch quantitative Messung des ausgetretenen Farbstoffs aus dem Endothel pro

Milligramm Gewebe zu untersuchen. Um das Ausmaß bewerten zu können, werden unbehandelte Kontrolltiere im Vergleich untersucht (Miles & Miles, 1952). Durch die Bradykinin- als auch durch die Labradimil-vermittelte vaskuläre Permeabilität ergab sich die Möglichkeit, unterschiedliche Einflüsse wie Zeit, Konzentration, vorher verabreichte Wirkstoffe (s. **Tabelle 3**) und somit die Rolle des B2-Rezeptors auf die Extravasation zu untersuchen. Die relative Bedeutung dieser Aktivitäten für die Extravasation in der Haut ist jedoch nicht bekannt.

3.2.1 Validierung der PBS-Kontrolle

Um einen Einfluss der Vehikel-Lösung (PBS) ausschließen zu können und eine negative Vergleichskontrolle zu erhalten, wurde nach intravenöser Injektion der Evans blue Lösung intradermal 30 μ L PBS appliziert. Für die passende Positivkontrolle wurden weiterhin 30 μ L einer 2 nmol Histamin Lösung injiziert (**Abbildung 29 A**). Nach Ausstanzen der behandelten dorsalen Hautflächen wurde zum Vergleich eine nicht behandelte Fläche herangezogen. Hierbei wurde festgestellt, dass es keinen Unterschied in der Extravasation zwischen behandelten mit PBS und unbehandelten Hautabschnitten gab (**Abbildung 29 B**). Womit sich PBS für alle weiteren Versuche als Kontrolle eignete.

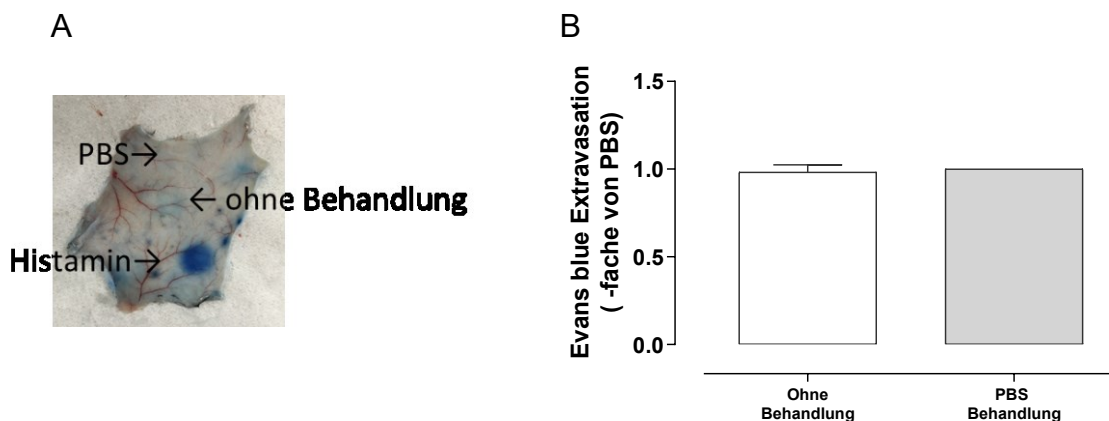


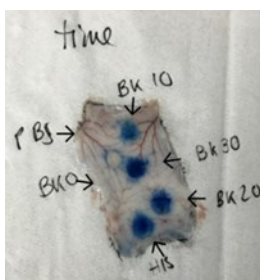
Abbildung 29: Miles Assay zur Bestimmung der induzierten vaskulären Permeabilität von PBS und unbehandelten Hautpartien.

A. Repäsentatives Foto der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut. Dorsale ausgeschnittene Haut der C57BL/6 mit intradermaler Injektion von PBS (30 μ L) und der passenden Positivkontrolle Histamin (30 μ L, 2 nmol). B. Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßpermeabilität, durch die Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue, aus Stanzproben der dorsalen Haut. Nach Vermessung der Proben wurde festgestellt, dass es keinen Unterschied in der Extravasation zwischen behandelten mit PBS und unbehandelten Hautabschnitten der C57BL/6 (n = 6) gab.

3.2.2 Zeitabhängige Extravasation durch dermalen Bradykinin Injektion

Um das Ausmaß der endothelialen Permeabilität von Bradykinin zu untersuchen, wurden die Versuche zunächst in C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Da ein besseres Verständnis für die zeitabhängige Extravasation hierbei wichtig ist bzw. welche optimale Zeitdauer für eine maximale Extravasation nötig ist, wurde den Versuchstieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 10, 20 und 30 min) 30 µl einer Stoffmenge von 2 nmol Bradykinin-Lösung intradermal appliziert. Um Vergleichswerte zu erhalten, wurde als positive Vergleichskontrolle 30 µl einer Histamin-Lösung (2 nmol) und PBS (30 µl) als negative Vehikel-Kontrolle in nächster Nähe zur Bradykinininjektion zum Zeitpunkt 0 min appliziert. Unmittelbar nach der letzten dermalen Bradykinininjektion (Zeitpunkt 30 min) wurden die Mäuse euthanasiert und nach freilegen der dorsalen Haut die entstandenen Injektionsstellen unter Verwendung eines speziellen Kreisschneiders ausgestanzt. **Abbildung 30 A** stellt die dorsale Haut und die Injektionsflächen, die sich während 30 min entwickeln (BK0 min, BK10 min, BK20 min und BK30 min). Wie **Abbildung 30 B** zeigt, wurde festgestellt, dass der größte Anteil der induzierten Extravasation innerhalb der ersten 20 min nach der Injektion von Bradykinin entwickelt (jeweils $n = 6$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus PBS, Tukey's Multiple Comparison Test).

A



B

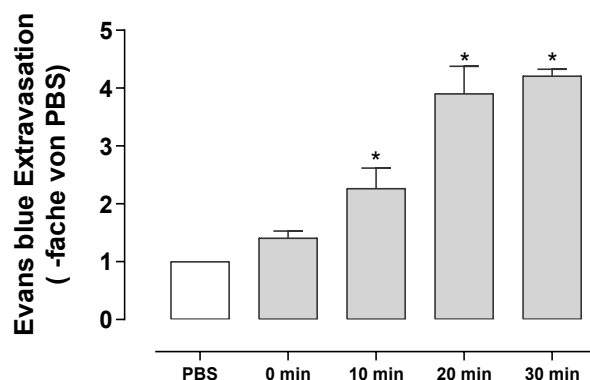


Abbildung 30: Miles Assay zur Bestimmung der Zeit-Wirkungs-Beziehungen.

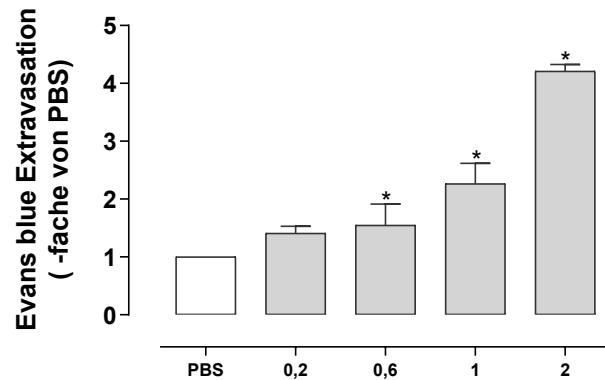
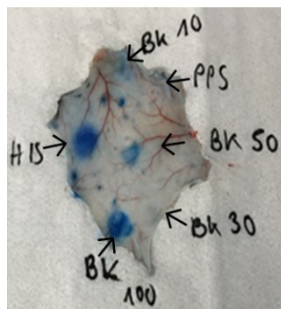
A. Fotoausschnitt der Evans Blue Extravasation einer dorsalen Haut der C57BL/6 nach intradermalen Injektion von jeweils 30 µl PBS, Histamin (2 nmol) und Bradykinin zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 nmol, BK0-, BK10-, BK20- und BK30 min). Die Fotos stellen repräsentative Bilder von 5 unabhängigen Experimenten dar. B. Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Evans blue Bubbles (Injektionsstellen), bezogen auf die durch PBS verursachte Extravasation. Sie stellt die Zeitabhängige Bradykinin-induzierte Extravasation dar (jeweils $n = 6$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus PBS, Tukey's Multiple Comparison Test).

3.2.3 Konzentrationsabhängige erhöhte vaskuläre Permeabilität

Bradykinin und Labradimil sind Substanzen, welche die vaskuläre Permeabilität erhöhen können. Dies kann zu einer Ansammlung von Flüssigkeit im Gewebe führen und zu Ödemen beitragen. Labradimil ist ein synthetisches Analogon von Bradykinin. Er ist ein potenter, spezifischer Bradykinin-B2-Rezeptoragonist (Shimuta et al., 1999). Ursprünglich wurde Labradimil entwickelt, um die B2-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Kapillarendothelzellen des Gehirns exprimiert werden, zu stimulieren. Dieser Effekt wird genutzt, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke reversibel zu erhöhen und für Wirkstoffe passierbar zu machen (Emerich, 2001). In der Versuchsentwicklung ist die konzentrationsabhängige erhöhte vaskuläre Permeabilität durch Bradykinin und Labradimil von Interesse. Die Konzentration des Wirkstoffs in Experimenten an der Maus kann auf verschiedene Weise bestimmt werden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Dosis-Wirkungs-Bestimmungen, bei denen verschiedene Konzentrationen des Wirkstoffs verabreicht werden und die Wirkung auf die dermale Extravasation gemessen wird. Es ist wichtig, die richtige Konzentration des Wirkstoffs zu bestimmen, um sicherzustellen, dass das Experiment valide und reproduzierbar ist und um mögliche unerwünschte Wirkungen zu vermeiden.

Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können wurden beide Wirkstoffe, Bradykinin wie auch Labradimil, fortlaufend in gleicher Konzentration mit dem gleichen Volumen appliziert. Den C57BL/6 Mäusen wurde zunächst 30 µl einer Stoffmenge von 0,2 nmol, 0,6 nmol, 1 nmol und 2 nmol Bradykinin- oder Labradimil- Lösung intradermal in die dorsale Haut appliziert; immer begleitend von 2 nmol Histamin als Positivkontrolle und der Negativkontrolle PBS. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 31 A** für Bradykinin und **Abbildung 31 B** für Labradimil dargestellt. Eine steigende Bradykinin-Konzentration innerhalb von 30 min zeigte einen signifikanten Anstieg der Bradykinin-induzierten Extravasation, der das Vierfache des Vehikel-Werts (PBS) überstieg. Ein signifikanter Anstieg der Bradykinin-induzierten Extravasation konnte schon bei einer Bradykinin-Dosis von 0,6 nmol beobachtet werden ($n = 5$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $P < 0.05$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test). Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung des spezifischen B2-Agonisten Labradimil (**Abbildung 31 B**) erhalten ($n = 5$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $P < 0.05$ gegenüber Vehikel, Tukey's Multiple Comparison Test).

A



B

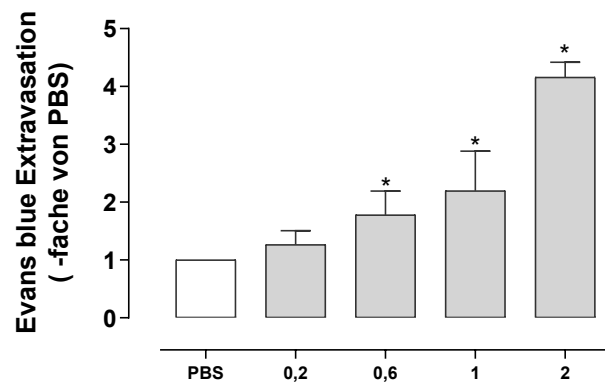
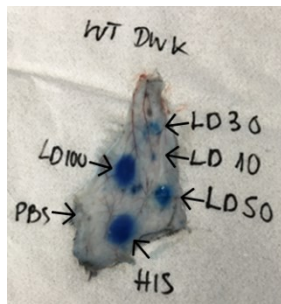


Abbildung 31: Miles Assay zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach intradermaler Bradykinin und Labradimil Injektion von jeweils 30 μ l unterschiedlicher Konzentrationen (0,2–2 nmol) in die dorsale Haut der C57BL/6 im Vergleich zur PBS.

A. Das linke Foto stellt die Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut nach intradermaler Injektion von Bradykinin Lösungen der angegebenen Konzentrationen (0,2 nmol = BK 10, 0,6 nmol = BK 30, 1 nmol = BK 50, 2 nmol = BK 100) und PBS dar. Das rechte Diagramm unter A. zeigt die konzentrationsabhängige durch Bradykinin-induzierte Extravasation bezogen auf die durch PBS verursachte Extravasation (jeweils $n = 5$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, * $P < 0.05$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test). B. Konzentrationsabhängige Labradimil (0,2 nmol = LD 10, 0,6 nmol = LD 30, 1 nmol = LD 50, 2 nmol = LD 100) induzierte Extravasation (jeweils $n = 5$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, * $P < 0.05$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test) und links die jeweils dazugehörigen dorsalen Hautausschnittbilder.

Da Labradimil gegenüber abbauenden Peptidasen viel stabiler ist, jedoch eine gleiche Affinität und intrinsische Aktivität besitzt wie Bradykinin (Shimuta et al., 1999), stellte sich die Frage, ob Labradimil aufgrund seiner Stabilität einen stärkeren Einfluss auf die dermal induzierte Extravasation in C57BL/6 hat. Hierbei wurden intradermal Bradykinin, Labradimil, PBS als auch Histamin (30 μ l, 2 nmol) in die dorsale Haut injiziert. Wie in **Abbildung 32** dargestellt gab es keinen signifikanten Unterschied in der induzierten Extravasation zwischen Labradimil und Bradykinin. Durch Bradykinin

wurde eine 4,2-fache Erhöhung ($\pm 0,1$) der Gefäßpermeabilität festgestellt. Die Positivkontrolle Histamin (4,2-fach, $\pm 0,6$) ergab vergleichbare Werte wie die durch Bradykinin als auch Labradimil verursachten Extravasation in der C57BL/6 (* $P < 0.0001$ One-way ANOVA, * $P < 0.0001$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test). Schließlich konnte kein Unterschied in der induzierten Extravasation zwischen Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 30 μ l, 2 nmol) gegenüber PBS (30 μ l) in der Mauslinie C57BL/6 gemessen werden.

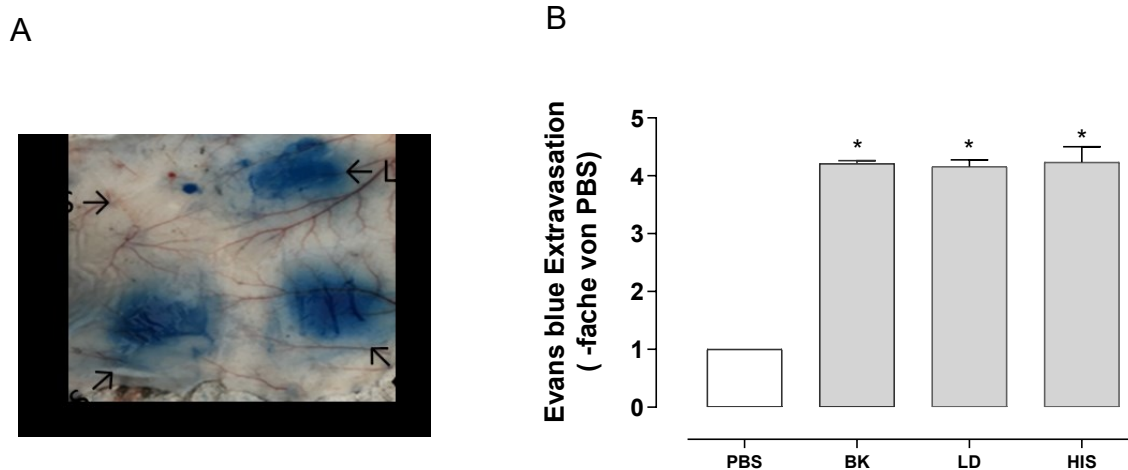


Abbildung 32: Miles Assay: A. Das linke Bild stellt eine repräsentative Fotografie von 6 unabhängigen Experimenten dar. Vaskuläre Permeabilität in dorsalem Hautstück, induziert durch intradermalen Injektionen von jeweils 30 μ l PBS, Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (jeweils 2 nmol) in der Mauslinie C57BL/6 ($n = 6$). B. Die rechte Grafik zeigt die Quantifizierung der entstandenen Extravasation bezogen auf die PBS Injektion (* $P < 0.0001$ One-way ANOVA, * $P < 0.0001$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test).

Sowohl Bradykinin als auch Labradimil verursachten eine hoch signifikante konzentrationsabhängige induzierte vaskuläre Permeabilität im Bereich von 0,2–2 nmol, welche überwiegend innerhalb von 20 min stattfand (* $P < 0.05$ One-way ANOVA, * $P < 0.05$ gegenüber PBS, Tukey's Multiple Comparison Test).

3.2.4 Hemmung der induzierten Extravasation durch Icatibant

Vorangegangene Organbadversuche in den Aortenringen zeigten eine B2-Rezeptor-abhängige und durch Icatibant vermittelte Hemmung der vaskulären Bradykinin-Aktivität. Icatibant ist ein selektiver synthetisch hergestellter Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist (Fincham et al., 2009). Aufgrund der ähnlichen Struktur des körpereigenen Bradykinin besitzt es eine hohe Affinität zum B2-Rezeptor. Icatibant bindet an den B2-

Rezeptor und blockiert dadurch dessen Aktivierung durch das natürliche Peptid Bradykinin. Dies führt dazu, dass die Wirkung von Bradykinin, wie zum Beispiel die Erweiterung der Blutgefäße und die Erhöhung der Durchlässigkeit der Kapillaren, verringert wird. Es interagiert nicht mit dem Bradykinin-Rezeptor Typ I (B1) oder anderen Peptidrezeptoren (Rhaleb et al., 1992).

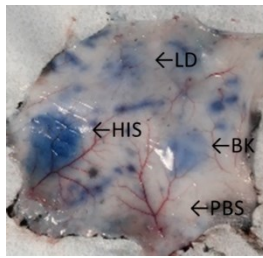
3.2.4.1 Intraperitoneale Icatibant-Injektion

Um die Rolle des B2-Rezeptors bei der durch Bradykinin-induzierten Extravasation beurteilen zu können, wurden den Versuchstieren 2 h vor Versuchsbeginn 2 nmol oder 20 nmol Icatibant appliziert. Nach Injektion von steril hergestelltem Evans-Blue ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ in $100 \text{ } \mu\text{l}$ PBS) in die Schwanzvene einer darauffolgenden dorsalen Rasur und Enthaarung wurden $30 \text{ } \mu\text{l}$ einer 2 nmol Bradykinin-, Labradimil- und Histamin-Lösung intradermal in die dorsale Haut injiziert und nach 2.8.1 vorgegangen.

Bradykinin

Die durch Bradykinin-induzierte Extravasation wurde durch vorherig intraperitoneal appliziertes Icatibant (2 nmol) Gabe blockiert ($4,4 \pm 0,1$ -Fache auf das $2,2 \pm 0,2$ -fache im Vergleich zum Vehikel; $P < 0.05$ One-way ANOVA, $P < 0.05$ gegenüber Bradykinin unbehandelte C57BL/6, Tukey's Multiple Comparison Test) und ist daher weitgehend durch die Aktivierung des B2-Rezeptors vermittelt (**Abbildung 33**). Dies spiegelt die Ergebnisse mit den Organbadversuchen an Aortenringen von B2^{tg} Versuchstieren wider, wobei hierbei die Bradykinin-verursachte Kontraktion durch Icatibant vollständig gehemmt werden konnte (s. **Abbildung 25 B**). Außerdem gab es keinen signifikanten Unterschied in der verminderten Extravasation nach Hemmung des B2-Rezeptors durch erhöhter Icatibant Konzentration von 20 nmol. Die Histamin vermittelte Extravasation wurde weder bei 2 nmol noch bei 20 nmol Icatibant beeinflusst.

A



B

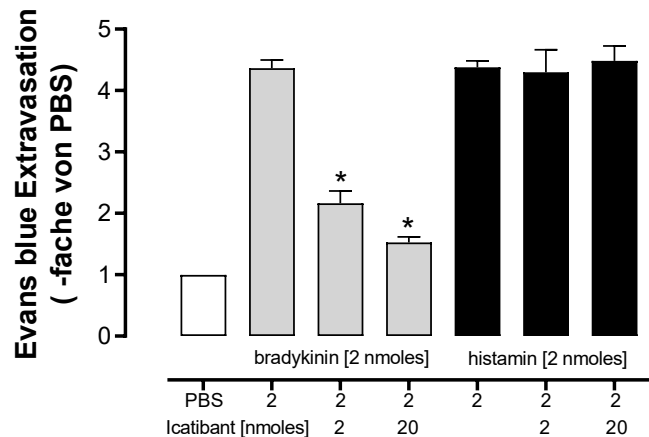


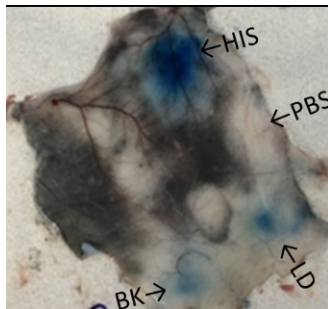
Abbildung 33: A. Das linke Bild stellt ein repräsentatives dorsales Hautstück einer C57BL/6 dar. Das Foto zeigt die endotheliale Extravasation durch intradermale Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol, BK), Labradimil (2 nmol, LD) und Histamin (2 nmol, HIS) nach intraperitoneale Icatibant-Injektion (2 nmol) in C57BL/6 (Miles Assay). Nach Messung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue aus Stanzproben der dorsalen Haut wurde die rechte Grafik für 6 unabhängige Experimente erstellt. B. Die rechte Grafik stellt die Ergebnisse der Hemmung der intradermalen Bradykinin-induzierten Extravasation durch intraperitoneale Icatibant-Injektion in C57BL/6 dar (jeweils $n = 6$, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $*P < 0.05$ versus Bradykinin allein, Tukey's Multiple Comparison Test).

Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Bradykinin-induzierten Extravasation zwischen der Vorbehandlung mit 2 nmol Icatibant und 20 nmol Icatibant messbar. Die Histamin vermittelte Extravasation wurde weder ohne noch mit 2 nmol oder mit 20 nmol intraperitoneale Icatibant Vorbehandlung beeinflusst.

Labradimil

Ähnliche Ergebnisse wurden in **Abbildung 34** mit dem spezifischen B2-Agonisten Labradimil nach intravenöser Icatibant-Injektion festgestellt ($4,1 \pm 0,1$ -fache auf das $1,9 \pm 0,2$ -Fache (2 nmol Icatibant) auf das $1,6 \pm 0,1$ -Fache (20 nmol Icatibant) im Vergleich zu PBS; $P < 0.05$ One-way ANOVA, $P < 0.05$ gegenüber Labradimil unbehandelte C57BL/6 Versuchstiere, Tukey's Multiple Comparison Test). Labradimil ist gegenüber abbauenden Peptidasen viel stabiler als Bradykinin (Shimuta et al., 1999). Auch hierbei unterschied sich die Icatibant-verminderte Permeabilität bei der intradermalen Behandlung mit Bradykinin oder Labradimil weder bei 2 nmol noch bei 20 nmol intraperitoneal injiziertem Icatibant voneinander und hatte keinen Einfluss auf die Histamin-vermittelte Extravasation.

A



B

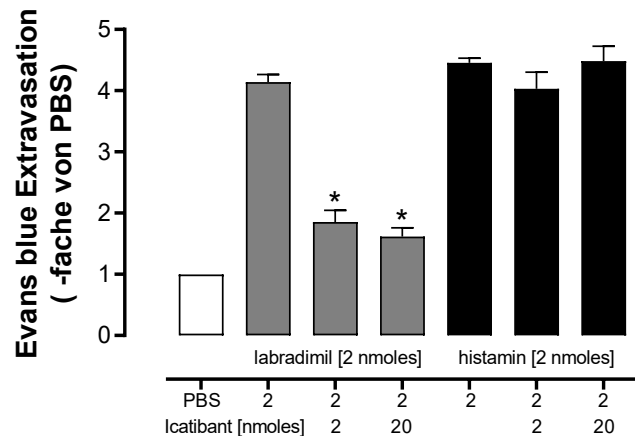


Abbildung 34: Miles Assay: A. Dorsales Hautstück nach intraperitoneale Icatibant-Injektion (2 nmol) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol, BK), Labradimil (2 nmol, LD) und Histamin (2 nmol, HIS). Nach Ausschnitt der blau gefärbten Injektionsstellen der vaskulären Permeabilität durch Bradykinin, Labradimil und Histamin in den C57BL/6 Versuchstieren, wurden diese spektrophotometrisch vermessen und in das rechte Diagramm eingetragen. B. Das Diagramm stellt die Hemmung von Labradimil-induzierter Extravasation nach i. p. Icatibant-Injektion dar (2 nmol, 20 nmol, jeweils n = 6, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $*P < 0.05$ gegenüber Labradimil allein, Tukey's Multiple Comparison Test). Icatibant hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von Histamin. Auch hier war kein Unterschied in der Labradimil-induzierten Extravasation zwischen der Vorbehandlung mit 2 nmol und 20 nmol Icatibant messbar.

3.2.4.2 Intradermale Icatibant-Injektion

Um den direkten Einfluss von Icatibant auf den B2-Rezeptor beurteilen zu können, wurde eine Mischung von jeweils 2 nmol Bradykinin und 2 nmol Icatibant intradermal in die dorsale Haut der C57BL/6 injiziert. Erstaunlicherweise entwickelte sich von außen ein sichtbarer durch Evans blue-verursachter blauer Ring, der im Inneren des Kreises keine erkennbare Evans blue-Färbung aufwies (**Abbildung 35 A, B**). Nach einer intraperitonealen 2 nmol-Icatibant-Vorbehandlung der C57BL/6 war der durch Bradykinin verursachter Evans-blue-gefärbte Ring kaum noch erkennbar (**Abbildung 35 C**).

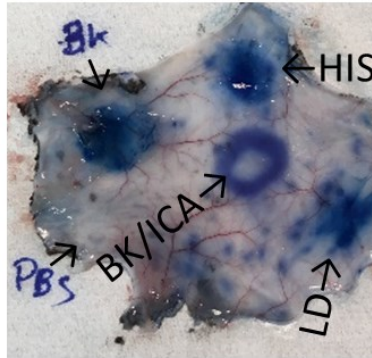
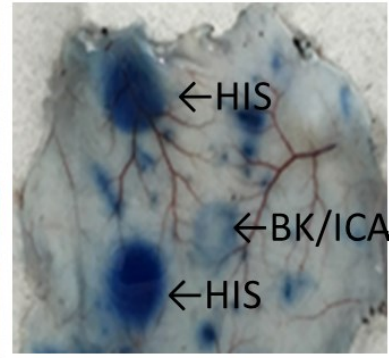
A**B****C**

Abbildung 35: Miles Assay: A. Dorsale Haut der C57BL/6 Versuchstiere nach dem Rasieren, Enthaaren und der intradermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung (jeweils 2 nmol, BK/ICA). B. Interessanterweise entwickelte sich nach dermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung ein durch Evans blue verursachter blauer Ring, der im inneren des Kreises keine erkennbare Bradykinin verursachte Evans blue Färbung aufwies. C. Dorsales Hautstück mit einer intradermalen Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant Lösung (jeweils 2 nmol) nach einer 2 nmol intraperitonealen Icatibant Vorbehandlung der C57BL/6 Versuchstiere. Hier ist der blaue Ring kaum noch erkennbar.

Aus **Abbildung 36** ist ersichtlich, dass eine intradermale Injektion einer Mischung von 30 µl Bradykinin/Icatibant einen direkten Einfluss auf die Extravasation hatte ($4,4 \pm 0,1$ auf das $2,4 \pm 0,1$ -Fache im Vergleich zu PBS, $P < 0.0001$ gegenüber Bradykinin, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA) und Bradykinin vermutlich von innen heraus verdrängte. Allerdings wurde beobachtet, dass eine intraperitoneale Injektion von 2 nmol Icatibant die Bradykinin-induzierte Extravasation stärker hemmt als eine intradermale Injektion einer Bradykinin/Icatibant Mischung ohne intravenöser Icatibant Vorbehandlung der Versuchstiere ($n = 5$, $2,4 \pm 0,1$ auf das $1,6 \pm 0,1$ im Vergleich zu PBS, $P = 0.0007$ gegenüber intradermalen Injektion von Bradykinin/Icatibant unbehandelter Versuchstiere, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA). Vermutlich durch die Verdrängung der Bradykinin verursachten Extravasation (s. **Abbildung 35 B**). Es konnte kein zusätzlicher Effekt bzw. statistisch signifikanter Unterschied in der Extravasation zwischen einer intravenösen Icatibant vorbehandelten C57BL/6 mit intradermalen Bradykinin Injektion und einer intravenösen Icatibant vorbehandelten C57BL/6 mit intradermalen Injektion aus einer Mischung von Bradykinin/Icatibant festgestellt werden.

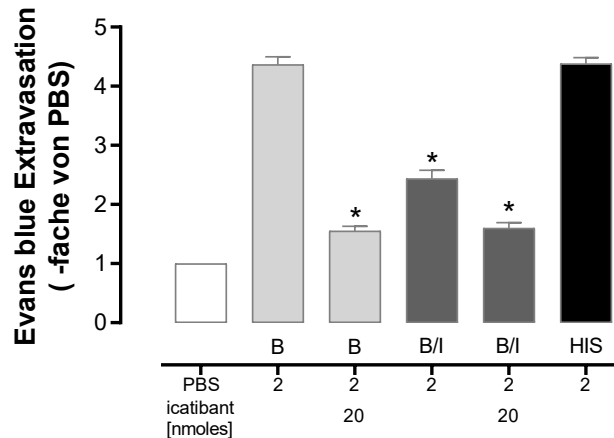


Abbildung 36: Miles Assay: Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßdurchlässigkeit, durch die Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue, aus Stanzproben der dorsalen Haut.

Die Grafik zeigt die endotheliale Extravasation nach intradermaler Injektion von 30 µl PBS, Histamin (2 nmol), Bradykinin (2 nmol) und einer Mischung von Bradykinin/Icatibant (jeweils 2 nmol) mit und ohne intraperitoneale Icatibant (2 nmol) Vorbehandlung der C57BL/6 (n = 5). Die Hemmung der Bradykinin-induzierten Extravasation durch die intraperitoneale Icatibant Vorbehandlung ist signifikant stärker als die intradermalen Gabe einer Mischung von Bradykinin/Icatibant (n = 5, $2,4 \pm 0,1$ auf das $1,6 \pm 0,1$ versus PBS, $*P < 0.0007$ versus Bradykinin/Icatibant ohne intraperitoneale Icatibant Vorbehandlung der C57BL/6, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA). Die Vorbehandlung der Maus mit Icatibant und einer intradermalen Injektion der Mischung Bradykinin/Icatibant ergab keine zusätzliche Reduzierung der Bradykinin-induzierten Extravasation nach intraperitonealen Icatibant Vorbehandlung der Versuchstiere (n = 5, nicht signifikant versus Bradykinin mit i. p. Icatibant Vorbehandlung, Tukey's Multiple Comparison Test). Icatibant hatte auch hierbei keinen Einfluss auf die Wirkung von Histamin.

3.2.5 Einfluss der erhöhten B2 Expression in B2^{tg} auf die Extravasation

Eine erhöhte Expression von Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (B2) kann die Extravasation und die Entzündungsreaktionen in Geweben erhöhen. Während eines nicht allergischen Bradykinin-induzierten Angioödems kommt es zu einer erhöhten Aktivierung von endothelialen B2-Rezeptoren. Hierbei bindet Bradykinin an B2-Rezeptoren und aktiviert diese, was zu einer erhöhten Bildung von Mediatoren wie Prostaglandinen führt und somit zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blutgefäße (Bas et al., 2007). Um den Einfluss der erhöhten B2-Rezeptor-Expression in B2^{tg} auf die Extravasation zu verstehen, wurde zunächst untersucht, ob B2^{tg} Versuchstiere aufgrund der erhöhten B2-Rezeptor-Expression mit einer stärkeren Reaktion auf die intradermal induzierte Bradykinin Extravasation im Vergleich zu ihren transgennegativen B2ⁿ Geschwistertiere reagieren. In B2ⁿ wurde ein durch Bradykinin-induzierter Anstieg der Extravasation um das $4,5 \pm 0,2$ -Fache ($P < 0.05$ One-way ANOVA, $P < 0.05$ gegenüber Vehikel [PBS], Tukey's Multiple Comparison Test) gefunden, der mit dem in C57BL/6 beobachteten Mäusen vergleichbar war. Im Gegensatz dazu induzierte

Bradykinin eine signifikant stärkere Extravasation in B2^{tg} auf das $5,5 \pm 0,2$ -Fache (**Abbildung 37**, jeweils $n = 7$, Vehikel bezeichnet die physiologische Pufferlösung (PBS), $P < 0.05$ One-way ANOVA, $^*P < 0.05$ versus Vehikel, $^{\#}P < 0.05$ versus B2ⁿ, Tukey's Multiple Comparison Test). Die Histamin-vermittelte Extravasation war weder bei den transgen negativen (B2ⁿ) noch bei den transgen positiven (B2^{tg}) Versuchstieren verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression des B2-Rezeptors in B2^{tg} in Endothelzellen kleiner dermalen Blutgefäße funktionell aktiv ist.

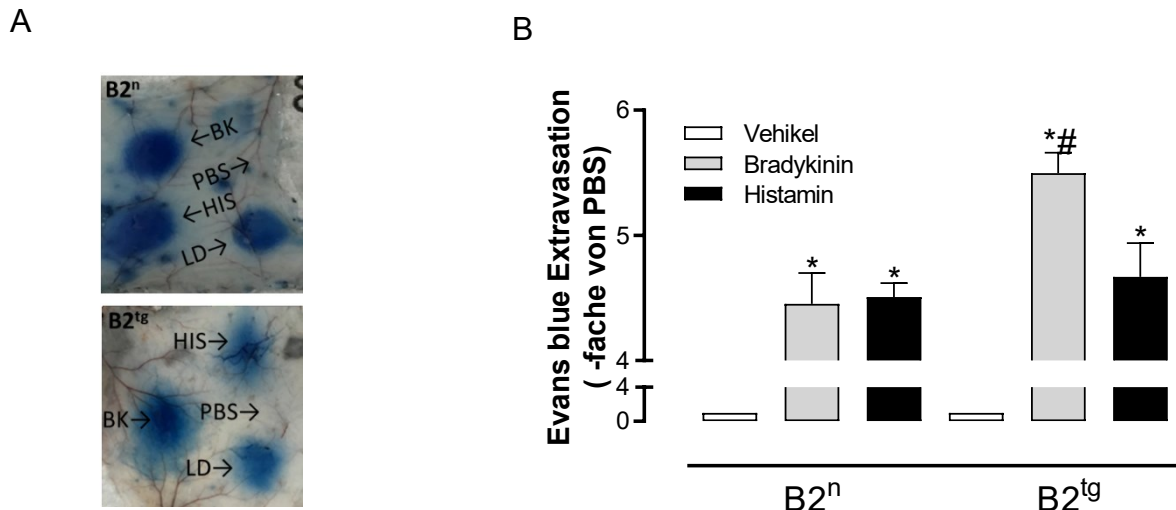


Abbildung 37: Ergebnisse des Miles Assays zur Bewertung der durch Bradykinin-induzierten Plasmaextravasation bei Mäusen mit einer endothelspezifischen Überexpression von B2-Rezeptoren (B2^{tg}) im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren (B2ⁿ).

A. Links spiegeln die repräsentativen Bilder der passenden dorsalen Hautfläche mit der intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (HIS, jeweils 30 μ l, 2 nmol). Das obere Bild präsentiert die transgen negative Maus B2ⁿ und die untere Bildaufnahme die transgen positive B2^{tg}. B. Das rechte Diagramm zeigt die erhöhte Extravasation induziert durch Bradykinin in B2^{tg} versus B2ⁿ (jeweils $n = 7$, Vehikel bezeichnet die intradermale PBS Injektion, $P < 0.05$ One-way ANOVA, $^*P < 0.05$ versus Vehikel, $^{\#}P < 0.05$ versus B2ⁿ, Tukey's Multiple Comparison Test). Die B2-Rezeptor Überexpression in den transgen positiven Geschwistertieren (B2^{tg}) hatte keinen Einfluss auf die durch Histamin induzierten Plasmaextravasation im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine erhöhte B2-Rezeptor-Expression in transgen positiven Versuchstieren schließlich auch zu einer stärkeren Hemmung der Bradykinin-induzierten Plasmaextravasation in der dorsalen Haut führt. Wie zuvor in den C57BL/6 beobachtet (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), wird auch in B2ⁿ durch eine intraperitoneal 2 nmol Icatibant-Injektion (2 Stunden vor intradermaler Bradykinininjektion) die Bradykinin-induzierte Extravasation im Vergleich zum Vehikel (i. d. PBS) von $4,5 \pm 0,2$ -fach bis zu $2,3 \pm 0,2$ -fach (**Abbildung 38**, $n = 7$, $^{***}P < 0.0001$ vs. Bradykinin in unbehandelten B2ⁿ) und von $5,4 \pm 0,1$ -fach bis $2,5 \pm 0,1$ -fach in B2^{tg} reduziert ($n = 5$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $^{***}P < 0.0001$ versus Bradykinin in unbehandelte B2^{tg}, Tukey's Multiple Comparison Test). Allerdings

wurde kein Unterschied in der dermal induzierten Extravasation durch Bradykinin nach intraperitonealer Icatibant-Injektion zwischen den transgen negativen und den transgen positiven Versuchstieren gemessen.

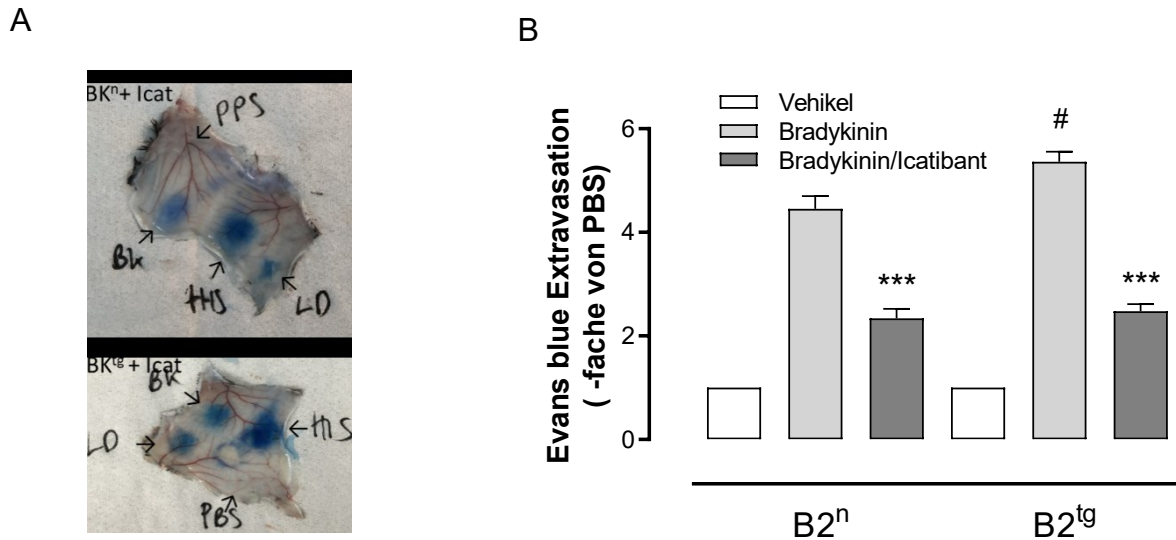
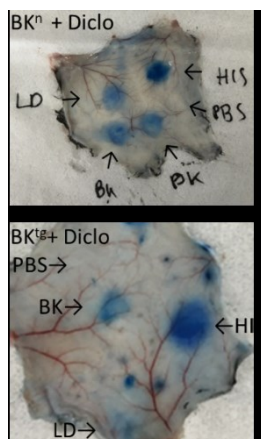


Abbildung 38: Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der transgen negativen (BKⁿ) und transgen positiven (BK^{tg}) Maus als Versuchsmodell.

Die Messung erfolgte im Spektrophotometer, hierbei wurde der Farbstoff Evans blue aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. A. Links stellen passende dorsale Hautflächen mit den entsprechenden intradermal induzierten Extravasationsinjektionen von PBS, Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (HIS, jeweils 30 µl, 2 nmol) eines Miles assays dar. Das obere der linken Bilder repräsentiert das Bild eines Ausschnittes der dorsalen Haut einer BKⁿ und das untere einer BK^{tg} Maus. B. Das rechte Diagramm spiegelt die Wirkung der intravenös vorbehandelten Versuchstiere mit Icatibant (2 nmol) auf die Bradykinin-induzierte Extravasation in B2ⁿ und B2^{tg} wieder (jeweils n = 5, P < 0.0001 One-way ANOVA, ***P < 0.0001 versus unbehandeltes Versuchstier mit PBS, #P < 0.05 gegen B2ⁿ, Tukey's Multiple Comparison Test).

Weiterhin konnte an B2^{tg} bestätigt werden, dass auch die intravenöse Gabe des unselektiven COX-Hemmer Diclofenac (5 mg·kg⁻¹ KG) in die Schwanzvene die Bradykinin-induzierte Extravasation sowohl in B2ⁿ als auch in BK^{tg} Versuchstieren signifikant reduzierte (**Abbildung 39**, n = 7, P < 0.05 One-way Anova, *P < 0.05 versus unbehandelt, #P < 0.05 versus B2ⁿ, Tukey's Multiple Comparison Test). Außerdem hob Diclofenac den Unterschied der Bradykinin-induzierten Extravasation zwischen den Stämmen B2ⁿ und B2^{tg} auf. Diese erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die COX eine wesentliche Rolle in der verstärkten Extravasation in transgen positiven B2^{tg} spielt.

A



B

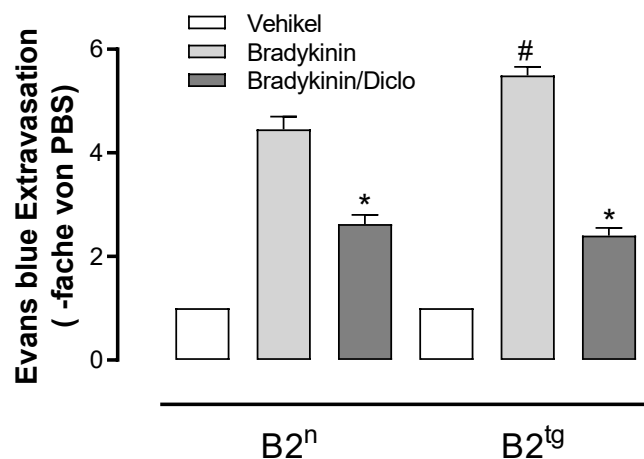


Abbildung 39: Ergebnisse des Miles Assay zur Untersuchung der durch Bradykinin-induzierten vaskulären Permeabilität, im Vergleich zur Vehikel Kontrolle (PBS) zwischen B2ⁿ und B2^{tg} nach Behandlung mit dem COX-Hemmer Diclofenac.

A. Die linken Fotoaufnahmen stellen repräsentative Bilder der passenden dorsalen Hautflächen mit den entsprechenden induzierten Extravasationsinjektionsstellen dar. Das obere der linken Bilder repräsentiert das Bild eines Ausschnittes der dorsalen Haut einer transgennegativen (BKⁿ) und das untere linke Bild einer transgenpositiven (BK^{tg}) Maus nach Behandlung mit dem COX-Hemmer Diclofenac. B. Die rechte Grafik spiegelt die Wirkung der Vorbehandlung mit i. v. 5 mg·kg⁻¹ KG Diclofenac auf die Bradykinin-induzierte Extravasation in B2ⁿ und B2^{tg} wieder (jeweils n = 7, P < 0.05 One-way ANOVA, *P < 0.05 versus keine Vorbehandlung, #P < 0.05 gegen B2ⁿ, Tukey's Multiple Comparison Test). Die intravenöse Behandlung mit Diclofenac konnte den Unterschied der Bradykinin-induzierten Extravasation zwischen B2ⁿ und B2^{tg} aufheben.

3.2.6 Erhöhte Extravasation durch Hemmung der ACE in C57BL/6-Mäusen

Moexipril ist ein ACEI und wird bei der Behandlung von arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz eingesetzt. Die ersten Berichte über die Synthese von Moexipril erschienen 1982 in der Literatur (Hoefle, 1982). Nachdem Moexipril in der Leber zum aktiven Moexiprilat metabolisiert wird, blockiert es zum einen die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II und zum anderen den Abbau von Bradykinin in seine inaktiven Metaboliten (Chrysant & Chrysant, 2004). Angioödeme, die während der Behandlung mit einem ACE-Hemmer auftreten, sind bei weitem die häufigste Ursache für nicht allergische Angioödeme (Bas et al., 2015). Um den Zusammenhang zwischen erhöhter Bradykininkonzentration und der daraus resultierenden erhöhten Permeabilität weiter zu untersuchen, soll in diesem Abschnitt von der Hypothese ausgegangen werden, dass die pharmakologische Hemmung von ACE die endotheliale Barrierefunktion verringern kann, in dem die Steady-State-Plasmaspiegel von Bradykinin erhöht werden.

Daher stellte sich die Frage, ob die Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit Moexipril Auswirkungen auf die durch Bradykinin-induzierte intradermale dosisabhängige Extravasation hat. Für die Dosisfindung von Moexipril wurden Miles Assays mit C57BL/6 durchgeführt. Hierbei wurde den Versuchstieren nach intraperitoneal (i. p.) Moexipril (0,3, 1 und 2 mg·kg⁻¹ KG, 2 h vor Versuchsbeginn) und intraperitoneal PBS (2 h vor Versuchsbeginn) eine 30 µl PBS, Bradykinin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,2 nmol, 0,6 nmol, 1 nmol und 2 nmol) und Histamin (0,2 nmol) intradermal appliziert. Zunächst wurde den C57BL/6 Versuchstieren eine 1 mg·kg⁻¹ KG intraperitoneale Moexipril-Lösung zur Untersuchung der intradermal induzierten Bradykinin verursachten Extravasation injiziert. Bei einer Dosis von 1 mg·kg⁻¹ KG Moexipril kam es bei C57BL/6 Versuchstieren zu einer starken Blutdrucksenkung, wobei sich der Blutfluss zentralisierte und nach Öffnung des Abdomens die innere Bauchhöhle durch Evans blue blau gefärbt ist (**Abbildung 40 A**) und somit keine signifikante messbare Bradykinin (BK), Labradimil (LD) noch Histamin (HIS) induzierte Extravasation im Vergleich zu PBS detektierbar ist (**Abbildung 40 B**). Auch höhere Dosen von 2 mg·kg⁻¹ KG i. p. Moexipril führte zu keiner detektierbaren Bradykinin-induzierten Extravasation in C57BL/6 Versuchstieren.

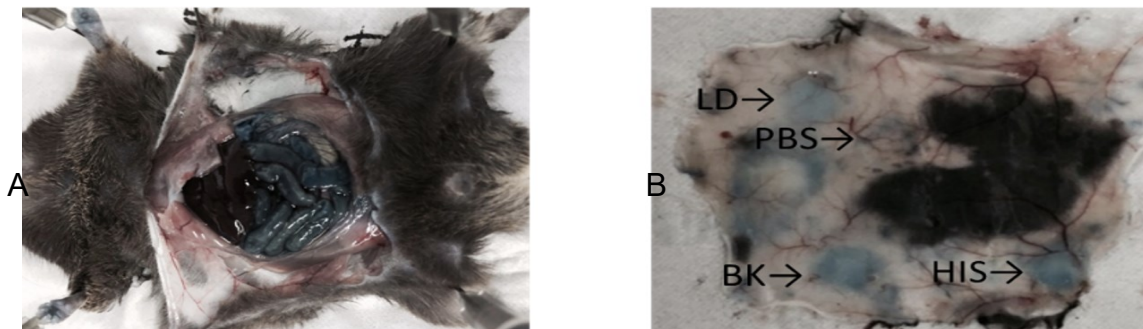


Abbildung 40: Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion (2 h vor Versuchsbeginn).

A. Vermehrte Blaufärbung in der Bauchhöhle nach intraperitonealer Moexipril (i. p., 2 h vorher, 1 mg kg⁻¹ KG) Injektion und einer anschließenden Evans blue Gabe. B. Dorsales Hautstück mit intradermaler Injektion von PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 30 µl, 2 nmol) nach Moexipril-Injektion (1 mg kg⁻¹ KG, i. p.) in C57BL/6 Versuchstieren. Es war keine unterschiedliche induzierte Extravasation zu PBS detektierbar.

Erst nach einer Reduzierung der intraperitonealen Dosis von Moexipril auf 0,3 mg·kg⁻¹ KG, wurde die Extravasation ausschließlich bei einer Zwischendosis von 0,6 nmol intradermal appliziertem Bradykinin erhöht (**Abbildung 41 A**). Moexipril-vorbehandelte C57BL/6-Versuchstiere hatten bei höheren intradermal applizierten Dosen als

0,6 nmol Bradykinin keine unterscheidende Wirkung gegenüber PBS-vorbehandelten C57BL/6-Versuchstieren (jeweils $n = 5$, Vehikel bezeichnet die PBS der vorbehandelten C57BL/6-Versuchstiere, $P < 0.05$ Two-way ANOVA, $*P < 0.05$ gegenüber Vehikel, Šídák Multiple Comparison Test). Die niedrigste intradermal applizierte Bradykinin Dosis von 0,2 nmol ergab eine minimale erhöhte Extravasation von $1,4 \pm 0,1$ -fach ohne und $1,4 \pm 0,1$ -fach mit intraperitonealer Moexipril Behandlung im Vergleich zum Vehikel (30 μ l PBS, **Abbildung 41 B**). In beiden Fällen erreichten diese kleinen Bradykinin-induzierten Erhöhungen jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zum Vehikel (nicht signifikant versus PBS, Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA).

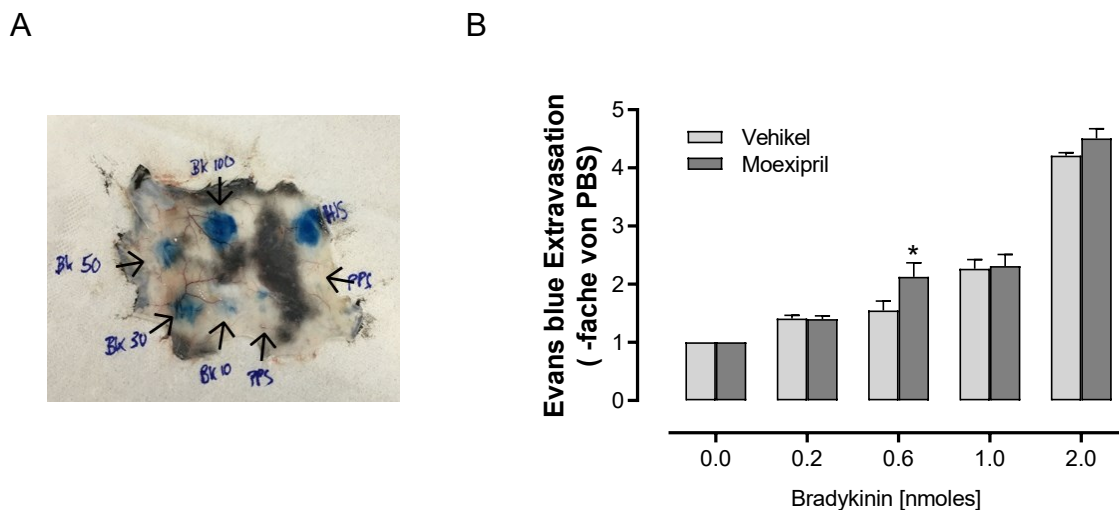


Abbildung 41: Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion (2 h vor Versuchsbeginn).

A. Die linke Fotoaufnahme stellt ein repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach Reduzierung der intraperitonealer Moexipril-Injektion auf $0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ und einer anschließenden intradermalen Injektion von 30 μ l PBS, Bradykinin (0,2 nmol = BK 10, 0,6 nmol = BK 30, 1 nmol = BK 50, 2 nmol = BK 100) und Histamin (HIS: 2 nmol) in der Mauslinie C57BL/6 dar ($n = 5$). Die Messung erfolgte im Spektrophotometer, hierbei wurde der Farbstoff Evans blue aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. D. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in das Diagramm eingepflegt. Es zeigt eine erhöhte Extravasation bei einer Zwischenkonzentration von 0,6 nmol intradermal induziertem Bradykinin (jeweils $n = 5$, $P < 0.05$ Two-way ANOVA, $*P < 0.05$ gegenüber intraperitoneale PBS behandelte C57BL/6, Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA).

Die Ergebnisse führten zu der Frage, ob die signifikante Wirkung von Moexipril nach einer intradermalen 0,6 nmol Bradykinin Injektion durch eine direkte ACE-Hemmer vermittelte induzierte Vasodilatation verursacht worden ist oder durch die Potenzierung der induzierten Bradykininkonzentration. Um dies beurteilen zu können, wurden die gleichen Experimente unter Verwendung des gegen abbauende Peptidasen viel stabileren B2-Agonisten Labradimil (Shimuta et al., 1999) wiederholt. Wie in **Abbildung 42**

gezeigt, hatte Moexipril bei keiner Konzentration von intradermal injiziertem Labradimil (0,2 nmol, 0,6 nmol, 1 nmol und 2 nmol) einen Einfluss auf die Extravasation in C57BL76 (nicht signifikant $P > 0.05$, Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA).

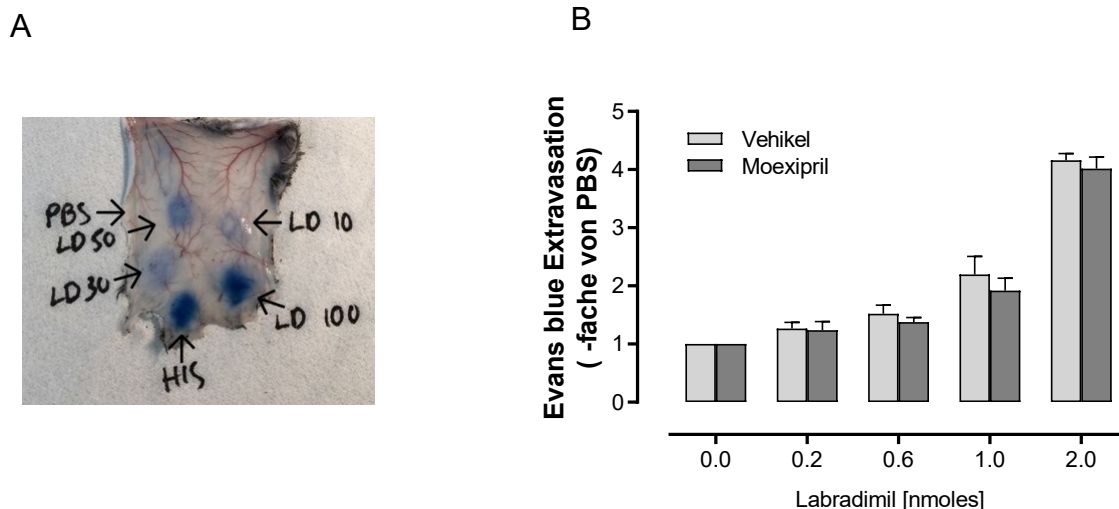


Abbildung 42: Miles Assay zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität der C57BL/6 als Versuchsmodell nach intraperitonealer Moexipril-Injektion.

A. Die linke Fotoaufnahme stellt ein repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach intraperitonealer Moexipril-Injektion ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS (30 μl), Labradimil (30 μl , 0,2 nmol = LD 10, 0,6 nmol = LD 30, 1 nmol = LD 50, 2 nmol = LD 100) und Histamin (HIS: 30 μl , 2 nmol) in C57BL/6 ($n = 5$) dar. Die Messung erfolgte im Spektrophotometer, hierbei wurde der Farbstoff Evans blue aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. B. Die rechte Grafik entsprechen die Ergebnisse der Miles Assay Messung. Bei keiner intradermalen Konzentration von Labradimil trat eine Wirkung von Moexipril auf ($n = 5$, Vehikel bezeichnet physiologische Pufferlösung, $P = 0.05$ Two way-ANOVA, nicht signifikant gegen unbehandelte Versuchstiere, Šídák Multiple Comparison Test).

Dieser Befund legt nahe, dass wahrscheinlich die Hemmung der ACE durch Moexipril und nicht die Vasodilatation per se, die 0,6 nmol Bradykinin-induzierte Potenzierung der Extravasation verursachte. Daraus ergibt sich, dass die Hemmung von ACE die Bradykinin-induzierte Extravasation verstärkt.

3.2.7 COX-abhängige Hemmung der endothelialen Permeabilität

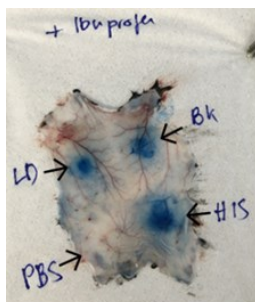
Zuvor durchgeführte Untersuchungen an Aortenringen von $B2^{tg}$ (s. **Abbildung 25**) als auch Versuche bei der die Bradykinin-induzierte Extravasation in transgenpositiven $B2^{tg}$ gemessen wurde (s. **Abbildung 39**), deuten auf eine Beteiligung der Cyclooxygenase in der Bradykinin vermittelten Kontraktion als auch Extravasation hin. Um

die Rolle der COX für die Erhöhung der Permeabilität von Bradykinin und Labradimil in kleinen dermalen Blutgefäßen näher zu untersuchen, wurden C57BL/6 mit unselektiven Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren wie Ibuprofen und Diclofenac, dem selektiven COX1-Inhibitor SC560 und den selektiven COX2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib vorbehandelt. Auch hierbei wurde der Miles Assay verwendet, um die Bedeutung und Beteiligung der spezifischen nachgeschalteten Signalwege an der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation zu erforschen.

3.2.7.1 Ibuprofen

Die Vorbehandlung der Mäuse mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Ibuprofen (i. v., $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, Sigma-Aldrich, München) führte zu einer signifikanten Reduktion der Bradykinin ($30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) als auch Labradimil ($30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) induzierten dermalen Extravasation ($n = 5$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $P < 0.0001$ gegenüber PBS behandelte Kontrolltiere, Tukey's Multiple Comparison Test, **Abbildung 43**). Es gab keine Auswirkung auf die durch Histamin induzierte Extravasation nach i. v. Ibuprofen Gabe.

A



B

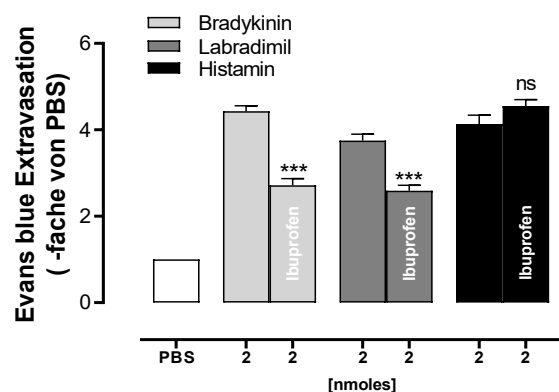


Abbildung 43: A. Ergebnisse des Miles Assays. Repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach i. v. Injektion des unspezifischen COX-Inhibitor Ibuprofen ($12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin ($30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol), Labradimil ($30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) und Histamin ($30 \text{ } \mu\text{l}$, 2 nmol) in C57BL/6 ($n = 5$).

Die Messung erfolgte im Spektrophotometer, hierbei wurde der Farbstoff Evans blue aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. B. Die Vorbehandlung mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Ibuprofen zeigte, dass eine unspezifische COX1/2-Inhibition die Bradykinin und Labradimil-induzierte Extravasation signifikant reduziert (jeweils $n = 5$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $***P < 0.0001$ gegenüber PBS behandelte Kontrolltiere, linker dazugehöriger Balken, Tukey's Multiple Comparison Test). Es gab keine Auswirkung auf die durch Histamin induzierte Extravasation.

3.2.7.2 Diclofenac

Ein ähnlicher Effekt war mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Diclofenac (i. v., 5 mg·kg⁻¹ KG) in den behandelten Mäusen zu beobachten (n = 6, ***P < 0.0001, gegenüber PBS behandelte Kontrolltiere, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way ANOVA, **Abbildung 44**). Hierbei sank die Bradykinin-induzierte Extravasation nach Diclofenac Vorbehandlung von 4,41 ± 0,11-fache auf das 2,26 ± 0,28-Fache und bei Labradimil von 3,74 ± 0,12-Fache auf das 2,44 ± 0,25-Fache. Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss der Prostaglandine auf die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation in Mäusen hin.

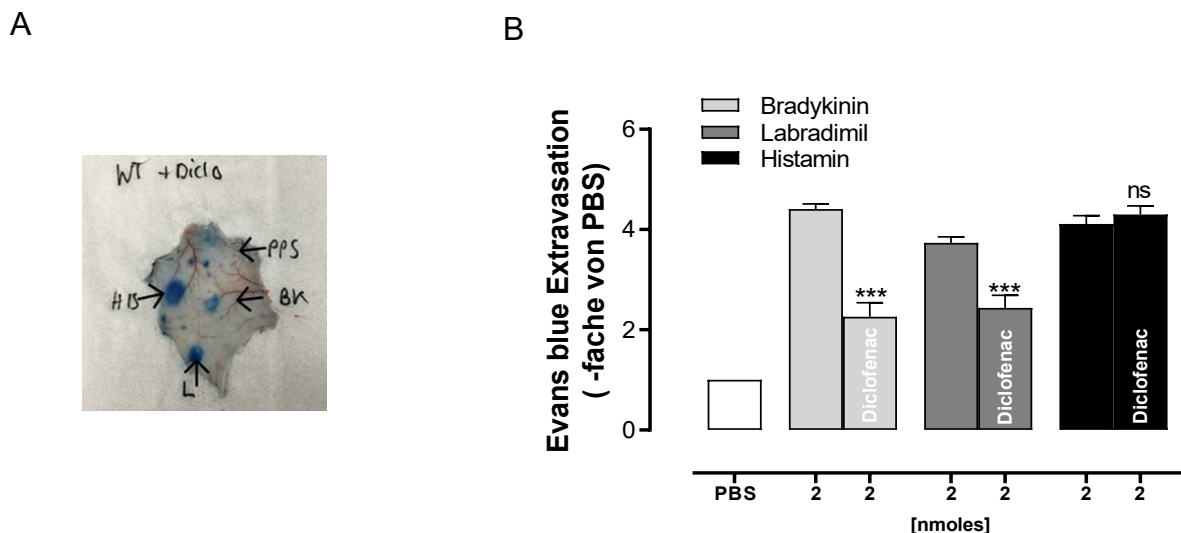


Abbildung 44: A. Ergebnisse des Miles Assays. Repräsentatives Bild der passenden dorsalen Hautfläche nach i. v. Injektion des unspezifischen COX-Inhibitor Diclofenac (5 mg kg⁻¹ KG) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin (2 nmol), Labradimil (2 nmol) und Histamin (2 nmol) in C57BL/6 (n = 6). B. Die Vorbehandlung mit Vehikel (linker Balken, PBS behandelte Kontrolltiere) und dem unspezifischen COX-Inhibitor Diclofenac (rechter Balken) zeigte auch hier, dass eine unspezifische COX1/2-Inhibition die Bradykinin und Labradimil-induzierte Extravasation signifikant reduziert (jeweils n = 6, P < 0.0001 One-way ANOVA, ***P < 0.0001 versus unbehandelte Kontrolltiere, Tukey's Multiple Comparison Test). Auch hierbei war die Histamin induzierte Extravasation unbeeinflusst.

3.2.7.3 SC560 ein spezifischer COX1- Hemmer

Es stellte sich die Frage, welche COX an der Bradykinin-induzierten Extravasation beteiligt ist. Daher wurden C57BL/6 Versuchstiere mit dem spezifischeren COX1-Inhibitor SC560 (i. v., 5 mg·kg⁻¹ KG, Sigma-Aldrich, München) vorbehandelt. Es konnte hierbei keine Veränderung der Extravasation nach intradermaler Bradykinin (30 µl, 2 nmol) als

auch Labradimil (30 μ l, 2 nmol) Applikation gemessen werden (jeweils n = 6, nicht signifikant versus unbehandelte Kontrolltiere, Tukey's Multiple Comparison Test nach One-way Anova (**Abbildung 45**).

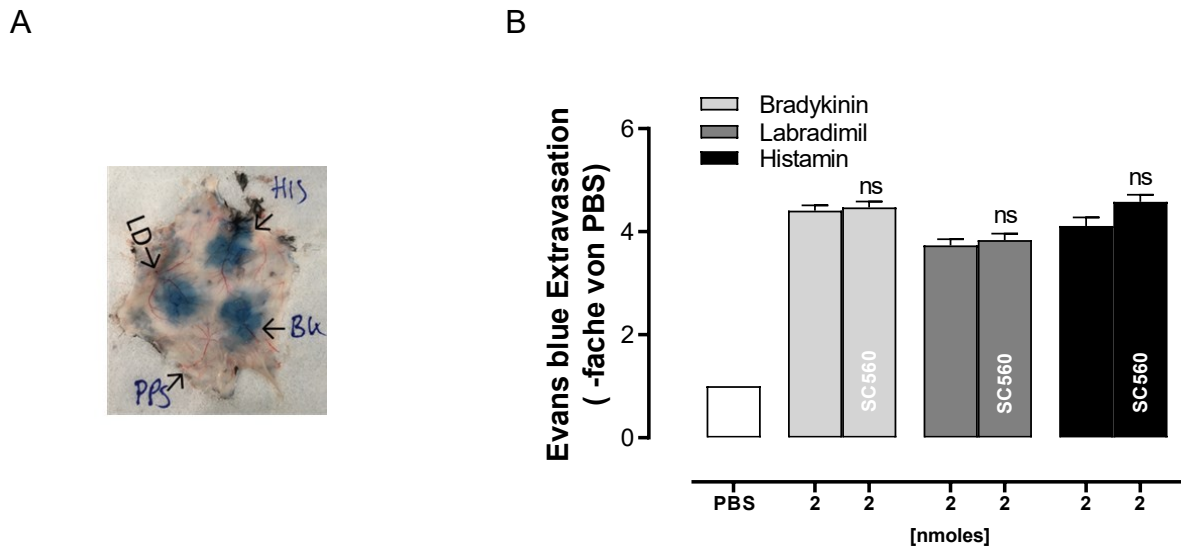
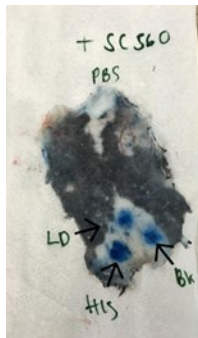


Abbildung 45: A. Miles Assay: Dorsales Hautstückergebniss nach i. v. Injektion des spezifischen COX1-Inhibitor SC560 (5 mg·kg⁻¹ KG) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 30 μ l, 2 nmol) in C57BL/6 (n = 6).

Die Messung erfolgte im Spektrophotometer, hierbei wurde der Farbstoff Evans blue aus dem Gewebe durch Inkubation mit Formamid extrahiert, photometrisch gemessen, pro Milligramm Gewebe quantifiziert und mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. B. Die Vorbehandlung mit Vehikel (PBS, linker Balken) und dem spezifischen COX1-Inhibitor SC560 (rechter Balken) zeigte weder bei Bradykinin noch bei Labradimil eine veränderte induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, nicht signifikant versus Vehikel (unbehandelte Kontrolltiere mit PBS), Tukey's Multiple Comparison Test).

Nach Erhöhung der SC560 Dosis auf 10 mg·kg⁻¹ KG war die Bradykinin- als auch Labradimil-induzierte dermale Extravasation signifikant reduziert (n = 5, $P < 0.001$ One-way ANOVA, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$ gegenüber Vehikelbehandlung (PBS), Tukey's Multiple Comparison Test, **Abbildung 46**). Allerdings fiel die Wirkung auf die dermale Extravasation im Vergleich zur Vorbehandlung mit Ibuprofen (s. **Abbildung 43**) und Diclofenac (s. **Abbildung 44**) geringer aus.

A



B

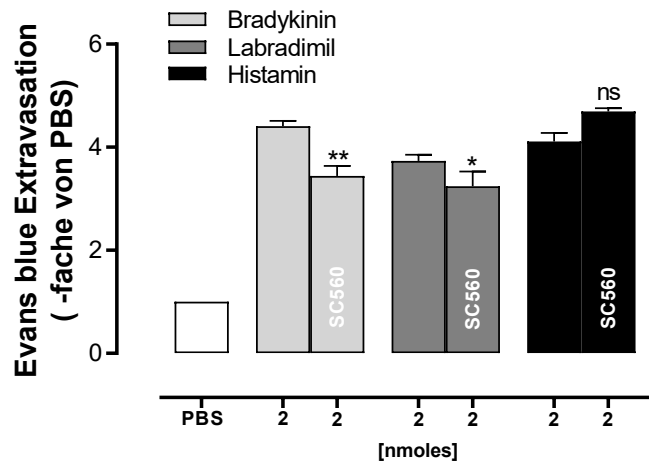


Abbildung 46: A. Representatives Bild eines Dorsalen Hautstück einer C57BL/6. Ergebnisse des Miles Assays nach intravenöser Injektion des spezifischen COX1-Inhibitor SC560 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$) und einer anschließenden intradermalen Injektion von PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils $30 \mu\text{l}$, 2 nmol) in der Mauslinie C57BL/6. B. Die Vorbehandlung mit Vehikel (linker Balken) und dem spezifischen COX1-Inhibitor SC560 (rechter Balken) zeigte erst bei einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ eine verminderte signifikante Bradykinin und Labradimil-induzierte Extravasation (jeweils $n = 5$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$ gegen Vehikelbehandlung (PBS), Tukey's Multiple Comparison Test). Auch hierbei war die Histamin induzierte Extravasation unbeeinflusst.

3.2.7.4 Celecoxib und Rofecoxib, spezifische Inhibitoren der COX2

Weiterhin wurde untersucht, welche Rolle die COX2 hierbei spielt. Dabei wurden die C57BL/6 Versuchstiere mit dem selektiven COX2-Inhibitor Celecoxib als auch Rofecoxib (i. v., $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$, Sigma-Aldrich, München) vorbehandelt. Die Vorbehandlung von C57BL/6 mit Celecoxib als auch mit Rofecoxib, führten zu einer signifikanten Reduzierung der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation. Dabei sank die Bradykinin-induzierte Extravasation nach Celecoxib Vorbehandlung von $4,41 \pm 0,11$ -Fache auf das $3,08 \pm 0,27$ -Fache und bei Labradimil von $3,74 \pm 0,12$ -Fache auf das $3,05 \pm 0,09$ -Fache ($n = 6$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $***P < 0.001$, $*P < 0.05$ gegenüber Vehikel, Tukey's Multiple Comparison Test, **Abbildung 47 B**). Rofecoxib hatte einen schwächeren Effekt auf die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation und keinen Einfluss auf die Labradimil-induzierte dermale Extravasation ($n = 6$, $P < 0.0001$ One-way ANOVA, $**P < 0.01$ gegenüber Vehikel, Tukey's Multiple Comparison Test, **Abbildung 47 D**). Auch hierbei konnte nur eine geringere Reduktion der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation durch Celecoxib als auch Rofecoxib im Vergleich zu Ibuprofen (s. **Abbildung 43**) und Diclofenac (s. **Abbildung 44**) gemessen werden. Bei keinem der vorbehandelten Versuchstiere konnte die

COX-Hemmung die Histamin-induzierte Extravasation signifikant beeinflussen. Diese Daten legen nahe, dass sowohl COX1 als auch COX2 an der Bradykinin-induzierten Extravasation in kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen beteiligt sein könnten.

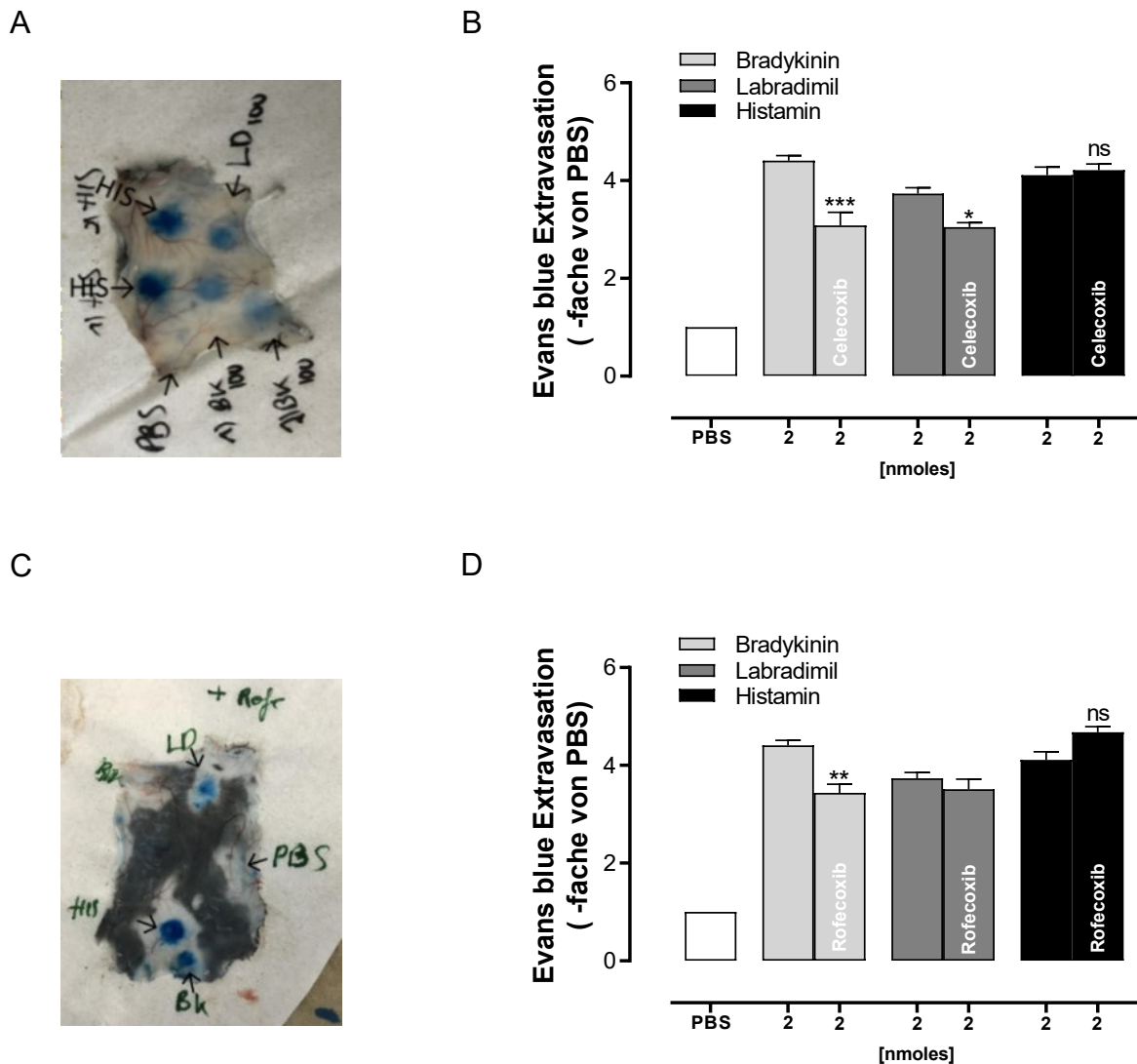


Abbildung 47: Miles Assay in C57BL/6: A. Representatives Bild eines Dorsalen Hautstück nach Vorbehandlung mit Celecoxib (i. v., 10 mg·kg⁻¹ KG) und anschließender intradermalen Injektion von 30 µl PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 2 nmol). B. Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Celecoxib führte zu einer signifikanten Reduzierung der Bradykinin als auch Labradimil-induzierten dermalen Extravasation (n = 6, P < 0.0001 One-way ANOVA, ***P < 0.001, *P < 0.05 gegenüber Vehikel, Tukey's Multiple Comparison Test). C. Dorsales Hautstück nach Rofecoxib Injektion und anschließender intradermalen Injektion von 30 µl PBS, Bradykinin, Labradimil und Histamin (jeweils 2 nmol). D. Die Grafik stellt die Auswertung der Proben dar. Rofecoxib hatte einen schwächeren Effekt auf die Bradykinin jedoch keinen Einfluss auf die Labradimil-induzierte dermale Extravasation (n = 6, P < 0.0001 One-way ANOVA, **P < 0.01 gegenüber Vehikel (PBS), Tukey's Multiple Comparison Test).

Bei keinen der vorbehandelten Versuchstiere konnte die COX-Hemmung die Histamin-induzierte Extravasation signifikant beeinflussen.

3.3 Two-Photon-Laser-Mikroskopie

Um die spontan ablaufende physiologische Extravasation in lebenden C57BL/6 messen zu können, wurde zunächst der grüne Fluoreszenzfarbstoff mit 250 kDa Dextran (Fluorescein Isothiocyanate-Dextran [FITC], 1,5 mg in 50 μ l), der die Endothelgefäße nicht spontan durchdringen kann, in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert. Da der 250 kDa Dextran aufgrund seiner Größe in den Blutgefäßen verbleibt, kann die Gefäßfluoreszenz von den interstitiellen Signalen getrennt werden. Anschließend wurde der gewebedurchlässige rote Fluoreszenzfarbstoff mit 10 kDa Dextran (Alexa Fluor® 594 Dextran, 250 μ g in 50 μ l), der die Endothelbarriere im Laufe der Zeit leicht durchquert, in den gleichen Zugang der Schwanzvene appliziert. Diese Permeation wurde über 60 min gemessen.

Abbildung 48 zeigt die Permeation des rot fluoreszierenden Farbstoffes durch die Endothelbarriere während der spontanen Extravasation in C57BL/6 Mäusen. Nach 45 min erreichte das Signal ein Plateau, da im Gefäßlumen keine Fluoreszenzänderungen mehr nachweisbar war (n = 6).

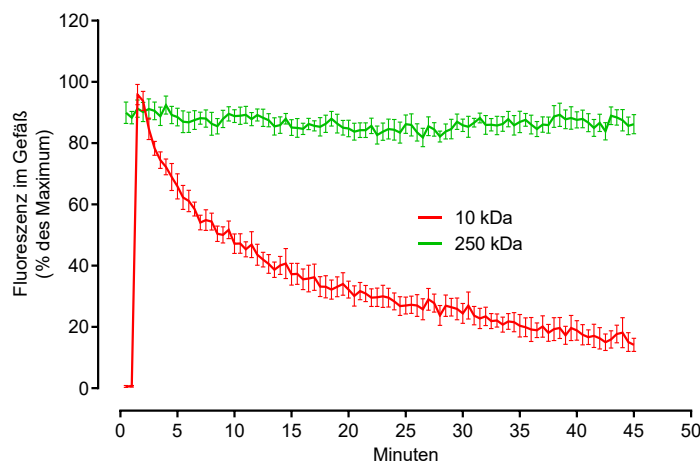


Abbildung 48: Auswertung der Two-Photon-Laser-Mikroskopie Bildgebung kleiner dermaler Blutgefäße des Ohrs von anästhesierten C57BL/6 Versuchstiere.

Aufnahme etwa 200 μ m unter der Oberfläche am Ohr. Mäuse wurden mit dem grün fluoreszierenden 250 kDa Dextran vorbehandelt, dass das Lumen nicht verlässt und somit im Gefäß verbleibt. Nach Injektion des rot fluoreszierenden 10 kDa Farbstoffes wurde die spontane Extravasation in den Gefäßlumen quantifiziert. Aufzeichnungen zeigen, dass der 10 kDa Dextran, aber nicht der 250 kDa Dextran das Gefäßlumen spontan über einen Zeitraum von 45 min verlässt (n = 6).

Als zusätzliche Kontrolle wurde die Akkumulation des 10 kDa Dextran im Interstitialraum quantifiziert ($n = 6$, **Abbildung 49**). Allerdings ist die Genauigkeit dieser Messungen geringer, da das Interstitium nicht so klar definiert werden konnte wie die intravaskulären Gefäße.

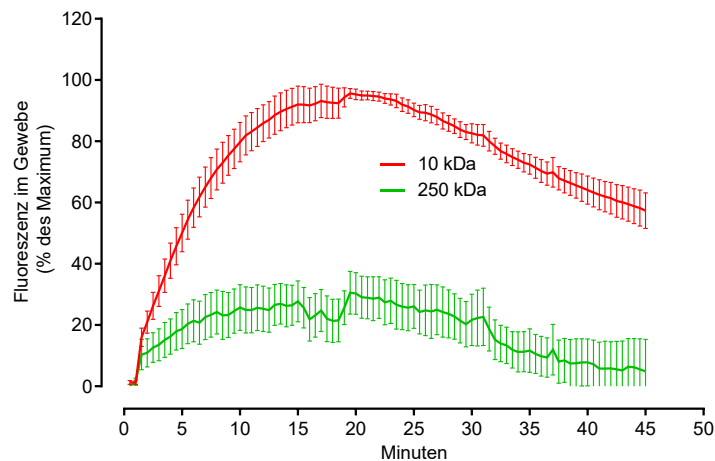


Abbildung 49: Two-Photon-Laser-Mikroskopie kleiner dermaler Blutgefäße. Aufnahme etwa 200 μm unter der Oberfläche des Ohres. C57BL/6 Versuchstiere wurden mit 1,5 mg 250 kDa Dextran vorbehandelt, das mit einem grün fluoreszierenden Chromophor markiert ist. Anschließend wurde 250 μg des 10 kDa Dextrans, der gewebedurchlässige rote fluoreszierende Farbstoff, der die Endothelbarriere im Laufe der Zeit leicht durchquert, in den gleichen Zugang der Schwanzvene appliziert. Quantifizierung der Akkumulation des 10 kDa Farbstoffes im Interstitialraum der C57BL/6 ($n = 6$). Allerdings ist die Genauigkeit dieser Messungen geringer, da das Interstitium nicht so klar definiert werden konnte wie die intravaskulären Gefäße.

Aufbauend auf den erhobenen Ergebnissen der Miles Assays stellte sich die Frage, ob die endotheliale Überexpression von B2-Rezeptoren die spontan ablaufende physiologische Extravasation in lebenden B2^{tg} erhöhen würde, da die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation in B2^{tg} im Vergleich zu ihren negativen Geschwistertieren signifikant erhöht war (s. **Abbildung 37**). Wie in **Abbildung 50 A** dargestellt, gab es keinen Unterschied in der Geschwindigkeit und Menge der spontanen physiologischen Extravasation des rot gefärbten 10 kDa Dextrans zwischen C57BL/6 und B2^{tg} in den dermalen Blutgefäßen ($n = 5$, nicht signifikant Šídák Multiple Comparison Test nach Two-way ANOVA). Ebenso konnte kein Unterschied zwischen B2^{tg} und B2ⁿ festgestellt werden ($n = 5$, nicht signifikant Šídák Multiple Comparison Test, **Abbildung 50 B**). Dies lässt vermuten, dass die spontane Extravasation in B2^{tg} nicht verändert wird. Um diese Befunde zu untermauern, wurden C57BL/6 Versuchstiere mit einer i. v. 2 nmol Icatibant-Injektion vorbehandelt. Allerdings war auch hierbei kein Unterschied in der spontanen Extravasation messbar (**Abbildung 50 C**). Schließlich stellte sich die

Frage, ob die Behandlung mit Moexipril möglicherweise die Endothelbarriere verändert und die spontane Extravasation erhöhen könnte, da Moexipril die 0,6 nmol Bradykinin-induzierte dorsale Extravasation in C57BL/6 verstärkte. Auch hierbei zeigt **Abbildung 50 D**, dass die Behandlung mit 0,3 mg·kg⁻¹ KG Moexipril weder die Geschwindigkeit noch die Menge der spontanen Extravasation veränderte. Schlussfolgernd liegt nahe, dass die spontane Extravasation bei den C57BL/6 als auch bei den B2^{tg} unabhängig von der Aktivität der B2-Rezeptoren zu sein scheint.

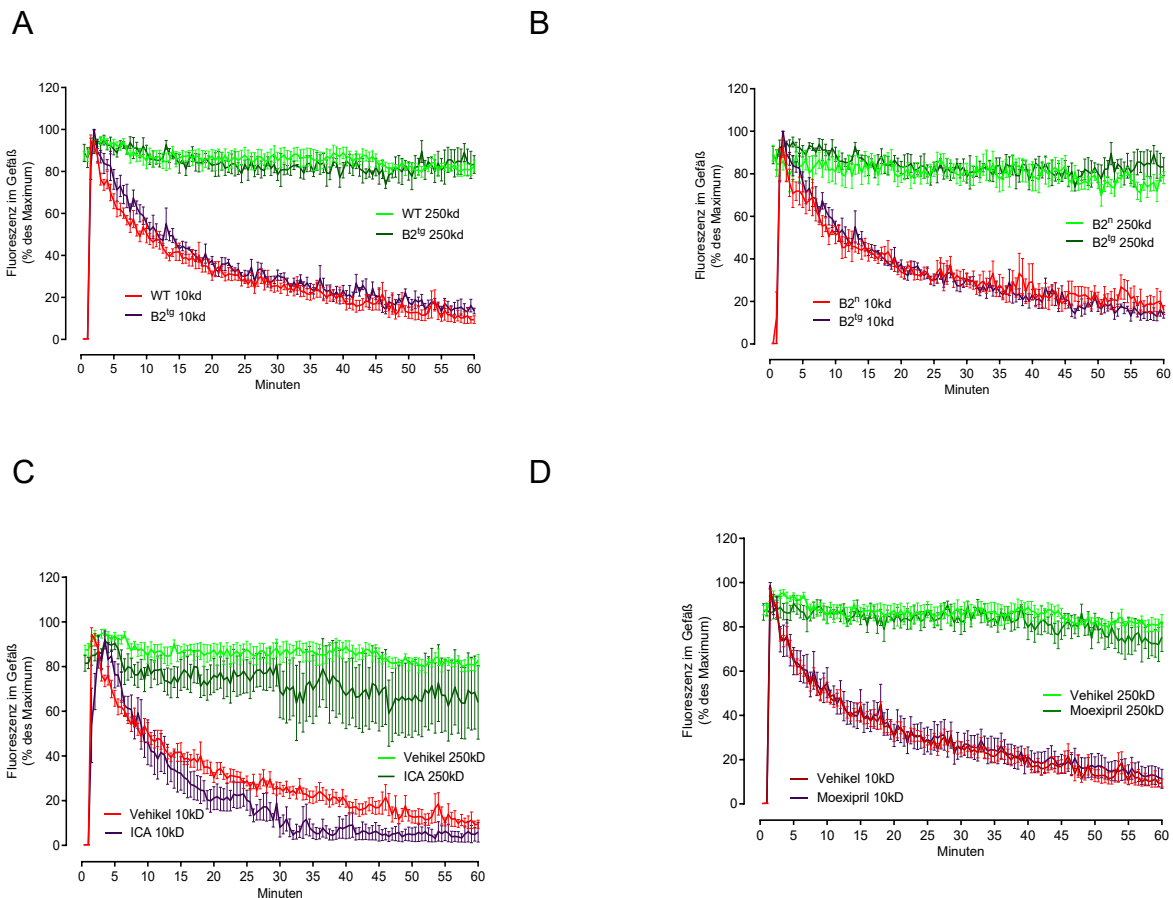


Abbildung 50: Two-Photon-Laser-Mikroskopie: Aufzeichnungen spontaner Extravasation kleiner dermaler Blutgefäße im Ohr der anästhesierten Maus. Die Aufzeichnungen zeigen, dass das 10 kDa Dextran das Gefäßlumen spontan über einen Zeitraum von 60 min verlässt.

Die endothelspezifische Überexpression des B2-Rezeptors in B2^{tg} hatte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit und Menge der Extravasation des roten 10 kDa Dextranfarbstoffes im Vergleich zu A. C57BL/6 oder B. B2ⁿ (n = 5, nicht signifikant). C. Die Hemmung des B2-Rezeptors durch Icatibant (i. v., 2 nmol) in C57BL/6 zeigte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der spontanen Extravasation (n = 5, nicht signifikant zum Vehikel = Kontrollgruppe mit PBS vorbehandelt). D. Intraperitoneal Behandlung von C57BL/6 mit Moexipril (0,3 mg·kg⁻¹ KG) veränderte weder die Geschwindigkeit noch die Menge der spontanen Extravasation (n = 5–7 nicht signifikant). Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Šidák Multiple Comparison Test nach einer Two-way ANOVA berechnet. Die spontane Extravasation scheint bei den C57BL/6 als auch bei den B2^{tg} unabhängig von der Aktivität der B2-Rezeptoren zu sein.

3.4 „A Bradykinin in Skin Edema Trial“ (ABRASE)

In den vorangegangenen Tierexperimenten wurde an der dorsalen Haut von Mäusen gezeigt, dass die Bradykinin-induzierte Extravasation durch die COX-Hemmung signifikant verringert wurde. Um diese Ergebnisse in einen klinischen Kontext zu übertragen, wurde eine multizentrische klinische Studie „A Bradykinin in Skin Edema Trial“ (ABRASE) entwickelt und durchgeführt. Hierbei bekamen eine Reihe gesunder Probanden beiderlei Geschlechts an drei verschiedenen Zentren in Deutschland intradermal eine Bradykinin- (18,9 nmol) und 0,9 % NaCl-Injektion (interne Kontrolle, Placebo-Kontrolle) (s. 2.10). Die Lösungen wurden in die innere Hautfläche des Unterarms injiziert und die Größe der gebildeten Quaddeln (**Abbildung 51**) wurden 120 min lang zu vordefinierten Zeitpunkten (5, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min) mittels eines Schieb-
leheregeräts (**Abbildung 51**) gemessen. Genau 180 min nach den ersten intradermalen Injektionen nahmen die Probanden oral 600 mg Ibuprofen ein. Weitere 60 min später wurden wieder Bradykinin und NaCl intradermal appliziert und die Quaddelgröße nach 5 bis 120 min gemessen. Am darauffolgenden Tag erfolgte das oben beschriebene Procedere mit Celecoxib, einem selektiven COX2-Hemmer. Eine typische intradermal applizierte Bradykinin Quaddel, die sich zu einer nahezu maximalen Größe entwickelt hat, ist in **Abbildung 51** im Vergleich zur NaCl Injektion dargestellt.



Abbildung 51: ABRASE: Ein repräsentatives Bild einer Quaddel nach intradermaler Injektion von 18,9 nmol Bradykinin und 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) im Unterarm eines gesunden Probanden beiderlei Geschlechts.

Es wurden sowohl Quaddeln als auch Fackeln beobachtet. Es wurden nur fühlbare Quaddeln gezählt.

3.4.1 Primäre Endpunkte der ABRASE

Der primäre Endpunkt war die Zeit in min bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel. Die Ergebnisse des primären Endpunktes sind in **Abbildung 52** für Ibuprofen, als auch in **Abbildung 53** für Celecoxib dargestellt. Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel war nach Ibuprofen Einnahme ($n = 29$, 81,38 min, 95 % Konfidenzintervall [CI], 71,03–91,73, $**P < 0.0039$ Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Tests) signifikant kürzer als die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel ohne Vorbehandlung (100,3 min, 95 % Konfidenzintervall [CI], 92,12–108,6, **Abbildung 52**). Die beobachteten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung der Cyclooxygenase durch Bradykinin in kleinen Hautgefäßen der menschlichen Haut zur Entwicklung von Quaddeln beiträgt.

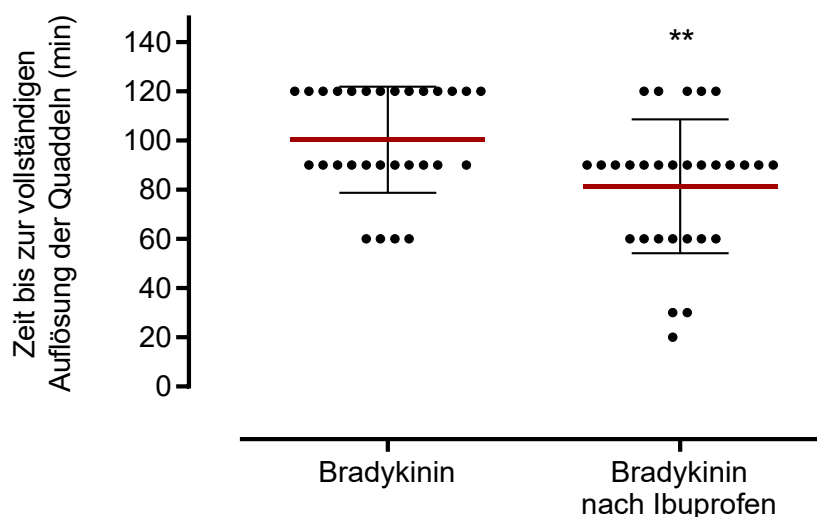


Abbildung 52: ABRASE Primärer Endpunkt: Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel, war nach Einnahme von 600 mg Ibuprofen signifikant niedriger.

Die beobachteten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung der COX durch Bradykinin in kleinen Hautgefäßen der menschlichen Haut zur Entwicklung von Quaddeln beiträgt ($n = 29$, $**P < 0.0039$, berechnet unter Verwendung des Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Tests).

Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Gabe des selektiven COX2-Hemmers Celecoxib beobachtet (**Abbildung 53**). Auch hierbei war der primäre Endpunkt also die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel nach der Behandlung mit Celecoxib signifikant kürzer ($n = 27$, 78,89 min, 95 % Konfidenzintervall [CI], 70,73–87,05, $***P < 0.001$ Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Tests) im Vergleich

zu ohne Vorbehandlung (91,11 min, 95 % Konfidenzintervall [CI], 81,53–100,7 **Abbildung 53**).

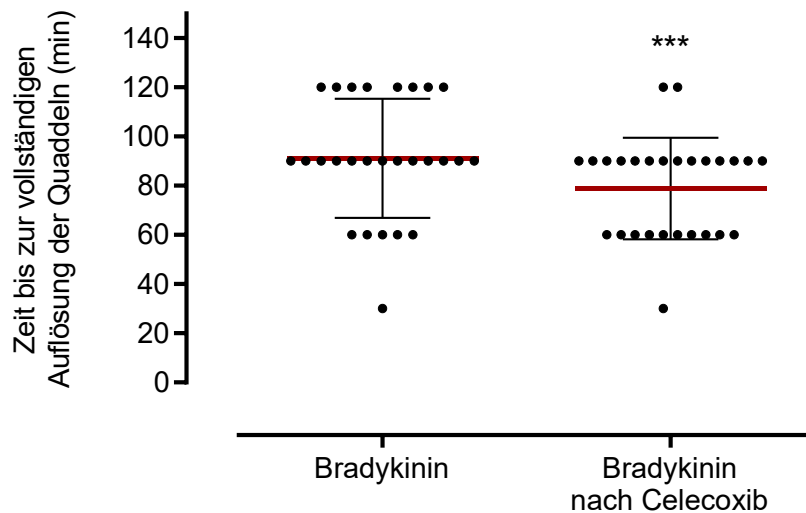


Abbildung 53: ABRASE Primärer Endpunkt: Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel, war nach Einnahme von 200 mg Celecoxib signifikant niedriger. (n = 27, ***P < 0.0001, berechnet unter Verwendung des Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Tests).

3.4.2 Sekundäre Endpunkte der ABRASE

Der sekundäre Endpunkt von ABRASE war eine Änderung der mittleren maximalen Quaddelgröße vor und nach der Behandlung mit dem unselektiven COX1/2-Hemmer Ibuprofen als auch dem selektiven COX2-Hemmer Celecoxib. Wie in **Abbildung 54** dargestellt, gab es sowohl vor als auch nach der Behandlung eine große Variation der maximalen Quaddelgröße unter den Probanden. Trotz der starken Variation der maximalen Quaddelgröße ergab die statistische Analyse eine signifikante Verringerung der mittleren maximalen Quaddelgröße nach einer Ibuprofen Einnahme (600 mg, n = 29, 313,9 mm², *P = 0,0277, berechnet unter Verwendung eines Two-tailed Paired t-Test) im Vergleich zu ohne Einnahme des unselektiven COX-Hemmers Ibuprofen (n = 29, 390,9 mm²). Anders als beim primären Endpunkt ergab die selektive COX2 Hemmung mit Celecoxib keinen Unterschied in der mittleren maximalen Quaddelgröße (200 mg, n = 26, nicht signifikant P = 0,5445, Two-tailed Paired t-Test, **Abbildung 54**).

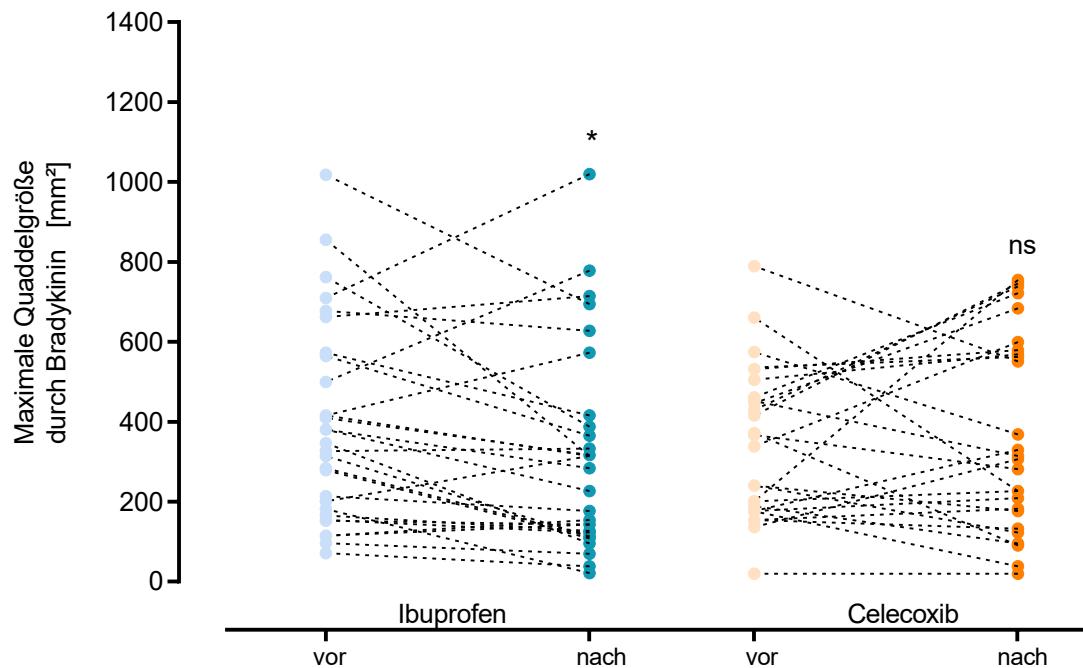


Abbildung 54: ABRASE: Darstellung der Variation der maximalen Quaddelgröße unter den Probanden vor und nach Einnahme von 600 mg Ibuprofen oder 200 mg Celecoxib.

Diese Änderungen wurden als sekundärer Endpunkt der ABRASE definiert. Obwohl es eine große Variation der maximalen Quaddelgrößen gab, wurde eine signifikante Verringerung nach 600 mg Ibuprofen Einnahme beobachtet ($n = 29$, $*P = 0.0277$, berechnet unter Verwendung eines Two-tailed Paired t-Test). Die Einnahme des selektiven COX2-Hemmers Celecoxib ergab keinen signifikanten Unterschied in der mittleren maximalen Quaddelgröße im Vergleich zu den Probanden ohne Vorbehandlung.

3.4.3 Einfluss auf den primären Endpunkt durch die Quaddelgröße

Aufgrund der deutlichen Variation der maximalen Quaddelgröße stellte sich die Frage, ob die Quaddelgröße selbst einen direkten Einfluss auf den primären Endpunkt der Studie hatte, das heißt, dass eine größere Quaddelgröße mit einer Verlängerung der Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddel verbunden ist oder umgekehrt. Um diesen speziellen Punkt zu untersuchen, wurde ein direkter Vergleich der maximalen Quaddelgröße zu den vordefinierten Messzeiten (5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min) durchgeführt. Wie in **Abbildung 55** dargestellt, wurde weder vor noch nach Ibuprofen oder Celecoxib Einnahme ein signifikanter Unterschied in der Variation der maximalen Quaddelgröße zwischen den verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Dies weist darauf hin, dass in der ABRASE-Studie die maximale Quaddelgröße keinen Einfluss auf die Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddeln hatte.

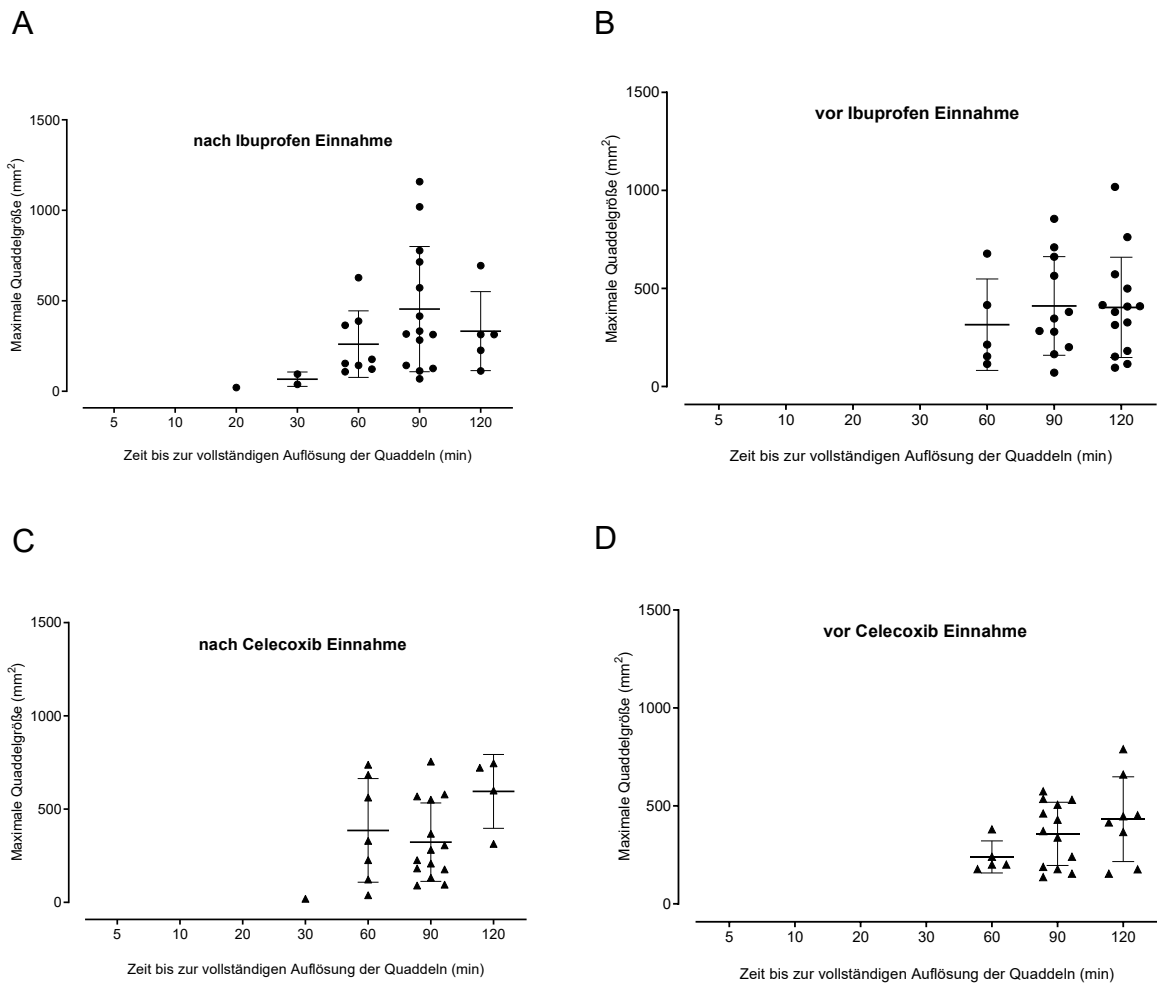


Abbildung 55: ABRASE: Die Diagramme geben die Beziehung zwischen der Variation der maximalen Quaddelgröße und der Zeit bis zur vollständigen Auflösung der maximalen Quaddelquaddel bei den Probanden vor und nach der Einnahme von 600 mg Ibuprofen oder von 200 mg Celecoxib wieder.

Zu jedem Zeitpunkt gab es eine beträchtliche Variation der maximalen Quaddelgröße. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen messbar. A. Vor Ibuprofen Einnahme ($n = 30$, $P = 0,8147$, berechnet unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests). B. Nach Ibuprofen Einnahme war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen messbar ($n = 27$, $P = 0,4784$, berechnet unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests). Auch die Experimente mit Celecoxib zeigten ebenfalls keine Signifikanz zwischen den Gruppen C. vor Celecoxib Einnahme ($n = 26$, $P = 0,3991$, berechnet unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests) und nach Celecoxib Einnahme ($n = 25$, $P = 0,1207$, berechnet unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests).

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Aktivierung von B2-Rezeptoren durch endogenes Bradykinin zur physiologischen Extravasation beiträgt. Es wurde ein neues transgenes Mausmodell entwickelt, das sich durch eine endothelspezifische Überexpression des B2-Rezeptors (B2^{tg}) auszeichnet und einen nicht-invasiven Zwei-Photonen-Lasermikroskopie-Ansatz zur Messung der Kinetik der spontanen Extravasation in vivo etabliert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression von B2-Rezeptoren in Leit- und Widerstandsgefäßen funktionell war, wie die B2-Rezeptor-vermittelte Aortendilatation auf Bradykinin in Gegenwart des unspezifischen COX-Hemmers Diclofenac bzw. die signifikante Hypotonie bei B2^{tg} zeigt. Die Messung der dermalen Extravasation mittels Miles Assay zeigte, dass die durch Bradykinin-induzierte Extravasation bei B2^{tg} im Vergleich zu B2ⁿ signifikant erhöht war. Allerdings hatten weder die endotheliale Überexpression von B2-Rezeptoren noch die Behandlung mit dem ACEI Moexipril oder dem B2-Antagonisten Icatibant irgendeine Auswirkung auf die mittels Zwei-Photonen-Lasermikroskopie gemessene spontane Extravasation. Bei Probanden reduzierte Ibuprofen signifikant die TTCCR ($p < 0.001$) und die maximale Quaddelgröße ($p = 0.0044$). Insgesamt scheint die Aktivierung von B2-Rezeptoren nicht an der spontanen Extravasation beteiligt zu sein. Daher wird die Annahme, dass die Behandlung mit einem ACEI zu einer Veränderung der physiologischen Gefäßbarrierefunktion führt, die zu einem nicht-allergischen Angioödem prädisponiert, durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht bestätigt.

4.1 Effekte der Überexpression humaner B2-Rezeptoren

Trotz umfangreicher Untersuchungen über Kinine sind die Rolle von Bradykinin bei der normalen Blutdruckregulierung und die spezifischen Funktionen, die durch seine B1- und B2-Rezeptoren vermittelt werden, noch immer unzureichend erforscht. Es wird seit langem angenommen, dass die kardiovaskulären und renalen Wirkungen von Bradykinin unter normalen Bedingungen über die B2-Rezeptoren ausgeübt werden, die konstitutiv in Herz-, Nieren- und Gefäßgeweben vorkommen und durch die Aktivierung der vasoaktiven Komponenten der Prostaglandin-NO-Kaskade wirken (Regoli & Barabé, 1980), während die B1-Rezeptoren durch Stimuli wie Gewebeschädigung und

bakterielle Lipopolysaccharide induzierbar sind und vor allem an entzündlichen und nozizeptiven Reaktionen beteiligt sind (Marceau et al., 1998; Regoli et al., 1981).

Bisherige pharmakologische Experimente mit selektiven Antagonisten des B2-Rezeptors bei normotensiven Ratten ergaben widersprüchliche Ergebnisse: Während einige einen akuten oder chronischen Anstieg des Blutdrucks nachwiesen (Benetos et al., 1986; Madeddu et al., 1995), zeigten andere keine Veränderung des normalen Blutdrucks (Bao et al., 1991; Madeddu et al., 1992), obwohl sie eine Verschlimmerung der durch Natrium (Madeddu et al., 1993) oder Angiotensin (Madeddu et al., 1994) induzierten Hypertonie während der B2-Rezeptorblockade nachwiesen. Die Interpretation dieser Ergebnisse wurde weiter verkompliziert, als sich herausstellte, dass einige dieser Bradykinin-Analoga eine sympathoadrenale Stimulation hervorrufen können, die der durch Bradykinin selbst ausgelösten ähnlich ist (Mulinari et al., 1988).

Die Verfügbarkeit von gentechnisch veränderten Mäusen mit Deletion der Bradykinin-Rezeptoren (Borkowski, 1995; Pesquero, 2000) ermöglichte eine weitere Aufklärung ihrer vaskulären Wirkungen: Mäuse mit ausgeschaltetem B2-Rezeptor-Gen sind bereits leicht hypertensiv (Duka et al., 2001, 2003; Madeddu et al., 1997) und zeigen eine ausgeprägte hypertensive Reaktion auf salzreiche Ernährung (Alfie et al., 1996), Deoxykortikosteronacetat-Salz-induzierte Hypertonie (Emanuelli et al., 1998) und exogene Angiotensin-II-Infusion (Madeddu et al., 1997), überraschenderweise aber nicht auf endogene Angiotensin-II-Stimulation durch Abklemmen der Nierenarterie (Duka et al., 2001). Weitere Untersuchungen des letztgenannten Modells ergaben, dass Mäuse, bei denen das B2-Rezeptor-Gen ausgeschaltet wurde, eine auffällige Hochregulierung des B1-Rezeptor Gens aufwiesen, die durch experimentelle Manipulationen noch verstärkt wurde (Duka et al., 2001) und dass B1-Rezeptoren einige der hämodynamischen Wirkungen der B2-Rezeptor Stimulation übernehmen konnten, indem sie Komponenten der Arachidonsäurekaskade aktivierten (Duka et al., 2003), obwohl sie die insulinsensibilisierenden Eigenschaften des B2-Rezeptors nicht ersetzen konnten (Duka et al., 2001). Es ist jedoch bekannt, dass Bradykinin mit einer Vielzahl lokaler humoraler Faktoren interagiert (Carretero & Scicli, 1991) und die Ausschaltung eines Gens kann durchaus kompensatorische Veränderungen während der Ontogenese bei anderen vasoaktiven Faktoren zur Folge haben, deren veränderter Status zum Phänotyp des gentechnisch veränderten Tieres beiträgt. In diesem Fall sind die Veränderungen in den vasoregulatorischen Systemen möglicherweise nicht repräsentativ für

den physiologischen Zustand. Im Gegensatz dazu sollte die chronische Hemmung eines bestimmten Faktors im erwachsenen, intakten Tier repräsentativer für die Folgen der Inaktivierung dieses Faktors sein und daher genauere Informationen über seine Eigenschaften und seine Wechselwirkung mit anderen für seine Funktion relevanten Faktoren liefern.

Die auf vaskuläre Endothelzellen gerichtete Überexpression humaner B2-Rezeptoren zeigte im vorliegenden Mausmodell B2^{tg} mehrere unterschiedliche Effekte. Trotz einer mehr als 15-fachen Überexpression von menschlicher B2-Rezeptor-mRNA wurde keine Veränderung der mRNA-Expression des murinen B2-Rezeptors in der Lunge von B2^{tg} gefunden, was auf eine starke Stabilität der B2-Rezeptorexpression hindeutet. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von boviner eNOS unter Verwendung desselben Promotors eine starke Reduktion der murinen eNOS-Expression (Suvorava et al., 2017). In glatten Gefäßmuskelzellen, Lungenfibroblasten, Trachealmuskel und bei Ratten wurde gezeigt, dass B2R in vivo durch Interleukin 1 β (Enquist et al., 2007), Glukokortikoide (Scherrer et al., 1999), Tumornekrosefaktor α (Haddad et al., 2000), Glukose (Christopher et al., 2001), Östrogen (Madeddu et al., 1997) und Plättchenwachstumsfaktor (Dixon et al., 1996) hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Berichte über eine B2R-Hochregulierung in Endothelzellen, einschließlich einer Reaktion auf Hypoxie und Lovastatin (Liesmaa et al., 2007, 2009). In diesen Berichten wurden mehrere Mechanismen beschrieben, die der erhöhten B2R-Genexpression zugrunde liegen und an denen die 3'- und die 5'-untranslatierte Region des B2R-Gens, die Transkriptionsfaktoren p53, KLF-4 und das cAMP-Response-Element-Bindungsprotein (CREB) bzw. das CREB-bindende Protein (CBP) beteiligt sind. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von CREB auch nach der Stimulierung von glatten Gefäßmuskelzellen mit NO-Donatoren auftritt. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die cGMP-abhängige Hemmung der Phosphodiesterase III und die anschließende Akkumulation von cAMP vermittelt (Steinbicker et al., 2011). In einer vorherigen Untersuchung konnte jedoch festgestellt werden, dass selbst NO-Konzentrationen, die etwa 1000-mal höher sind als die Steady-State-Konzentration von NO im menschlichen Gefäßsystem in vivo (Kojda et al., 1998; Vallance et al., 1995), die B2R-Expression in PAEC und bEND.3 nicht erhöhen (Khosravani et al., 2015). Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen überein, die in verschiedenen Mausmodellen in vivo erzielt wurden, was darauf hindeutet, dass der NO-cGMP-Signalweg wahrscheinlich

nicht an der B2R-Genexpression in Endothelzellen beteiligt ist. Das Gleiche gilt für stark vaskularisiertes Mausgewebe wie Lunge, Herzmuskel und Haut.

Unter Verwendung eines Reportergens wurde gezeigt, dass die Stimulierung des B2R mit Bradykinin die B2R-Promotoraktivität bei Ratten erhöht, was auf eine Hochregulierung dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors bei Stimulierung durch den Agonisten hindeutet (Schmidlin et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde kürzlich berichtet, dass die Dichte des mit grün fluoreszierendem Protein markierten und in HEK 293-Zellen transfizierten B2R bei längerer Stimulation mit inaktivierungsresistenten Bradykinin-Rezeptor-Agonisten abnahm. Gleichzeitig nahm die Dichte des freien grün fluoreszierenden Proteins zu (Schmidt et al., 2001). Diese Daten sprechen nicht für einen Mechanismus, der eine geringere Transkription und/oder eine geringere mRNA-Stabilität beinhaltet, sondern deuten auf einen posttranslationalen Mechanismus hin, der aus einer erhöhten Endozytose von B2R und einer anschließenden Desensibilisierung und/oder Degradation besteht. Höchstwahrscheinlich findet diese Art der Regulierung in Abwesenheit von NO-Signalen statt, da HEK 293-Zellen keine eNOS exprimieren (Kojda et al., 2001).

Die Stabilität der B2-Rezeptorexpression und -funktion wurde auch nach akuter und längerer Hemmung der endogenen Bradykininbildung durch einen C1-Esterase-Inhibitor oder die Hemmung der B2-Rezeptoren durch Icatibant beobachtet (Khosravani et al., 2015). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine verlängerte Stimulation mit inaktivierungsresistenten Bradykinin-Rezeptor-Agonisten auf einen posttranslationalen Mechanismus hinweist, der aus einer erhöhten Endozytose von B2-Rezeptoren und ihre anschließende Desensibilisierung und/oder Degradierung besteht (Bawolak et al., 2009). Es ist auch möglich, dass ein kleiner Teil des gesamten B2-Rezeptor-Pools auch in Abwesenheit seines Agonisten in der aktivierten Konformation vorliegt, so dass die endogenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren in ihrer natürlichen Umgebung in Abwesenheit eines Agonisten spontane Aktivität zeigen (Bond et al., 1995; Leeb-Lundberg et al., 2005). Wenn die Rezeptorexpression hoch ist, könnte ein kleiner Teil der Rezeptoren in der aktivierten Konformation ausreichen, um seine intrazellulären (zweiten) Botenstoffe zu aktivieren und seine Signaltransduktionswege zu leiten. Eine Überexpression des B2-Rezeptors könnte daher zu einem erheblichen Anstieg der Zahl spontan aktivierter B2-Rezeptoren in den transgenen Mäusen in Abwesenheit von Bradykinin führen und somit einen Anstieg der zellulären Konzentration von zweiten

Botenstoffen bewirken, um eine verstärkte physiologische Reaktion aufrechtzuerhalten. Ein Beispiel, das diese Möglichkeit unterstützt, sind die Studien mit transgenen Mäusen, die den β_2 -Adrenorezeptor überexprimieren (Milano et al., 1994).

4.2 Reaktivität der Aorta auf Bradykinin

Basierend auf früheren Berichten scheint es, dass die durch den B2-Rezeptor vermittelte gefäßerweiternde Wirkung von Bradykinin für die Durchblutung bestimmter Regionen, wie die Papillarregion der Niere (Fenoy et al., 1991) oder die subendokardiale Region des Myokards (Ruocco et al., 1995), wichtig ist, aber keinen wesentlichen Einfluss auf die systemische Hämodynamik hat. Das Ausbleiben einer systemischen hypertensiven Reaktion auf die Inaktivierung des B2-Rezeptors soll zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass die Ausschaltung des B2-Rezeptors zu einer Hochregulierung des B1-Rezeptors führt (Duka et al., 2003), der ebenfalls in der Lage ist, die Prostaglandin-NO-Kaskade zu aktivieren (Duka et al., 2003) und damit einen Anstieg des Gefäßwiderstands zu verhindern. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die gleichzeitige Hemmung beider Rezeptoren notwendig ist, um einen Anstieg des systemischen Blutdrucks zu bewirken, wie in früheren Studien mit B2-Rezeptor-Gen-Knockout-Mäusen gezeigt wurde, bei denen die Blockade des B1-Rezeptors eine signifikante hypertensive Reaktion hervorrief (Duka et al., 2003). Es ist jedoch zu beachten, dass bei den B2-Rezeptor-Gen-Knockout-Mäusen der Ausgangsblutdruck bereits leicht, aber signifikant höher ist als bei ihren Wildtyp-Pendants (Duka et al., 2001, 2003; Madeddu et al., 1997), obwohl eine pharmakologische B2-Rezeptorblockade den Blutdruck nicht erhöhte (Bao et al., 1991; Madeddu et al., 1992).

Um das vorliegende neue Tiermodell zu charakterisieren, wurde die Reaktivität der Aorta auf Bradykinin-Exposition untersucht (Bisha et al., 2018). In B2^{tg} wurde eine signifikant geringere, durch Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion gefunden, was auf eine tonische hemmende Wirkung hinweist, die durch die Überexpression humaner B2-Rezeptoren vermittelt wird. Dies mag überraschen, da ggf. eine stärkere Wirkung von Bradykinin in B2^{tg}-Aortenringen zu erwarten gewesen wäre. Die vasokonstriktori-sche Wirkung von Bradykinin war jedoch vollständig von der Aktivität der COX abhängig. Ähnliche Befunde wurden für abdominale Aortenringe von C57BL/6-Mäusen berichtet, die auf Bradykinin mit einer konzentrationsabhängigen Konstriktion reagierten,

die durch Icatibant fast vollständig aufgehoben wurde (Felipe et al., 2007). Außerdem konnte eine ähnliche vasomotorische Reaktion auf die Stimulation des B₂-Rezeptors in der thorakalen Aorta von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden (Khosravani et al., 2015). Die Feststellung, dass in einer früheren Studie die kontraktile Reaktion auf Bradykinin durch Indomethacin in der Bauchaorta der Maus bei intaktem Endothel signifikant reduziert wurden, deutet darauf hin, dass diese Reaktionen hauptsächlich durch vasokonstriktorisches Prostaglandin vermittelt werden (Felipe et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Prostaglandine, die aus dem Arachidonsäure-Cyclooxygenase-Stoffwechselweg stammen, die in der glatten Gefäßmuskulatur produziert werden können (Stankelabesque et al., 2004). Eine mögliche Beteiligung anderer Signalwege an den kontraktile Effekten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Es wurde auch beobachtet, dass die Hemmung von eNOS durch L-NAME die durch Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion in einem ähnlichen Ausmaß verstärkte wie die bei eNOS-defizienten Mäusen, die mit C57BL/6-Mäusen auf deren genetischen Hintergrund rückgekreuzt wurden (Khosravani et al., 2015). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Bradykinin in der Aorta der Maus die eNOS aktiviert und dadurch die Vasokonstriktion durch das COX-Produkt abschwächt. Allerdings erweiterte Bradykinin weder die Aortenringe von C57BL/6-Mäusen (Khosravani et al., 2015) noch die B₂ⁿ-Aortenringe nach Behandlung mit Diclofenac, während dies bei B₂^{tg} beobachtet wurde. Diese gefäßerweiternde Reaktion war abhängig von intaktem Endothel, der Aktivierung von B₂-Rezeptoren und der Aktivierung von eNOS. Es scheint also, dass die Überexpression humaner B₂-Rezeptoren im Aortenendothel die Signalkaskade in diesen Zellen zugunsten der Bildung von endogenem NO verändert haben könnte. Der mögliche Mechanismus der B₂-Rezeptor-vermittelten Extravasation über die Prostaglandinbildung ist in **Abbildung 56** veranschaulicht.

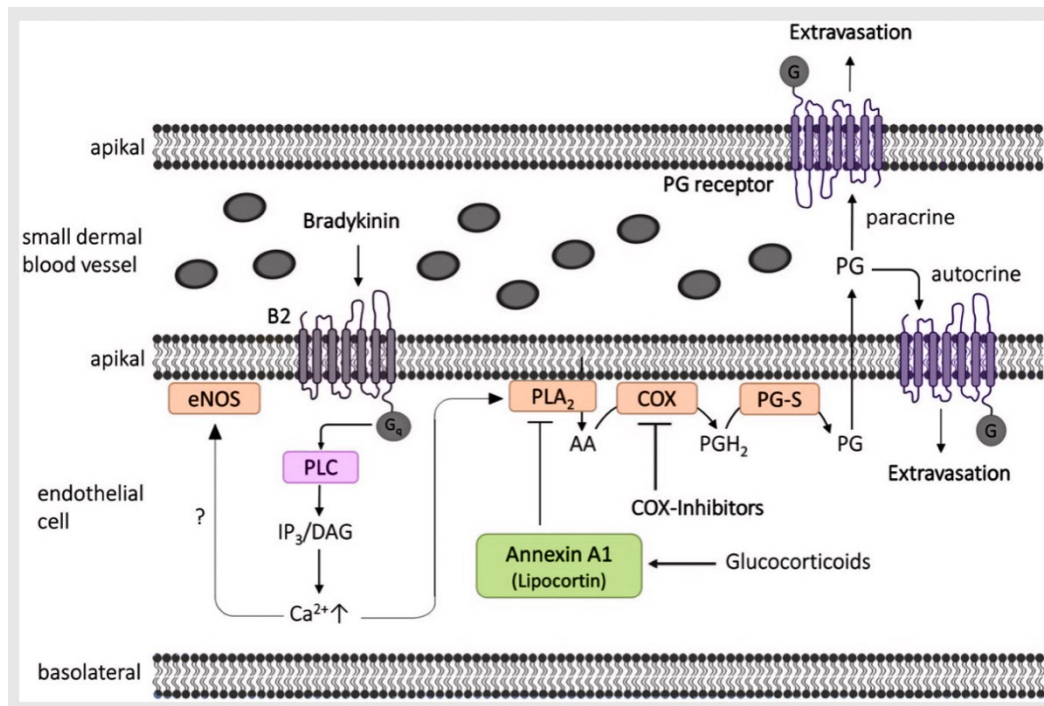


Abbildung 56: Grafische Darstellung des möglichen Mechanismus der Prostaglandinbildung für die dermale Extravasation, die durch die Aktivierung von Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (B2) ausgelöst wird.

B2 setzt das Bradykinin-Signal über den Gq-Transduktionsweg um, einschließlich der Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃), was zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca²⁺ führt. Dieses Ion bindet und aktiviert eine Vielzahl von intrazellulären Proteinen. Die Bindung an Calmodulin ist ein wesentlicher Schritt zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), während die Bindung an Phospholipase A₂ (PLA₂) dieses Enzym direkt zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Zellmembran stimuliert und die Bildung von PGH₂ durch Cyclooxygenasen (COX) einleitet (Fahimi et al. 2020). Dieses Prostaglandin fungiert als Substrat für eine Vielzahl von Prostaglandinsynthasen (PG-S), die schließlich zur Bildung spezifischer Prostaglandine führen. Nach ihrer Synthese werden diese Lipidmediatoren von der produzierenden Endothelzelle in kleine dermale Blutgefäße freigesetzt und aktivieren ihre Rezeptoren, die sich entweder in der produzierenden Zelle (autokrin) oder in benachbarten Zellen (parakrin) oder in beiden befinden (Fahimi et al. 2020). Diese Aktivierung endothelialer Prostaglandinrezeptoren könnte zur bradykinininduzierten Extravasation beitragen, d. h. zur Erhöhung des Flüssigkeitstransfers in den interstitiellen Raum (rote intravaskuläre Punkte zeigen rote Blutkörperchen an). Abbildung modifiziert aus (Fahimi et al. 2020).

Interessanterweise wurde berichtet, dass der B2-Rezeptor und eNOS in der Endothelzellmembran physisch miteinander verbunden sind, was zu einer Hemmung der eNOS-Aktivität führt (Ju et al., 1998). Die Aktivierung des B2-Rezeptors führt zu einer schnellen Dissoziation dieses heterodimeren Proteinkomplexes, was vermutlich zur Aktivierung von eNOS führt. Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass die Hemmung von eNOS durch die Interaktion zwischen dem B2-Rezeptor und eNOS den Elektronentransfer von Flavin zu Häm blockiert (Golser et al., 2000). Es ist daher denkbar, dass eine endothelspezifische Überexpression von B2-Rezeptoren zu einer größeren Anzahl von B2-Rezeptor-eNOS-Komplexen führt, was eine Sequestrierung des gesamten eNOS-Pools auf B2-Rezeptoren und möglicherweise weg von anderen eNOS-

hemmenden Endothelproteinen wie Caveolin (Drab et al., 2001) oder dem AT1-Rezeptor (Ju et al., 1998) zur Folge hat. Es sind jedoch weitere detaillierte molekulare Studien erforderlich, um diese Vermutung zu untermauern (Bisha et al., 2018).

Frühere Untersuchungen zeigten, dass Bradykinin eine starke kontraktile Reaktion in der Bauchaorta auslösen kann, die durch den B2-Rezeptorantagonisten Icatibant signifikant gehemmt wurde, was darauf hindeutet, dass dieser Agonist speziell von der Aktivierung dieses Rezeptors abhängt (Felipe et al., 2007). Allogho et al. zeigten, dass der Mausmagen funktionelle B1- und B2-Rezeptoren enthält und dass die Wirksamkeit von Bradykinin größer war als die von Des-Arg9-Bradykinin (Allogho et al., 1995). Weiterhin konnte durch die Analyse der Genexpression von B1- und B2-Rezeptoren die mRNA-Expression des B1-Rezeptors in frisch isolierter Maus-Aorta quantifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die durch Des-Arg9-Bradykinin vermittelten kontraktilen Reaktionen auf die Aktivierung des konstitutiven B1-Rezeptors und nicht auf dessen Hochregulierung zurückzuführen sind (Felipe et al., 2007). Untersuchungen zeigten auch, dass die Bradykinin-induzierten Kontraktionen durch die Entfernung des Endothels nicht beeinträchtigt wurden, was darauf hindeutet, dass die durch Kinine induzierte Vasokonstriktion im Gegensatz zur vasodilatatorischen Wirkung (Siragy et al., 1997; Zhou et al., 2004) auf eine direkte Wirkung auf die isolierte glatte Muskulatur der Maus-Aorta zurückzuführen ist (Felipe et al., 2007). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde die Bradykinin-induzierte Kontraktion nicht verändert, wenn die abdominale Aorta mit L-NAME behandelt wurde (Felipe et al., 2007). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine NO-abhängige Vasodilatation, die einen Teil der vasokonstriktorisches Wirkung von Bradykinin antagonisieren würde, basierend auf früheren Berichten unwahrscheinlich ist. Zu berücksichtigen ist, dass die Endothelin-1-induzierte Kontraktion desselben Präparats signifikant reduziert war, wenn L-NAME im Medium fehlte (Zhou et al., 2004), während dieser Effekt bei der Angiotensin-II-induzierten Kontraktion nicht beobachtet wurde (Zhou et al., 2003).

Im Gegensatz zur Bauchaorta der Maus, wo Kinine keine Relaxation von mit Noradrenalin-vokontrahierten Präparaten induzieren konnte, induzierte Bradykinin eine konzentrationsabhängige Entspannung in Phenylephrin-vorgezogenen Ratten-Aorta-Ringen, die durch Icatibant gehemmt wurde (Felipe et al., 2007). Diese Vasorelaxation der Rattenaorta mit intaktem Endothel wurde auf die Bildung von Cyclooxygenase-Produkten durch Aktivierung von B2-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen zurückgeführt (Fukada et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkung von

Kininen auf die Gefäße je nach Tierart und Lokalisation im Organismus sehr unterschiedlich sein kann. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse und zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

4.3 Einfluss der Überexpression auf den Blutdruck

In einer früheren Untersuchung wurde eine allgemeine Überexpression menschlicher B2-Rezeptoren mit einem hypotensiven Phänotyp in Verbindung gebracht, was auf eine funktionell aktive Überexpression von B2-Rezeptoren in Widerstandsgefäßen schließen lässt (Wang et al., 1997). In diesem Bericht kam es zu einem ähnlichen Blutdruckabfall, was darauf hindeutet, dass dieser Effekt nach einer allgemeinen Überexpression durch den Rous-Sarkom-Virus-30-LTR-Promotor auch durch Endothelzellen vermittelt wurde. Ebenso haben B2-Rezeptor-defiziente Mäuse einen Anstieg des systolischen und mittleren Blutdrucks von etwa 20 mmHg (Madeddu et al., 1997, 1999), was dem Anstieg des Blutdrucks ähnelt, der nach einer Unterbrechung der eNOS festgestellt wurde (Kojda et al., 1999; Shesely et al., 1996).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Ang II die NO-Produktion in vaskulären Endothelzellen stimuliert, indem es die Synthese und Freisetzung von Bradykinin steigert (Wiemer et al., 1993). In der frühen Phase der Hypertonie, wenn der erhöhte Blutdruck durch erhöhtes Ang II aufrechterhalten wird, ist die endothelabhängige Vasodilatation nicht vermindert, sondern kann sogar gesteigert werden. Tatsächlich führt die Hemmung der NO-Synthese bei hypertensiven Ratten zu einem übermäßigen Anstieg des Blutdrucks und einem Rückgang des kontralateralen Nierendurchflusses (Sigmon & Beierwaltes, 1993). Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte NO-Freisetzung eine kompensatorische Reaktion auf die vasokonstriktorische Aktivität des aktivierten RAAS darstellen könnte. Derselbe vasodilatatorische Mechanismus könnte zur Pufferung der Angiotensin II unabhängigen Vasokonstriktion während der chronischen Phasen der Hypertonie beitragen (Sigmon & Beierwaltes, 1998). Ein Mangel an NO-Freisetzung, der auf die unterbrochene Signalübertragung durch endogene Kinine zurückzuführen ist, könnte die Entwicklung der renovaskulären Hypertonie verschlimmern. Eine dysfunktionale endothelabhängige Vasodilatation in hypertensiven Mäusen wird durch die Beobachtung dokumentiert, dass sie eine reduzierte Blutdruckreaktion auf chronische

NO-Synthase-Hemmung und eine Rechtsverschiebung der Dosis-Druck-Reaktionskurve auf Acetylcholin zeigen (Alfie et al., 1996). Es ist bekannt, dass neben NO auch andere relaxierende Faktoren wie PGE₂ und endogenes, von Arachidonat abgeleitetes Cannabinoid (Arachidonylethanolamid/Anandamid) die vaskulären Wirkungen von BK vermitteln (Randall et al., 1996; Vanhoutte, 1989). Es sind weitere Studien erforderlich, um festzustellen, ob die Ausschaltung des B₂-Rezeptorgens die Hypertonie durch Beeinträchtigung der Produktion von PGE₂ und/oder endogenem Cannabinoid verschlechtert. Andere unvorhergesehene Anpassungsmechanismen, die bei Tieren stattfinden, die während ihrer Entwicklung einem höheren Blutdruck ausgesetzt sind, könnten ebenfalls zur Verstärkung der Druckreaktion auf das Clipping (Abklemmung der Gefäße) bei B₂^{-/-}-Knockout-Mäusen beigetragen (Fleming, 2016).

Da L-NA oder Diclofenac keinen Einfluss auf die Blutdrucksenkung in B₂^{tg} hatten, ist es unwahrscheinlich, dass die Gefäßerweiterung der Widerstandsgefäße in B₂^{tg} durch die Aktivierung der eNOS und die anschließende vermehrte Bildung von NO oder die Freisetzung von gefäßerweiternden Prostaglandinen vermittelt wird. Daher scheint es möglich, dass die Senkung des Blutdrucks in B₂^{tg} aus einer erhöhten Freisetzung eines endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktors resultiert, der unempfindlich gegenüber einer Hemmung von eNOS und COX ist (Fleming, 2016). So wurde beispielsweise gezeigt, dass Bradykinin in kleinen Koronararterien von Schweinen 11,12-Epoxyeicosatriensäure produziert (Fisslthaler et al., 1999). Weitere Studien sind erforderlich, um die genauen Mechanismen zu bewerten, die diesem Aspekt der kardiovaskulären Physiologie von B^{tg} zugrunde liegen.

4.4 Erhöhte Gefäßpermeabilität durch Bradykinin

Die Pathophysiologie des durch ACEi induzierten Angioödems wird hauptsächlich durch die Bradykinin-induzierte Aktivierung der vaskulären B₂-Rezeptoren vermittelt, da die Behandlung mit ACEi den Bradykinin-Abbau weitgehend hemmt (Bas et al., 2007). Die erste klinische Studie, die sich mit letzterem befasst, hat gezeigt, dass die pharmakologische Hemmung von ACE die B₂-Rezeptoraktivierung bei Hypertonikern erhöht (Gainer et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass die akute blutdrucksenkende Wirkung von Captopril nach Blockade von B₂ mit Hoe140 (icatibant) um etwa die Hälfte vermindert war. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass nach Hemmung von

ACE eine erhöhte Aktivierung von B2-Rezeptoren zur Blutdrucksenkung beiträgt. In einer späteren Studie an einigen wenigen Patienten, darunter einem, der an einem ACEi-induzierten Angioödem litt, wurde berichtet, dass der Bradykininspiegel im Plasma nach Absetzen des ACEi abnahm (Nussberger et al., 1998). Experimentelle Studien an transgenen Mäusen haben durchweg gezeigt, dass die durch Bradykinin-induzierte Zunahme der Extravasation durch die Überaktivierung von B2-Rezeptoren vermittelt wird (Bas et al., 2007; Han et al., 2002; Oschatz et al., 2011). Daher ist es nicht überraschend, dass randomisierte, kontrollierte klinische Studien zeigten, dass der spezifische B2-Rezeptorblocker Icatibant die Schwere der Symptome und die Zeit bis zum vollständigen Verschwinden der Symptome, d. h. die Geschwindigkeit der Erholung, bei erblichem Angioödem (Cicardi et al., 2010) und bei ACEi-induziertem Angioödem (Baş et al., 2015) wirksam reduziert.

Es wurde der Miles Assay zur Quantifizierung der dermalen Extravasation des Albumin-gebundenen Farbstoffs Evans-Blau verwendet, wie er ursprünglich von Miles & Miles (1952) beschrieben wurde (Bisha et al., 2018). Dieser Assay wurde in der Vergangenheit häufig verwendet, um den Anstieg der Extravasation als Reaktion auf die intradermalen Entzündungsstimuli zu untersuchen (Nagy et al., 2008). Der Miles Assay wurde jedoch nur selten zur Untersuchung der Bradykinin-induzierten Extravasation bei Mäusen verwendet. In einer Studie verdoppelte die intradermale Injektion von Bradykinin die Extravasation in C57BL/6-Mäusen innerhalb von 20 min, aber es wurde keine Dosisabhängigkeit festgestellt (Benest et al., 2013). Hier konnte durch gleichzeitige Injektion steigender Konzentrationen gezeigt werden, dass Bradykinin die Extravasation dosisabhängig erhöht, wobei ein signifikanter Anstieg bei einer Dosis von 0,6 nmol beobachtet wurde (Bisha et al., 2018). Wie erwartet, wurde die erhöhte Extravasation auf Bradykinin spezifisch durch B2-Rezeptoren vermittelt. Auch die Injektion von Labradimil, einem B2-Agonisten, der wesentlich stabiler gegenüber abbauenden Peptidasen wie ACE ist (Shimuta et al., 1999), zeigte fast identische Ergebnisse (Bisha et al., 2018). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine endothelspezifische Überexpression von B2-Rezeptoren die Extravasation als Reaktion auf Bradykinin verstärkte, was auf eine funktionelle Überexpression in kleinen Hautgefäßen hindeutet (Bisha et al., 2018).

Zur Erklärung der Bewegung von Makromolekülen durch das Gefäßendothel wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen (Curry & Adamson, 1999; Feng et al., 1999;

McDonald et al., 1999; Michel & Neal, 1999). Interzelluläre und transzellulärer Transportmechanismen, endotheliale Vesikelfusion, vesikulovakuoläre Organellen, Transzytose und Fenestrationsen werden als mögliche Faktoren angesehen. In den klassischen Studien von Majno und Palade wurden endotheliale Lücken mit dem Austritt von Plasma aus entzündeten Venolen in Verbindung gebracht (Majno & Palade, 1961). Die Ergebnisse vieler späterer Studien stimmen mit diesen Befunden überein (Adamson et al., 2003; Hirata et al., 1995; Hulström & Svensjö, 1979). Das Vorhandensein von Endothelspalten an Stellen, an denen partikuläre Tracer austreten, und die Extravasation von Tracern aus entzündeten Gefäßen nach der Fixierung liefern weitere Beweise für Öffnungen im Endothel, welche eine Extravasation ermöglichen, die durch Druckgradienten und nicht durch transzellulären Transport angetrieben wird (McDonald et al., 1999; Wettschureck et al. 2019). Unter Ausgangsbedingungen trägt die Signalisierung von Adhäsionsproteinen wie VE-Cadherin zur Aufrechterhaltung des Ruhephänotyps von Endothelzellen bei (Dejana et al., 2000; Vestweber, 2000). Entzündungsmediatoren ändern dies zum Teil durch Wirkungen auf das Zytoskelett, die mit Adhäsionsproteinen verbunden sind (Waschke, Baumgartner, et al., 2004; Waschke et al., 2005). Die Kontraktion von Zytoskelett-Elementen scheint für die Lückenbildung nicht wesentlich zu sein. Vielmehr bilden sich Lücken durch elastisches Zurückfedern der Endothelzellränder, wenn die funktionellen und zytoskelettalen Verbindungen punktuell geschwächt oder gestört sind (Waschke, Baumgartner, et al., 2004; Waschke, Drenckhahn, et al., 2004). Die Erforschung der genauen Mechanismen könnte neue therapeutische Zielmoleküle identifizieren, um die Extravasation therapeutisch zu reduzieren (Wettschureck et al.; 2019).

Auch wurde in der vorliegenden Studie herausgefunden, dass der unspezifische COX-Inhibitor Diclofenac die Wirkung von Bradykinin auf die dermale Extravasation stark verringert (Bisha et al., 2018). Es ist bekannt, dass Prostaglandine wie PGE₂ die Wirkung von Bradykinin auf die endotheliale Permeabilität verstärken, während sie bei Injektion ohne Bradykinin nur eine sehr geringe Extravasation auslösen. So führt beispielsweise die gleichzeitige intradermale Injektion von Prostaglandinen und Bradykinin bei Kaninchen zu einer viel größeren Flüssigkeitsextravasation, d. h. Ödembildung, als die alleinige Injektion von Bradykinin (Williams, 1973). Dies wurde auf die gefäßerweiternde Wirkung von PGE₂ zurückgeführt, die den Blutfluss in der Injektionsregion erhöht (Williams, 1977). In einer Studie wurde eine starke Hemmung der durch die Kombination von Bradykinin/PGI₂-induzierten dermalen Extravasation bei Mäusen mit

PGI₂-Rezeptormangel im Vergleich zu transgen negativen Mäusen nachgewiesen. Ein möglicher Einfluss des Rezeptormangels auf die Reaktion auf Bradykinin allein wurde jedoch nicht untersucht (Murata et al., 1997). In einer anderen Studie an der Ohrhaut von FVB/NJcl-Mäusen wurde berichtet, dass die Injektion von PGE₂ eine erhöhte Extravasation auslöste, die durch die Aktivierung der E-Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 vermittelt wurde (Omori et al., 2014). Obwohl diese Studien eindeutig die wichtige Rolle der Prostaglandine bei der Plasmaextravasation unter entzündlichen Bedingungen aufzeigten, wurde bisher keine Untersuchung durchgeführt, um die Rolle der Prostaglandine zu bewerten, die als Reaktion auf Bradykinin, während der Bradykinin-induzierten Ödembildung gebildet werden. Unsere Daten deuten jedoch stark darauf hin, dass die Bildung von Prostaglandinen als Reaktion auf die Aktivierung von B₂-Rezeptoren in kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität beitragen könnte (Bisha et al., 2018).

4.5 Funktionelle Aspekte der ACE-vermittelten Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion

Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) ist ein Ektoenzym, das die Umwandlung von Angiotensin I in den Vasokonstriktor Angiotensin II sowie den Abbau des starken Vasodilators Bradykinin katalysiert (Jaspard et al., 1992). Beim Menschen werden zwei verschiedene Formen von ACE exprimiert, eine somatische Form, die besonders häufig auf der Endotheloberfläche der Lunge vorkommt und ein kleineres Isoenzym, das ausschließlich in den Hoden zu finden ist. Es wird angenommen, dass die Aktivität des somatischen ACE eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulierung und bei Prozessen spielt, die mit dem Gefäßumbau verbunden sind. Dies wird am besten durch die Tatsache verdeutlicht, dass der In-vivo-Gentransfer von ACE in die unverletzte Karotisarterie der Ratte zur Entwicklung einer Gefäßhypertrophie führt, die von systemischen Faktoren und hämodynamischen Effekten unabhängig ist. Es wurde berichtet, dass die Hemmung der ACE-Aktivität die Endothelfunktion verbessert (Mancini et al., 1996) und den Gefäßumbau stimuliert (Schartl et al., 1994) sowie das Fortschreiten der Arteriosklerose (Lonn et al., 2001) und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse beim Menschen abschwächt (Lonn et al., 2001; ONTARGET Investiga-

tors et al., 2008). Ursprünglich wurde angenommen, dass die schädlichen Auswirkungen von ACE auf das kardiovaskuläre System auf die Bildung von Angiotensin II zurückzuführen sind, das eine Kaskade von Ereignissen in Gang setzt, die eine erhöhte Produktion freier Radikale und die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen einschließt. Da Bradykinin jedoch viel leichter von ACE hydrolysiert wird als Angiotensin I (Jaspard et al., 1992; Soubrier et al., 1993), kann die Hydrolyse von Bradykinin ebenfalls zu diesem Phänomen beitragen. Tatsächlich sind die kardioprotektiven Wirkungen des ACE-Hemmers Ramipril bei Mäusen, denen das B2-Kinin-Rezeptor-Gen fehlt, vermindert (Yang et al., 2001). In den letzten zehn Jahren gab es jedoch eine Reihe von Berichten, die zeigen, dass ACE-Hemmer die Reaktionen auf Bradykinin in kontinuierlich perfundierten Systemen verstärken können, bei denen nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Akkumulation des Peptids schnell genug erfolgt, um die beobachteten Effekte zu erklären (Benzing et al., 1999; Hecker et al., 1994). Darüber hinaus verstärken ACE-Hemmer auch die Wirkungen von ACE-resistenten Analoga von Bradykinin (Hecker et al., 1997, 1994), verhindern die Sequestrierung des B2-Rezeptors über Caveolae (Benzing, 1999) und reaktivieren den desensibilisierten B2-Kinin-Rezeptor (Benzing et al., 1999; Marcic et al., 1999). Da ACE-Hemmer nicht direkt an den B2-Rezeptor binden (Minshall, 1997), wurde vorgeschlagen, dass eine Form von „Cross-Talk“ zwischen ACE und dem B2-Kinin-Rezeptor stattfinden könnte (Benzing et al., 1999; Minshall et al., 1997).

Auf den ersten Blick scheint ACE ein unwahrscheinlicher Kandidat für ein Signaltransduktionsmolekül zu sein, da es eine Zinkmetallopeptidase ist und die zytoplasmatische Domäne des Enzyms kurz ist (nur 29 Aminosäuren). Mindestens zwei andere Ektoenzyme, Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) (Galt et al., 2002) und ADAM12 (Kang et al., 2000), wurden jedoch mit einer Signalfunktion in Verbindung gebracht. MMPs haben gut dokumentierte Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalübertragung als Folge der extrazellulären Spaltung von Proteinen wie Big Endothelin-1 (Fernandez-Patron et al., 1999), Calcitonin Gene-Related Peptide (Fernandez-Patron et al., 2000) und Thrombin (Fernandez-Patron et al., 2000). Eine direkte Rolle als Signaltransduktionsmolekül wurde jedoch MMP-1 in Thrombozyten auf der Grundlage der Beobachtung zugeschrieben, dass seine Aktivierung die Tyrosinphosphorylierung sowie die Ausrichtung von $\beta 3$ -Integrin auf Bereiche mit Zellkontakt deutlich erhöht (Galt et al., 2002). Darüber hinaus können Mitglieder der ADAM-Familie (A-Disintegrin und

A-Metalloprotease) nicht nur aktive Signalmoleküle wie EGF aus inaktiven Vorläuferformen als Reaktion auf eine Reihe von Stimuli freisetzen (Prenzel et al., 1999; Yan et al., 2002), sondern auch eine aktive Rolle bei der Signaltransduktion spielen. So ist ADAM12 in der Lage, über die Bindung der Tyrosinkinase Src an spezifische Domänen innerhalb seines kurzen zytoplasmatischen Schwanzes intrazelluläre Signalübertragung zu initiieren (Kang et al., 2000). Die genauen Mechanismen der Interaktionen von ACE sind jedoch immer noch nicht ausreichend erforscht.

In der vorliegenden Studie sollten experimentelle Beweise für die Hypothese erbracht werden, dass die pharmakologische Hemmung von ACE die endotheliale Barrierefunktion durch Erhöhung der stationären Plasmaspiegel von Bradykinin vermindern kann, indem ein funktioneller Ansatz verwendet wurde (Bisha et al., 2018). Es wurde herausgefunden, dass Moexipril die durch eine mittlere Bradykinin-Dosis ausgelöste Extravasation verstärkte, nicht aber die durch höhere oder niedrigere Dosen ausgelöste. Es könnte argumentiert werden, dass hohe intradermale Konzentrationen von Bradykinin die Wirkung von ACE auf die Bradykinin-Aktivität überschatten (Bisha et al., 2018). Es bleibt jedoch zu klären, warum Moexipril bei der niedrigsten Bradykinin Dosis keine Wirkung zeigte. Wir vermuteten, dass dies eine Folge einer zu niedrigen Moexipril-Dosis sein könnte. Bei höheren Dosen bewirkte Moexipril jedoch eine Senkung des Blutdrucks, was zu einer verringerten durch Bradykinin und Histamin induzierten Extravasation führte, vermutlich aufgrund einer Zentralisierung des Blutflusses (Bisha et al., 2018). Es wurde berichtet, dass eine Dosis von $2,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG}$ Captopril den mittleren Blutdruck bei Mäusen um etwa 40 mmHg auf weniger als 80 mmHg senkt (Emanuelli et al., 1998). Bei einer Moexipril-Dosis, die dieser Captopril-Dosis entspricht, lösten weder Bradykinin noch Histamin eine nachweisbare Extravasation aus, auch nicht bei der höchsten intradermalen Dosis von 2 nmol pro Injektion. Daher deuten die Daten der vorliegenden Studie darauf hin, dass die Hemmung von ACE die durch Bradykinin-induzierte Extravasation verstärkt (Bisha et al., 2018).

Der Miles Assay scheint zwar eine zuverlässige Methode zur Messung von Veränderungen der dermalen Extravasation zu sein, die durch verschiedene Interventionen hervorgerufen werden, hat jedoch gewisse Einschränkungen (Nagy et al., 2008). So eignet sich der Assay beispielsweise nicht für die Quantifizierung spontaner Extravasate. Im Gegensatz dazu bietet die Zwei-Photonen-Laser-Methode diesen Vorteil und ermöglicht es, die spontane Extravasation der rot fluoreszierenden 10 kDa-Sonde aus dem in-

travaskulären Raum in den interstitiellen Raum auf kontinuierliche Weise zu untersuchen, wie bereits berichtet (Egawa et al., 2013). Um einen möglichen Beitrag von B2-Rezeptoren zur spontanen Extravasation zu bewerten wurden drei verschiedene Ansätze verwendet, nämlich die Wirkung einer funktionell aktiven Überexpression des Rezeptors in kleinen Hautgefäßen, die Wirkung von Icatibant und die Wirkung von Moexipril (Bisha et al., 2018). In keiner dieser Situationen wurden Veränderungen in der Kinetik der spontanen Extravasation beobachtet. Die Genauigkeit der Messungen zur Akkumulation im Gewebe ist jedoch weniger zuverlässig als im intravaskulären Raum. Dies ist das Ergebnis eines weniger genauen Fokus, da es nicht möglich ist, vordefinierte Messbereiche festzulegen. Im intravaskulären Raum erfolgt dies nach Injektion des grünen 250 kDa-Fluoreszenzfarbstoffs, der den Messbereich genau anzeigt. In auffälligem Gegensatz dazu sind die Messungen im Gewebe selbst eher diffus. Dies gilt auch für die Messung der extravaskulären Autofluoreszenz, die sich im Laufe der Zeit nicht verändert und nicht korrekt subtrahiert werden kann. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die Aktivierung von B2-Rezeptoren wahrscheinlich nicht zur spontanen Extravasation bei Mäusen beiträgt (Bisha et al., 2018).

4.6 ABRASE-Studie

Die ABRASE-Studie wurde initiiert, um die Rolle der COX-Aktivität für die Bradykinin-induzierte Extravasation beim Menschen zu untersuchen (Gholamreza-Fahimi et al., 2020). Die intradermale Injektion von Bradykinin bildet ein interstitielles Reservoir, aus dem das Kinin kontinuierlich in die kleinen Blutgefäße der Haut abgegeben wird. Dieser lokale Anstieg von Bradykinin führt zur Bildung sichtbarer und tastbarer Quaddeln, wie in den Ergebnissen gezeigt. Experimentelle Hinweise deuten darauf hin, dass das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem durch Bradykinin vermittelt wird und daher nicht auf die Standardtherapie mit Antihistaminika ansprechen dürfte. Glukokortikoide induzieren nachweislich die Expression von ACE und könnten dadurch möglicherweise den Bradykinin-Stoffwechsel beschleunigen (Dasarathy et al., 1992; Hubert et al., 1991). Ihre Verwendung zur Behandlung des nicht-allergischen Angioödems wurde jedoch bisher nicht systematisch untersucht. Obwohl die kausale Rolle von Bradykinin beim ACE-Hemmer-induzierten Angioödem noch nicht vollständig geklärt ist, ist ACE das wichtigste Enzym, das den Abbau von Bradykinin im Plasma und in den Geweben

reguliert. Studien an Tieren sowie Studien am Menschen haben gezeigt, dass die Blockierung von B2-Rezeptoren die blutdrucksenkende Wirksamkeit von ACE-Hemmern abschwächt (Gainer et al., 1998; Hoover et al., 2010). Icatibant ist daher eine logische Behandlungsoption für ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme. In Anlehnung an klinische Studien, in denen der B2-Antagonist Icatibant zur Behandlung des HAE (Cicardi et al., 2010) und des ACE-induzierten Angioödems (Baş et al., 2015) eingesetzt wurde, wurde die Zeit bis zur vollständigen Auflösung der Quaddeln als primärer Endpunkt gewählt. Es wird angenommen, dass die Auflösung der dermalen Extravasation und des Angioödems durch den Abbau von Bradykinin und den Lymphabfluss vermittelt wird (Nagy et al., 2008), aber die klinischen Studien mit Icatibant bei nicht-allergischen Angioödemern deuten darauf hin, dass die Hemmung der B2-Aktivierung durch den B2-Antagonismus offensichtlich dazu beiträgt (Baş et al., 2015; Cicardi et al., 2010). In dieser Studie verkürzte die unselektive Hemmung der COX-Aktivität mit Ibuprofen signifikant die Zeit bis zum vollständigen Verschwinden der Symptome und führte zu einer Verringerung der maximalen Quaddelgröße, was darauf hindeutet, dass die Hemmung der B2-Signaltransduktion, die dem B2-Agonismus nachgeschaltet ist, sowohl die Entwicklung als auch die Persistenz der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation beim Menschen abschwächt (Gholamreza-Fahimi et al., 2020).

Die Wirkung von 600 mg Ibuprofen auf die dermale Extravasation bei gesunden Freiwilligen, was einer empfohlenen Einzeldosis zur Behandlung von Schmerzen, Fieber und Entzündungen entspricht, war geringer als die Wirkung bei Mäusen (Gholamreza-Fahimi et al., 2020). Abgesehen von der höheren Dosis pro kg Körpergewicht bei Mäusen wurde Ibuprofen durch i. p. Injektion und nicht oral verabreicht. Es ist bekannt, dass die i. p. Injektion zu einer schnelleren Resorption führt, die mit einer kürzeren Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (t_{max}) und einer höheren maximalen Plasmakonzentration (c_{max}) verbunden ist (Salama et al., 2016). Dieser Verabreichungsweg wird beim Menschen nur selten für die systemische Verabreichung von Arzneimitteln verwendet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die aktive Ibuprofen Plasmakonzentration zum Zeitpunkt der Bradykinin Injektion bei Mäusen wesentlich höher war. Darüber hinaus könnte sich die Signalisierung von Bradykinin in kleinen dermalen Blutgefäßen bei Mäusen von der Situation beim Menschen insofern unterscheiden, als bei Mäusen eine größere Abhängigkeit von der COX-Aktivität besteht. In großen Blutgefäßen von Mäusen, wie z. B. Aortenringpräparaten, bewirkt

Bradykinin eine Verengung, die vollständig von der durch die Aktivierung von B2 induzierten COX-Aktivität abhängig ist (Bisha et al., 2018; Felipe et al., 2007; Khosravani et al., 2015). Im Gegensatz dazu bewirkt die kontinuierliche Infusion von Bradykinin in die Arteria brachialis beim Menschen eine Vasodilatation und einen Anstieg des Blutflusses im Unterarm, während der COX-Hemmer Aspirin keine Wirkung zeigte (Benjamin et al., 1989). Darüber hinaus bewirkte der NOS-Inhibitor NG-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) eine starke Hemmung des Bradykinin-induzierten Blutflusses im Unterarm von Menschen (Cockcroft et al., 1994), während NOS bei Mäusen nicht zur Bradykinin-induzierten Extravasation der Haut beitrug. Interessanterweise hängt der erhöhte Blutfluss nach einer Bradykinin-Infusion weitgehend von der Vasodilatation der Widerstandsgefäße ab, was darauf hindeutet, dass die durch Bradykinin-induzierte COX-Aktivierung in diesen Gefäßen beim Menschen von geringerer Bedeutung ist. Die Ergebnisse von ABRASE deuten jedoch darauf hin, dass beim Menschen die COX-Aktivität maßgeblich an der durch Bradykinin-induzierten endothelialen Hyperpermeabilität in den kleinen Hautgefäßen beteiligt ist, was darauf schließen lässt, dass die Bradykinin-Signalgebung in diesen beiden Gefäßbetten unterschiedlich ist (Gholamreza-Fahimi et al., 2020).

Es gab in den letzten Jahren weitere Studien der Arbeitsgruppe um Kojda et al. die im Kontext der vorliegenden Arbeit diskutiert werden sollten. Die Studie von Strassen et al. untersuchte die Wirksamkeit von C1-Esterase-Inhibitor (C1INH) bei der Behandlung von ACE-Hemmer-induziertem Angioödem (Strassen et al., 2023). Obwohl C1INH seit vielen Jahren als wirksame und zugelassene Behandlung bei Bradykinin-vermitteltem hereditärem Angioödem bekannt ist, zeigte die Studie, dass C1INH im Kontext einer Standardbehandlung mit Steroiden und Antihistaminika gegenüber Placebo weniger wirksam war. Es ist wichtig zu betonen, dass die Studie von Strassen et al. eine doppelblinde, multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Studie war, die eine hohe Qualität der Evidenz liefert. Dennoch bleibt die Frage offen, ob C1INH bei Patienten, die auf die Standardbehandlung nicht ausreichend ansprechen, eine bessere Wirksamkeit zeigen könnte (Strassen et al., 2023).

Die Studie von Hahn et al. analysierte den Einfluss von ACE-Hemmer Behandlung auf die C1INH Werte (Hahn et al., 2019). Die Autoren fanden heraus, dass eine Inkubation von Blutproben mit Captopril zu einer dosisabhängigen Abnahme der C1INH-Aktivität und -Konzentration führte. Bei Patienten, die erstmals eine ACE-Hemmer Behandlung erhielten, zeigten sich jedoch heterogene Reaktionen der C1INH Werte. Die Autoren

schlugen vor, dass größere Studien über längere Zeiträume erforderlich sind, um mögliche Korrelationen zwischen der Wirkung von ACE-Hemmer Therapie auf C1INH Werte und dem klinischen Verlauf oder der Entwicklung von Nebenwirkungen zu finden (Hahn et al., 2019).

Die experimentelle Studie von Krybus et al. untersuchte die Rolle von COX-1 abhängiger Prostaglandin Produktion bei dermalen Exsudation nach Aktivierung von B2-Rezeptoren in kleinen dermalen Blutgefäßen der Maus (Krybus et al., 2022). Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Inhibition von Prostacyclin-Produktion und/oder -Signalisierung eine geeignete Option für die akute Behandlung von nicht-allergischem Angioödem sein könnte. Es ist jedoch wichtig, weitere Studien durchzuführen, um diese Ergebnisse zu bestätigen und mögliche Nebenwirkungen einer solchen Therapie zu untersuchen (Krybus et al., 2022).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es trotz verschiedener zugelassener Therapeutika zur Behandlung des hereditären Angioödems bislang keine etablierte Pharmakotherapie anderer durch Bradykinin-induzierter Angioödeme existiert, vor allem nicht für das ACE-Hemmer induzierte Angioödem, welches aufgrund der starken Verbreitung dieser Arzneistoffe der häufigste durch Bradykinin vermittelte Angioödem überhaupt darstellt. Möglicherweise stellen die neu berichteten Mechanismen der Signalkaskade nach Aktivierung des B2-Rezeptors eine Möglichkeit dar, bestimmte Zielproteine identifizieren, deren pharmakologische Beeinflussung weitere Optionen bereitstellt.

4.7 Limitationen der Untersuchungen

Unsere Studie hat einige Einschränkungen. Erstens sind die Ergebnisse aus dem vorliegenden Mausmodell nicht direkt auf dem Menschen übertragbar. Zweitens kann nicht zwischen den bekannten Extravasationswegen differenziert werden. Im Allgemeinen können Plasmaflüssigkeit und Proteine die Endothelschranke auf einem parazellulären und einem transzellulären Weg passieren und beide Wege sind an der physiologischen und pathophysiologischen Extravasation, d. h. an der Entstehung von Ödemen, beteiligt (Bisha et al., 2018). Parazelluläres Extravasat in Kapillaren, das hauptsächlich Flüssigkeit und kleine Moleküle transportiert, erfolgt durch interendotheliale Verbindungen (kontinuierliche Kapillaren) und/oder Endothelzellporen (gefenserte Kapillaren) (Mehta & Malik, 2006) und beide Arten von Kapillaren sind in der

menschlichen Haut vorhanden (Takada & Hattori, 1972). Im Gegensatz dazu ist der transzelluläre Weg (Transzytose) für den Großteil des Proteintransports über die Endothelbarriere verantwortlich, zum Beispiel für das am häufigsten vorkommende interstitielle Protein Albumin. Dieser Weg ist durch Vesikel gekennzeichnet, die von George E. Palade entdeckt und mit der Extravasation in Verbindung gebracht wurden (Majno & Palade, 1961; Weibel & Palade, 1964). Schließlich ist derzeit nicht bekannt, ob andere Mediatoren als Prostaglandine und/oder Veränderungen in der endothelialen Glykokalyx zu der durch Bradykinin-induzierten Extravasation beitragen. Weitere Studien sind erforderlich, um dies genauer zu untersuchen.

Auch die ABRASE-Studie hat mehrere Einschränkungen (Gholamreza-Fahimi et al., 2020). Ibuprofen ist ein unspezifischer COX-Inhibitor, der die Frage offenlässt, ob COX1, COX2 oder beide zur Entwicklung und Persistenz der dermalen Extravasation beim Menschen beitragen. Die Ergebnisse von ABRASE schließen auch einen Beitrag der NOS-Aktivität zur Bradykinin-induzierten Hyperpermeabilität nicht aus. Schließlich deckt die intradermale Injektion von Bradykinin nur einen Teil der Pathophysiologie des nicht-allergischen Angioödems ab und es ist bislang ungewiss, ob die COX-Aktivität bei diesem Zustand eine Rolle spielt. Nichtsdestotrotz ist die Aktivierung von B2 ein entscheidender Schritt in der Entwicklung eines nicht-allergischen Angioödems (Baş et al., 2015; Cicardi et al., 2010) und die Daten der vorliegenden Studie legen nahe, dass die COX-Aktivität zur Bradykinin-induzierten Extravasation beim Menschen beiträgt (Gholamreza-Fahimi et al., 2020).

4.8 Schlussfolgerung

Insgesamt legen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nahe, dass die Aktivierung von B2-Rezeptoren durch endogenes Bradykinin wahrscheinlich nicht zur physiologischen Extravasation beiträgt (Bisha et al., 2018). Die Annahme, dass die Behandlung mit einem ACEi zu einer Veränderung der physiologischen Gefäßbarrierefunktion führt, die zu einem nicht-allergischen Angioödem prädisponiert, wird daher durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie nicht gestützt (Bisha et al., 2018). Die ABRASE-Studie liefert Evidenz für einen Beitrag der COX-Aktivität zur Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation bei Mäusen und Menschen (Gholamreza-Fahimi et al., 2020). Die Identifizierung der Prostaglandine sowie der entsprechenden Rezeptoren

beim Menschen könnte neue Behandlungsmöglichkeiten für nicht-allergische Angioödeme eröffnen und auf eine mögliche Wirkung von Medikamenten hinweisen, die die Freisetzung von Arachidonsäure beeinträchtigen.

Zusammenfassung

Das nicht-allergische Angioödem ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch die Aktivierung von Bradykinin-Typ-2-Rezeptoren (B2-Rezeptoren) vermittelt wird. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Aktivierung von B2-Rezeptoren durch endogenes Bradykinin zur physiologischen Extravasation beiträgt. Dies könnte ein neues Licht auf die Annahme werfen, dass die Behandlung mit einem Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACEI) zu einer Veränderung der vaskulären Barrierefunktion führt, die zu einem nicht-allergischen Angioödem prädisponiert. Wir haben ein neues transgenes Mausmodell entwickelt, das sich durch eine endothelspezifische Überexpression des B2-Rezeptors (B2^{tg}) auszeichnet und einen nicht-invasiven Zwei-Photonen-Lasermikroskopie-Ansatz zur Messung der Kinetik der spontanen Extravasation in vivo etabliert. Die B2^{tg} Mäuse zeigten eine normale Morphologie und Wurfgröße im Vergleich zu ihren transgen-negativen Wurfgeschwistern (B2ⁿ). Die Überexpression von B2-Rezeptoren war in Leit- und Widerstandsgefäßen funktionell, wie die B2-Rezeptor-vermittelte Aortendilatation auf Bradykinin in Gegenwart des unspezifischen COX- Hemmers Diclofenac bzw. die signifikante Hypotonie bei B2^{tg} zeigt. Die Messung der dermalen Extravasation mittels Miles Assay zeigte, dass die durch Bradykinin-induzierte Extravasation bei B2^{tg} im Vergleich zu B2ⁿ signifikant erhöht war. Allerdings hatten weder die endotheliale Überexpression von B2-Rezeptoren noch die Behandlung mit dem ACEI Moexipril oder dem B2-Antagonisten Icatibant irgendeine Auswirkung auf die mittels Zwei-Photonen-Lasermikroskopie gemessene spontane Extravasation. Somit scheint die Aktivierung von B2-Rezeptoren nicht an der spontanen Extravasation beteiligt zu sein. Daher wird die Annahme, dass die Behandlung mit einem ACEI zu einer Veränderung der physiologischen Gefäßbarrierefunktion führt, die zu einem nicht-allergischen Angioödem prädisponiert, durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht bestätigt. In der multizentrischen klinischen Studie ABRASE erhielten 38 gesunde Freiwillige i. d. Bradykinin-Injektionen in den ventralen Unterarm vor und nach einer oralen Behandlung mit dem COX-Hemmer Ibuprofen (600 mg). Primärer Endpunkt der ABRASE-Studie war die mittlere Zeit bis zum vollständigen Abklingen der Quaddeln (TTCR), sekundärer Endpunkt war die Veränderung der maximalen Quaddelgröße. Bei Probanden reduzierte Ibuprofen signifikant die TTCR ($p < 0.001$) und die maximale Quaddelgröße ($p = 0.0044$). Auch wenn B2 für die nicht stimulierte bzw. physiologische Extravasation wahrscheinlich keine Rolle spielt, weisen

die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen auf eine signifikante Beteiligung der Bildung von Prostaglandinen im Rahmen der Signaltransduktion nach Aktivierung von B2 sowohl bei Mäusen als beim Menschen hin. Auf dieser Grundlage könnten weitere Untersuchungen, beispielsweise zur Identifizierung dieser Prostaglandine, Anstoß für mögliche neue Therapieoptionen wie der spezifischen Blockade von deren Rezeptoren sein.

Summary

Non-allergic angioedema is a life-threatening disease mediated by the activation of bradykinin type 2 receptors (B2 receptors). The aim of this study was to investigate whether activation of B2 receptors by endogenous bradykinin contributes to physiological extravasation. This could shed new light on the assumption that treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) leads to a change in vascular barrier function that predisposes to non-allergic angioedema. We have developed a new transgenic mouse model characterized by endothelial-specific overexpression of the B2 receptor (B2^{tg}) and established a non-invasive two-photon laser microscopy approach to measure the kinetics of spontaneous extravasation in vivo. The B2^{tg} mice showed normal morphology and litter size compared to their transgene-negative littermates (B2ⁿ). The overexpression of B2 receptors was functional in conduction and resistance vessels, as shown by B2 receptor-mediated aortic dilation to bradykinin in the presence of the non-specific COX inhibitor diclofenac and significant hypotension in B2^{tg}, respectively. Measurement of dermal extravasation by Miles assay showed that bradykinin-induced extravasation was significantly increased in B2^{tg} compared to B2ⁿ. However, neither endothelial overexpression of B2 receptors nor treatment with the ACEI moexipril or the B2 antagonist Icatibant had any effect on spontaneous extravasation measured by two-photon laser microscopy. Thus, B2 receptor activation does not appear to be involved in spontaneous extravasation. Therefore, the assumption that treatment with an ACEI leads to a change in physiologic vascular barrier function predisposing to non-allergic angioedema is not confirmed by our results. In the multicenter clinical trial ABRASE, 38 healthy volunteers received i. d. bradykinin injections in the ventral forearm before and after oral treatment with the COX inhibitor ibuprofen (600 mg). The primary endpoint of the ABRASE study was the mean time to complete resolution of wheals (TTCR); the secondary endpoint was the change in maximum wheal size. In volunteers, ibuprofen significantly reduced TTCR ($p < 0.001$) and maximum wheal size ($p = 0.0044$). Although B2 probably plays no role in non-stimulated or physiological extravasation, the results of the studies presented here indicate a significant involvement of prostaglandin formation in signal transduction following B2 activation in both mice and humans. On this basis, further investigations, for example to identify these prostaglandins, could provide the impetus for possible new therapeutic options such as the specific blockade of their receptors.

Literaturverzeichnis

- Abadir PM. The frail renin-angiotensin system. *Clin Geriatr Med*. 2011;27(1):53-65. doi:10.1016/j.cger.2010.08.004
- Adamson RH, Zeng M, Adamson GN, Lenz JF, Curry FE. PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(1):H406-H417. doi:10.1152/ajpheart.00021.2003
- Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992;71(4):206-215. doi:10.1097/00005792-199207000-00003
- Agostoni A, Cicardi M, Cugno M, Zingale LC, Gioffré D, Nussberger J. Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Immunopharmacology*. 1999;44(1-2):21-25. doi:10.1016/s0162-3109(99)00107-1
- Agostoni A, Gardinali M, Frangi D, et al. Activation of complement and kinin systems after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. A comparison between streptokinase and recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation*. 1994;90(6):2666-2670. doi:10.1161/01.cir.90.6.2666
- Agostoni A, Cicardi M. Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Saf*. 2001;24(8):599-606. doi:10.2165/00002018-200124080-00004
- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100(2):158–173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
- Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006429. doi:10.1101/cshperspect.a006429
- Ajayi AA, Adigun AQ. Angioedema and cough in Nigerian patients receiving ACE inhibitors. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(1):81–82. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00207.x
- Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA. Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(3):625–630. doi:10.1006/bbrc.1996.1076

- Allogho SN, Gobeil F, Pheng LH, Nguyen-Le XK, Neugebauer W, Regoli D. Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73(12):1759–1764. doi:10.1139/y95-240
- Ariano A, D'Apolito M, Bova M, et al. A myoferlin gain-of-function variant associates with a new type of hereditary angioedema. *Allergy.* 2020;75(11):2989–2992. doi:10.1111/all.14454
- Asero R. Leukotriene receptor antagonists may prevent NSAID-induced exacerbations in patients with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;85(2):156–157. doi:10.1016/S1081-1206(10)62457-X
- Atalay E, Omurca MT, Cigsar G, Omurca F, Aslan N, Yildiz M. Angiotensin converting enzyme inhibitor-related angioedema: A case of an unexpected death. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14:642–645. (Note: This reference was manually formatted as the citation could not be retrieved automatically.)
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165–177. doi:10.1038/nrm2639
- Aygören-Pürsün E, Magerl M, Maetzel A, Maurer M. Epidemiology of Bradykinin-mediated angioedema: a systematic investigation of epidemiological studies. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):73. doi:10.1186/s13023-018-0815-5
- Bachvarov DR. Bradykinin B2 receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:19–26. (Note: This reference was manually formatted as the citation could not be retrieved automatically.)
- Bader M, Santos RA, Unger T, Steckelings UM. New therapeutic pathways in the RAS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012;13(4):505–508. doi:10.1177/1470320312466519
- Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, et al. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(3):1009–1017. doi:10.1016/j.jaci.2017.05.020
- Balla Z, Zsilinszky Z, Pólai Z, et al. The importance of complement testing in acquired angioedema related to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(2):947–955. doi:10.1016/j.jaip.2020.08.052

- Bao G, Qadri F, Stauss B, Stauss H, Gohlke P, Unger T. HOE 140, a new highly potent and long-acting bradykinin antagonist in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 1991;200(1):179–182. doi:10.1016/0014-2999(91)90684-i
- Barr AJ, Brass LF, Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem.* 1997;272(4):2223–2229. doi:10.1074/jbc.272.4.2223
- Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffmann TK, Kojda G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. *Allergy.* 2007;62(8):842–856. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01427.x
- Bas M, Greve J, Stelter K, et al. Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series. *Ann Emerg Med.* 2010;56(3):278–282. doi:10.1016/j.annemergmed.2010.03.032
- Baş M, Greve J, Stelter K, et al. A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema. *N Engl J Med.* 2015;372(5):418–425. doi:10.1056/NEJMoa1312524
- Bas M, Greve J, Strassen U, Khosravani F, Hoffmann TK, Kojda G. Angioedema induced by cardiovascular drugs: new players join old friends. *Allergy.* 2015;70(10):1196–1200. doi:10.1111/all.12680
- Bas M, Hoffmann TK, Bier H, Kojda G. Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;59(2):233–238. doi:10.1111/j.1365–2125.2004.02268.x
- Bas M, Hoffmann TK, Kojda G. Evaluation and management of angioedema of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;14(3):170–175. doi:10.1097/01.moo.0000193202.85837.7d
- Batenburg WW, Garrelds IM, van Kats JP, Saxena PR, Danser AHJ. Mediators of bradykinin-induced vasorelaxation in human coronary microarteries. *Hypertension.* 2004;43(2):488–492. doi:10.1161/01.HYP.0000110904.95771.26
- Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010;87(2):262–271. doi:10.1093/cvr/cvq105

- Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*. 2002;39(4-5):225–237. doi:10.1016/s1537-1891(03)00011-9
- Bavbek S, Celik G, Ediger D, Mungan D, Demirel YS, Misirligil Z. The use of nimesulide in patients with acetylsalicylic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance. *J Asthma*. 1999;36(8):657–663. doi:10.3109/02770909909055417
- Bawolak MT, Fortin S, Bouthillier J, et al. Effects of inactivation-resistant agonists on the signalling, desensitization and down-regulation of bradykinin B(2) receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;158(5):1375–1386. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00409.x
- Beauchêne C, Martins-Héricher J, Denis D, Martin L, Maillard H. Tranexamic acid as first-line emergency treatment for episodes of bradykinin-mediated angioedema induced by ACE inhibitors. *Rev Med Interne*. 2018;39(10):772–776. doi:10.1016/j.revmed.2018.04.014
- Beltrami L, Zanichelli A, Zingale L, Vacchini R, Carugo S, Cicardi M. Long-term follow-up of 111 patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema. *J Hypertens*. 2011;29(11):2273–2277. doi:10.1097/HJH.0b013e32834b4b9b
- Beltrami L, Zingale LC, Carugo S, Cicardi M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema: how to deal with it. *Expert Opin Drug Saf*. 2006;5(5):643–649. doi:10.1517/14740338.5.5.643
- Benest AV, Kruse K, Savant S, et al. Angiopoietin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage. *PLoS One*. 2013;8(8):e70459. doi:10.1371/journal.pone.0070459
- Benetos A, Gavras I, Gavras H. Hypertensive effect of a bradykinin antagonist in normotensive rats. *Hypertension*. 1986;8(11):1089–1092. doi:10.1161/01.hyp.8.11.1089
- Benjamin N, Cockcroft JR, Collier JG, Dollery CT, Ritter JM, Webb DJ. Local inhibition of converting enzyme and vascular responses to angiotensin and bradykinin in the human forearm. *J Physiol*. 1989;412(1):543–555. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017630

- Bennett V. Bradykinin. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier; 2007:1–3. doi:10.1016/B978-008055232-3.61337-6
- Benzing T, Fleming I, Blaukat A, Müller-Esterl W, Busse R. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation*. 1999;99(15):2034–2040. doi:10.1161/01.cir.99.15.2034
- Bernstein JA, Cremonesi P, Hoffmann TK, Hollingsworth J. Angioedema in the emergency department: a practical guide to differential diagnosis and management. *Int J Emerg Med*. 2017;10(1):15. doi:10.1186/s12245-017-0141-z
- Bernstein JA, Moellman JJ, Collins SP, Hart KW, Lindsell CJ. Effectiveness of ecallantide in treating angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema in the emergency department. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015;114(3):245–249. doi:10.1016/j.anai.2014.12.007
- Bindke G, Gehring M, Wieczorek D, Kapp A, Buhl T, Wedi B. Identification of novel biomarkers to distinguish bradykinin-mediated angioedema from mast cell-/histamine-mediated angioedema. *Allergy*. 2022;77(3):946–955. doi:10.1111/all.15013
- Binkley KE, Davis A 3rd. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(3 Pt 1):546–550. doi:10.1067/mai.2000.108106
- Bircher AJ. Drug-induced urticaria and angioedema caused by non-IgE mediated pathomechanisms. *Eur J Dermatol*. 1999;9(8):657–663.
- Bisha M, Dao VTV, Gholamreza-Fahimi E, et al. The role of bradykinin receptor type 2 in spontaneous extravasation in mice skin: implications for non-allergic angioedema. *Br J Pharmacol*. 2018;175(10):1607–1620. doi:10.1111/bph.14166
- Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, Adam A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*. 2000;21(12):1903–1940. doi:10.1016/s0196-9781(00)00348-x
- Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, et al. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunopharmacology*. 1999;43(2–3):293–302. doi:10.1016/s0162-3109(99)00133-2

- Blaukat A. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*. 1999;38(4):1300–1309. doi:10.1021/bi981727r
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 1998;86(4):1245–1257. doi:10.1016/s0306-4522(98)00058-x
- Bond RA, Leff P, Johnson TD, et al. Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature*. 1995;374(6519):272–276. doi:10.1038/374272a0
- Bonner N, Panter C, Kimura A, et al. Development and validation of the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) induced angioedema investigator rating scale and proposed discharge criteria. *BMC Health Serv Res*. 2017;17(1):366. doi:10.1186/s12913-017-2274-4
- Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet*. 2000;356(9225):213–217. doi:10.1016/S0140-6736(00)02483-1
- Bork K, Machnig T, Wulff K, et al. Clinical features of genetically characterized types of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: a systematic review of qualitative evidence. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):289. doi:10.1186/s13023-020-01570-x
- Bork K, Wulff K, Möhl BS, et al. Novel hereditary angioedema linked with a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 gene mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(4):1041–1048. doi:10.1016/j.jaci.2021.01.011
- Bork K, Wulff K, Rossmann H, et al. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. *Allergy*. 2019;74(12):2479–2481. doi:10.1111/all.13869
- Bork K, Wulff K, Steinmüller-Magin L, et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy*. 2018;73(2):442–450. doi:10.1111/all.13270
- Bork K, Wulff K, Witzke G, Staubach P, Hardt J, Meinke P. Gene mutations linked to hereditary angioedema in solitary angioedema patients with normal C1 inhibitor.

- J Allergy Clin Immunol Pract. 2023;11(8):2441–2449. doi:10.1016/j.jaip.2023.01.051
- Borkowski JA. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem.* 1995;270(23):13706–13710. doi:10.1074/jbc.270.23.13706
- Bossi F, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Tedesco F. Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability. *Immunol Lett.* 2011;140(1-2):7-13. doi:10.1016/j.imlet.2011.06.006
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown NJ, Byiers S, Carr D, Maldonado M, Warner BA. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ACE inhibitor-associated angioedema. *Hypertension.* 2009;54(3):516–523. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134197
- Brown NJ, Ray WA, Snowden M, Griffin MR. Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;60(1):8–13. doi:10.1016/S0009-9236(96)90161-7
- Brown NJ, Snowden M, Griffin MR. Recurrent angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Surv Anesthesiol.* 1998;42(4):226. doi:10.1097/00132586-199808000-00040
- Burches E, Gómez-Vida JM, Ferrer M. Amiodarone-induced angioedema. *Allergy.* 2000;55(11):1199–1200.
- Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(1):24–29. doi:10.1016/s0165-6147(02)00005-6
- Byrd JB, Woodard-Grice A, Stone E, et al. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema with transplant and immunosuppressant use. *Allergy.* 2010;65(11):1381–1387. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02398.x

- Byrd JB, Touzin K, Sile S, et al. Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. *Hypertension*. 2008;51(1):141–147. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096552
- Byrd JB, Shreevatsa A, Putlur P, et al. Dipeptidyl peptidase IV deficiency increases susceptibility to angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced peritracheal edema. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):403–408. doi:10.1016/j.jaci.2007.04.012
- Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):872–880. doi:10.1038/nri935
- Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev*. 2000;52(1):91–112.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol*. 1989;257(1 Pt 2):H324-9. doi:10.1152/ajpheart.1989.257.1.H324
- Campbell DJ. Bradykinin Peptides. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier; 2013:1386–1393. doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00188-3
- Campbell DJ, Krum H, Esler MD. Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation*. 2005;111(3):315–320. doi:10.1161/01.CIR.0000153269.07762.3B
- Campos MM, Calixto JB. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*. 2000;34(5):314-322. doi:10.1054/npep.2000.0823
- Carretero OA, Scicli AG. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension*. 1991;18(3 Suppl):I58–69. doi:10.1161/01.hyp.18.3_suppl.i58
- Cha YJ, Pearson VE. Angioedema due to losartan. *Ann Pharmacother*. 1999;33(9):936–938. doi:10.1345/aph.18396

- Chaaya G, Afridi F, Faiz A, et al. When nothing else works: Fresh frozen plasma in the treatment of progressive, refractory angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *Cureus*. 2017;9(1):e972. doi:10.7759/cureus.972
- Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(2):H137–52. doi:10.1152/ajpheart.00618.2015
- Chavez A, Smith M, Mehta D. New insights into the regulation of vascular permeability. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;290:205–248. doi:10.1016/B978-0-12-386037-8.00001-6
- Chen SX, Hermelin D, Weintraub SJ. Possible donor-dependent differences in efficacy of fresh frozen plasma for treatment of ACE inhibitor-induced angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(6):2087–2088. doi:10.1016/j.jaip.2019.02.027
- Chen XL, Nam JO, Jean C, et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell*. 2012;22(1):146–157. doi:10.1016/j.devcel.2011.11.002
- Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10623–10628. doi:10.1073/pnas.1434429100
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165(1):196–203. doi:10.1016/0006-291x(89)91054-1
- Christiansen SC, Eddleston J, Woessner KM, et al. Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2002;169(4):2054–2060. doi:10.4049/jimmunol.169.4.2054
- Christopher J, Velarde V, Zhang D, Mayfield D, Mayfield RK, Jaffa AA. Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1537–46. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1537
- Chrysant SG, Chrysant GS. Pharmacological and clinical profile of moexipril: a concise review. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(8):827–836. doi:10.1177/0091270004267194

- Cicardi M, Aberer W, Banerji A, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 2014;69(5):602–616. doi:10.1111/all.12380
- Cicardi M, Banerji A, Bracho F, et al. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 2010;363(6):532–541. doi:10.1056/NEJMoa0906393
- Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, et al. Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 2010;363(6):523–531. doi:10.1056/NEJMoa0905079
- Cicardi M, Zingale LC, Bergamaschini L, Agostoni A. Angioedema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor use: outcome after switching to a different treatment. *Arch Intern Med*. 2004;164(8):910–913. doi:10.1001/archinte.164.8.910
- Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Ritter JM. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on kinin-induced vasodilation in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol*. 1994;38(4):307–310. doi:10.1111/j.1365-2125.1994.tb04358.x
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press; 2011. doi:10.17226/12910
- Cooney C, Nagy A. Angio-oedema associated with risperidone. *BMJ*. 1995;311(7014):1204. doi:10.1136/bmj.311.7014.1204c
- Cooper JP, Quarry DP, Beale DJ, Chappell AG. Life-threatening, localized angio-oedema associated with streptokinase. *Postgrad Med J*. 1994;70(826):592–593. doi:10.1136/pgmj.70.826.592
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258–264. doi:10.1038/35025229
- Craig TJ, Bernstein JA, Farkas H, Bouillet L, Boccon-Gibod I. Diagnosis and treatment of bradykinin-mediated angioedema: outcomes from an angioedema expert consensus meeting. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;165(2):119–127. doi:10.1159/000368404

- Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Lusinskas FW, Mayadas TN. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood*. 2005;105(5):1950–1955. doi:10.1182/blood-2004-05-1987
- Curry FE, Adamson RH. Transendothelial pathways in venular microvessels exposed to agents which increase permeability: The gaps in our knowledge. *Microcirculation*. 1999;6(1):3–5. doi:10.1111/j.1549-8719.1999.tb00083.x
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, et al. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol*. 2015;172(14):3461–3471. doi:10.1111/bph.12856
- Danser AHJ, Roks AJM. Emerging drugs affecting the renin–angiotensin system. *Clinical Applications of Renin–Angiotensin System Inhibitors*. Published online February 2012:104-114. doi:10.2217/ebo.11.183
- Dao, V. T.-V. (2011). *Neue Mechanismen der kardiovaskulären Protektion durch körperliches Training* [Heinrich Heine Universität]. Düsseldorf, Germany.
- Dasarathy Y, Lanzillo JJ, Fanburg BL. Stimulation of bovine pulmonary artery endothelial cell ACE by dexamethasone: involvement of steroid receptors. *Am J Physiol*. 1992;263(6 Pt 1):L645-9. doi:10.1152/ajplung.1992.263.6
- Davis AE 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol*. 1988;6(1):595-628. doi:10.1146/annurev.iy.06.040188.003115
- De Maat S, Hofman ZLM, Maas C. Hereditary angioedema: the plasma contact system out of control. *J Thromb Haemost*. 2018;16(9):1674–1685. doi:10.1111/jth.14209
- Dean DE, Schultz DL, Powers RH. Asphyxia due to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor mediated angioedema of the tongue during the treatment of hypertensive heart disease. *J Forensic Sci*. 2001;46(5):1239–1243. doi:10.1520/jfs15129j
- Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):218–223. doi:10.1097/moh.0b013e3283523e1c
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol*. 2000;44(6):743–748.

- Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248(4951):73–76. doi:10.1126/science.2321027
- Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1286–1289. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.092
- Dixon BS, Sharma RV, Dennis MJ. The bradykinin B2 receptor is a delayed early response gene for platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271(23):13324–13332. doi:10.1074/jbc.271.23.13324
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res*. 2000;87(5):E1–9. doi:10.1161/01.res.87.5.e1
- Douglas RG, Sharma RK, Masuyer G, et al. Fragment-based design for the development of N-domain-selective angiotensin-1-converting enzyme inhibitors. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(4):305–313. doi:10.1042/CS20130403
- Drab M, Verkade P, Elger M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 2001;293(5539):2449–2452. doi:10.1126/science.1062688
- Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1487–1500. doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1487
- Duerr M, Glander P, Diekmann F, Dragun D, Neumayer HH, Budde K. Increased incidence of angioedema with ACE inhibitors in combination with mTOR inhibitors in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(4):703–708. doi:10.2215/CJN.07371009
- Duka A, Duka I, Gao G, Shenouda S, Gavras I, Gavras H. Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E268–74. doi:10.1152/ajpendo.00382.2005
- Duka A, Kintsurashvili E, Duka I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. *Hypertension*. 2008;51(5):1352–1357. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.108506

- Duka I, Duka A, Kintsurashvili E, Johns C, Gavras I, Gavras H. Mechanisms mediating the vasoactive effects of the B1 receptors of bradykinin. *Hypertension*. 2003;42(5):1021–1025. doi:10.1161/01.HYP.0000097550.98865.35
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the B1Bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res*. 2001;88(3):275–281. doi:10.1161/01.res.88.3.275
- Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension*. 2001;38(6):1355-1360. doi:10.1161/hy1201.096574
- Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000;356(9237):1255-1259. doi:10.1016/S0140-6736(00)02799-9
- Egawa G, Nakamizo S, Natsuaki Y, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Sci Rep*. 2013;3(1):1932. doi:10.1038/srep01932
- Emanuelli C, Grady EF, Madeddu P, et al. Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P. *Hypertension*. 1998;31(6):1299–1304. doi:10.1161/01.hyp.31.6.1299
- Emanuelli C, Fink E, Milia AF, et al. Enhanced blood pressure sensitivity to deoxycorticosterone in mice with disruption of bradykinin B2 receptor gene. *Hypertension*. 1998;31(6):1278–1283. doi:10.1161/01.hyp.31.6.1278
- Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT. The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(2):105–123. doi:10.2165/00003088-200140020-00003
- Enquist J, Skräder C, Whistler JL, Leeb-Lundberg LMF. Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol*. 2007;71(2):494–507. doi:10.1124/mol.106.030858
- Erickson DL, Coop CA. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema treated with c1-esterase inhibitor: A case report and review of the literature. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2016;7(3):168–171. doi:10.2500/ar.2016.7.0166

- Farkas H, Dóczy A, Szabó E, Varga L, Csuka D. Screening for plasminogen mutations in hereditary angioedema patients. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):402. doi:10.3390/genes12030402
- Felipe SA, Rodrigues ES, Martin RP, Paiva AC, Pesquero JB, Shimuta SI. Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(5):649–655. doi:10.1590/s0100-879x2007000500007
- Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation*. 1999;6(1):23–44. doi:10.1111/j.1549-8719.1999.tb00085.x
- Fenoy FJ, Scicli G, Carretero O, Roman RJ. Effect of an angiotensin II and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopril. *Hypertension*. 1991;17(6_pt_2):1038–1044. doi:10.1161/01.hyp.17.6.1038
- Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999;85(10):906–911. doi:10.1161/01.res.85.10.906
- Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Role of matrix metalloproteinase-2 in thrombin-induced vasorelaxation of rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(5):H1473-9. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.5.H1473
- Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res*. 2000;87(8):670–676. doi:10.1161/01.res.87.8.670
- Fincham CI, Bressan A, Paris M, Rossi C, Fattori D. Bradykinin receptor antagonists--a review of the patent literature 2005-2008. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(7):919–941. doi:10.1517/13543770902994389
- Fishel RS, Eisenberg S, Shai SY, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC. Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1995;25(3):343–349. doi:10.1161/01.hyp.25.3.343
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999;401(6752):493–497. doi:10.1038/46816

- Fleming I. The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling. *Vascul Pharmacol.* 2016;86:31–40. doi:10.1016/j.vph.2016.03.001
- Friedmann PS. Assessment of urticaria and angio-oedema. *Clin Exp Allergy.* 1999;29 Suppl 3:109-112; discussion 113-5. doi:10.1046/j.1365-2222.1999.0290s3109.x
- Frye CB, Pettigrew TJ. Angioedema and photosensitive rash induced by valsartan. *Pharmacotherapy.* 1998;18(4):866–868. doi:10.1002/j.1875-9114.1998.tb03912.x
- Fuchs SA, Koopmans RP, Guchelaar HJ, Brodie-Meijer CCE, Meyboom RHB. Are angiotensin II receptor antagonists safe in patients with previous angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema? *Hypertension.* 2001;37(1):E1. doi:10.1161/01.hyp.37.1.e1
- Fujimoto J, Hori M, Itoh T, Ichigo S, Nishigaki M, Tamaya T. Danazol decreases transcription of estrogen receptor gene in human monocytes. *Gen Pharmacol.* 1995;26(3):507–516. doi:10.1016/0306-3623(94)00227-e
- Fukada SY, Tirapelli CR, de Godoy MAF, de Oliveira AM. Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(2):136–143. doi:10.1097/01.fjc.0000151929.34896.c3
- Fukuhara S, Sako K, Minami T, et al. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):513–526. doi:10.1038/ncb1714
- Gabb GM, Ryan P, Wing LM, Hutchinson KA. Epidemiological study of angioedema and ACE inhibitors. *Aust N Z J Med.* 1996;26(6):777-782. doi:10.1111/j.1445–5994.1996.tb00624.x
- Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med.* 1998;339(18):1285–1292. doi:10.1056/NEJM199810293391804
- Gainer JV, Nadeau JH, Ryder D, Brown NJ. Increased sensitivity to bradykinin among African Americans. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(2):283–287. doi:10.1016/s0091-6749(96)70151-3

- Galt SW, Lindemann S, Allen L, et al. Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. *Circ Res*. 2002;90(10):1093–1099. doi:10.1161/01.res.0000019241.12929.eb
- Gangnus T, Burckhardt BB. Targeted LC-MS/MS platform for the comprehensive determination of peptides in the kallikrein-kinin system. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(11):2971–2984. doi:10.1007/s00216-021-03231-9
- Gelée B, Michel P, Haas R, Boishardy F. Angio-oedème acquis induit par les IEC: traitement aux urgences par concentré de C1 inhibiteur [Angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema: emergency treatment with complement C1 inhibitor concentrate]. *Rev Med Interne*. 2008;29(6):516–519. doi:10.1016/j.revmed.2007.09.038
- Germenis AE, Rijavec M, Veronez CL. Leveraging genetics for hereditary angioedema: A road map to Precision Medicine. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;60(3):416–428. doi:10.1007/s12016-021-08836-7
- Gholamreza-Fahimi E, Bisha M, Hahn J, et al. Cyclooxygenase activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans. *Biomed Pharmacother*. 2020;123(109797):109797. doi:10.1016/j.biopha.2019.109797
- Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol*. 2007;179(2):247–254. doi:10.1083/jcb.200705175
- Golser R, Gorren AC, Leber A, et al. Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation [published correction appears in *J Biol Chem* 2000 May 26;275(21):16400]. *J Biol Chem*. 2000;275(8):5291–5296. doi:10.1074/jbc.275.8.5291
- Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS*. 2019;16(1):3. doi:10.1186/s12987-019-0123-z
- Grigoriadou S, Longhurst HJ. Clinical Immunology Review Series: An approach to the patient with angio-oedema. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(3):367–377. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03845.x

- Grossman E, Messerli FH, Neutel JM. Angiotensin II receptor blockers: equal or preferred substitutes for ACE inhibitors? *Arch Intern Med*. 2000;160(13):1905–1911. doi:10.1001/archinte.160.13.1905
- Gruchalla RS. Clinical assessment of drug-induced disease. *Lancet*. 2000;356(9240):1505–1511. doi:10.1016/S0140-6736(00)02885-3
- Güneş F, Batgi H, Akbal A, Canatan T. Angioedema – an unusual serious side effect of risperidone injection. *Clin Toxicol (Phila)*. 2013;51(2):122 Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press; 2011. doi:10.17226/12910 123. doi:10.3109/15563650.2013.765010
- Haddad EB, Fox AJ, Rousell J, et al. Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone. *Mol Pharmacol*. 2000;57(6):1123–1131.
- Hahn J, Greve J, Bas M, Kojda G. Bradykinin-mediated angioedema induced by commonly used cardiovascular drugs. *Drugs and Drug Candidates*. 2023;2(3):708–727. doi:10.3390/ddc2030036
- Hahn J, Nordmann-Kleiner M, Bönner C, Kojda G, Hoffmann TK, Greve J. The influence of ACE inhibition on C1-inhibitor: A biomarker for ACE inhibitor-induced angioedema? *Biomed Hub*. 2019;4(2):1–9. doi:10.1159/000499075
- Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 2002;109(8):1057–1063. doi:10.1172/JCI14211
- Hassen GW, Kalantari H, Parraga M. Fresh frozen plasma for progressive and refractory angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *J Emerg Med*. 2013;44(4):764–772. doi:10.1016/j.jemermed.2012.07.056
- Hatanaka K, Simons M, Murakami M. Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(1):H162-72. doi:10.1152/ajpheart.00650.2010

- Hecker M, Blaukat A, Bara AT, Müller-Esterl W, Busse R. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced venoconstriction. *Br J Pharmacol.* 1997;121(7):1475–1481. doi:10.1038/sj.bjp.0701281
- Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol.* 1994;481 (Pt 2):407–414. doi:10.1113/jphysiol.1994.sp020449
- Hellebrand MC, Kojda G, Hoffmann TK, Bas M. Angioödeme durch ACE-Hemmer und AT(1)-Rezeptorblocker [Angioedema due to ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists]. *Hautarzt.* 2006;57(9):808–810. doi:10.1007/s00105-005-1046-y
- Hill MD, Barber PA, Takahashi J, Demchuk AM, Feasby TE, Buchan AM. Anaphylactoid reactions and angioedema during alteplase treatment of acute ischemic stroke. *CMAJ.* 2000;162(9):1281–1284.
- Hirata A, Baluk P, Fujiwara T, McDonald DM. Location of focal silver staining at endothelial gaps in inflamed venules examined by scanning electron microscopy. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 1):L403-18. doi:10.1152/ajplung.1995.269.3.L403
- Hoefle, M. (1982). Substituted acyl derivatives of 1, 2, 3, 4 tetrahydroquinoline-3-carboxylic acids. US Pat, 944–949.
- Holt BA, Bellavia MC, Potter D, White D, Stowell SR, Sulchek T. Fc microparticles can modulate the physical extent and magnitude of complement activity. *Biomater Sci.* 2017;5(3):463–474. doi:10.1039/c6bm00608f
- Hoover T, Lippmann M, Grouzmann E, Marceau F, Herscu P. Angiotensin converting enzyme inhibitor induced angio-oedema: a review of the pathophysiology and risk factors. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(1):50–61. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03323.x
- Hubers SA, Kohm K, Wei S, et al. Endogenous bradykinin and B1-B5 during angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(5):1636–1639.e5. doi:10.1016/j.jaci.2018.06.037
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem.* 1991;266(23):15377–15383. doi:10.1016/s0021-9258(18)98626-6

- Hulström D, Svensjö E. Intravital and electron microscopic study of bradykinin-induced vascular permeability changes using FITC-dextran as a tracer. *J Pathol.* 1979;129(3):125–133. doi:10.1002/path.1711290304
- Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1992;267(29):20831–20834. doi:10.1016/s0021-9258(19)36762-6
- Hurford R, Rezvani S, Kreimeier M, et al. Incidence, predictors and clinical characteristics of orolingual angio-oedema complicating thrombolysis with tissue plasminogen activator for ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(5):520–523. doi:10.1136/jnnp-2014-308097
- International drug monitoring: The role of national centres. PsycEXTRA Dataset. Published online 1972. doi:10.1037/e458382004-001
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997;386(6624):502–506. doi:10.1038/386502a0
- Ishoo E, Shah UK, Grillone GA, Stram JR, Fuleihan NS. Predicting airway risk in angioedema: staging system based on presentation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;121(3):263–268. doi:10.1016/S0194-5998(99)70182-8
- Jaspard E, Costerousse O, Wei L, Corvol P, Alhenc-Gelas F. The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): molecular and regulatory aspects. *Agents Actions Suppl.* 1992;38 (Pt 1):349–358. doi:10.1007/978-3-0348-7321-5_44
- Ju H, Venema VJ, Marrero MB, Venema RC. Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 1998;273(37):24025–24029. doi:10.1074/jbc.273.37.24025
- Kainat A, Phang CR, Ain NU, Agarwal B. The first occurrence of angioedema after discontinuation of angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Cureus.* 2021;13(11):e19553. doi:10.7759/cureus.19553
- Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, et al. „Role reversal” for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1303–1312. doi:10.1038/ni1525

- Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A. Metalloprotease–disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J.* 2000;352(3):883–892. doi:10.1042/bj3520883
- Kaplan AP, Greaves MW. Angioedema. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(3):373–388. doi:10.1016/j.jaad.2004.09.032
- Kaplan AP, Joseph K. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. *Adv Immunol.* 2014;121:41– 89. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00002-7
- Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* 2010;47(13):2161–2169. doi:10.1016/j.molimm.2010.05.010
- Karim MY, Masood A. Fresh-frozen plasma as a treatment for life-threatening ACE-inhibitor angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(2):370–371. doi:10.1067/mai.2002.121313
- Khalid M, Kanaa M, Alkawaleet Y, Ayub MT. Angioedema: A life-threatening complication of tissue plasminogen activator. *Cureus.* 2018;10(3):e2392. doi:10.7759/cureus.2392
- Khan MA, Knox N, Prashar A, et al. Comparative genomics reveal that host-innate immune responses influence the clinical prevalence of *Legionella pneumophila* serogroups. *PLoS One.* 2013;8(6):e67298. doi:10.1371/journal.pone.0067298
- Khosravani F, Suvorava T, Dao VTV, et al. Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH. *Allergy.* 2015;70(3):285–294. doi:10.1111/all.12556
- Kimyai-Asadi A, Harris JC, Noursari HC. Critical overview. *J Clin Psychiatry.* 1999;60(10):714–725. doi:10.4088/jcp.v60n1010
- Klarenbach SW, Chipiuk A, Nelson RC, Hollenberg MD, Murray AG. Differential actions of PAR2 and PAR1 in stimulating human endothelial cell exocytosis and permeability: the role of Rho-GTPases. *Circ Res.* 2003;92(3):272–278. doi:10.1161/01.res.0000057386.15390.a3

- Knezevic N, Tauseef M, Thennes T, Mehta D. The G protein betagamma subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin. *J Exp Med.* 2009;206(12):2761–2777. doi:10.1084/jem.20090652
- Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation.* 2001;103(23):2839–2844. doi:10.1161/01.cir.103.23.2839
- Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, et al. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res.* 1999;42(1):206–213. doi:10.1016/s0008-6363(98)00315-0
- Kojda G, Patzner M, Hacker A, Noack E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol Pharmacol.* 1998;53(3):547–554. doi:10.1124/mol.53.3.547
- Kolte D, Bryant J, Holsworth D, et al. Biochemical characterization of a novel high-affinity and specific plasma kallikrein inhibitor. *Br J Pharmacol.* 2011;162(7):1639–1649. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01170.x
- Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol.* 2010;72(1):463–493. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135833
- Korniyenko A, Alviar CL, Cordova JP, Messerli FH. Visceral angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Cleve Clin J Med.* 2011;78(5):297–304. doi:10.3949/ccjm.78a.10102
- Kostis JB, Kim HJ, Rusnak J, et al. Incidence and characteristics of angioedema associated with enalapril. *Arch Intern Med.* 2005;165(14):1637–1642. doi:10.1001/archinte.165.14.1637
- Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens.* 2004;17(2):103–111. doi:10.1016/j.amjhyper.2003.09.014

- Kostis WJ, Shetty M, Chowdhury YS, Kostis JB. ACE inhibitor-induced angioedema: A review. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(7):55. doi:10.1007/s11906-018-0859-x
- Krikorian RK, Quick A, Tal A. Angioedema following the intravenous administration of metoprolol. *Chest.* 1994;106(6):1922–1923. doi:10.1378/chest.106.6.1922
- Krybus M, Sieradzki M, Fahimi E, et al. Contribution of cyclooxygenase-1-dependent prostacyclin synthesis to bradykinin-induced dermal extravasation. *Biomed Pharmacother.* 2022;148(112786):112786. doi:10.1016/j.biopha.2022.112786
- Kulthanan K, Jiamton S, Boochangkool K, Jongjarearnprasert K. Angioedema: clinical and etiological aspects. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:26438. doi:10.1155/2007/26438
- Kyrmizakis DE, Papadakis CE, Liolios AD, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(12):1416–1419. doi:10.1001/archotol.130.12.1416
- Lapostolle A, Weisenburger-Lile D, Yger M, Alamowitch S, Fain O. Bradykinin-mediated angioedema following tenecteplase administration in an acute ischemic stroke. *Stroke.* 2022;53(10):e446–e447. doi:10.1161/STROKEAHA.122.040052
- Lau J, Rousseau J, Kwon D, Bénard F, Lin KS. A systematic review of molecular imaging agents targeting bradykinin B1 and B2 receptors. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(8):199. doi:10.3390/ph13080199
- Le TTA, Smith W, Hissaria P. Real-world off-label use of icatibant for acute management of non-hereditary angioedema. *Intern Med J.* 2021;51(3):419–423. doi:10.1111/imj.15241
- Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):27–77. doi:10.1124/pr.57.1.2
- Lewis LM, Graffeo C, Crosley P, et al. Ecallantide for the acute treatment of angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema: a multicenter, randomized, controlled trial. *Ann Emerg Med.* 2015;65(2):204–213. doi:10.1016/j.annemergmed.2014.07.014

- Liesmaa I, Kokkonen JO, Kovanen PT, Lindstedt KA. Lovastatin induces the expression of bradykinin type 2 receptors in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(5):593–600. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.08.007
- Liesmaa I, Leskinen HK, Kokkonen JO, Ruskoaho H, Kovanen PT, Lindstedt KA. Hypoxia-induced expression of bradykinin type-2 receptors in endothelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2009;221(2):359–366. doi:10.1002/jcp.21861
- Lipski SM, Casimir G, Vanlommel M, Jeanmaire M, Dolhen P. Angiotensin-converting enzyme inhibitors-induced angioedema treated by C1 esterase inhibitor concentrate (Berinert®): about one case and review of the therapeutic arsenal. *Clin Case Rep.* 2015;3(2):126–130. doi:10.1002/ccr3.171
- Liu YH, Yang XP, Sharov VG, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest.* 1997;99(8):1926–1935. doi:10.1172/JCI119360
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lombardi C, Crivellaro M, Dama A, et al. Are physicians aware of the side effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors?: a questionnaire survey in different medical categories. *Chest.* 2005;128(2):976–979. doi:10.1378/chest.128.2.976
- Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet.* 2012;379(9814):474–481. doi:10.1016/S0140-6736(11)60935-5
- Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, et al. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation.* 2001;103(7):919–925. doi:10.1161/01.cir.103.7.919
- Machleidt T, Li WP, Liu P, Anderson RG. Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J Cell Biol.* 2000;148(1):17–28. doi:10.1083/jcb.148.1.17

- Madeddu P, Anania V, Parpaglia PP, et al. Effects of Hoe 140, a bradykinin B2-receptor antagonist, on renal function in conscious normotensive rats. *Br J Pharmacol.* 1992;106(2):380–386. doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb14344.x
- Madeddu P, Emanuelli C, Song Q, Varoni MV, Demontis MP, Anania V. Regulation of bradykinin B2-receptor expression by oestrogen. *Br J Pharmacol.* 1997;121(8):1763–1769. doi:10.1038/sj.bjp.0701311
- Madeddu P, Emanuelli C, Gaspa L, et al. Role of the bradykinin B2 receptor in the maturation of blood pressure phenotype: lesson from transgenic and knockout mice. *Immunopharmacology.* 1999;44(1–2):9–13. doi:10.1016/s0162-3109(99)00105-8
- Madeddu P, Parpaglia PP, Demontis MP, et al. Early blockade of bradykinin B2-receptors alters the adult cardiovascular phenotype in rats. *Hypertension.* 1995;25(3):453–459. doi:10.1161/01.hyp.25.3.453
- Madeddu P, Parpaglia PP, Demontis MP, Varoni MV, Fattaccio MC, Glorioso N. Chronic inhibition of bradykinin B2-receptors enhances the slow vasopressor response to angiotensin II. *Hypertension.* 1994;23(5):646–652. doi:10.1161/01.hyp.23.5.646
- Madeddu P, Parpaglia PP, Demontis MP, et al. Bradykinin B2-receptor blockade facilitates deoxycorticosterone-salt hypertension. *Hypertension.* 1993;21(6 Pt 2):980–984. doi:10.1161/01.hyp.21.6.980
- Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, et al. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation.* 1997;96(10):3570–3578. doi:10.1161/01.cir.96.10.3570
- Mahdi F, Shariat-Madar Z, Kuo A, et al. Mapping the interaction between high molecular mass kininogen and the urokinase plasminogen activator receptor. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16621–16628. doi:10.1074/jbc.M313850200
- Mahmoudpour SH, Asselbergs FW, Terreehorst I, Souverein PC, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Continuation of angiotensin converting enzyme inhibitor therapy, in spite of occurrence of angioedema. *Int J Cardiol.* 2015;201:644–645. doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.185

- Maizel JV Jr, Summers DF, Scharff MD. SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells. *J Cell Physiol.* 1970;76(3):273–287. doi:10.1002/jcp.1040760307
- Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;11(3):571–605. doi:10.1083/jcb.11.3.571
- Makani H, Messerli FH, Romero J, et al. Meta-analysis of randomized trials of angioedema as an adverse event of renin-angiotensin system inhibitors. *Am J Cardiol.* 2012;110(3):383–391. doi:10.1016/j.amjcard.2012.03.034
- Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, Alper SL. Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase [published correction appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Mar 5;256(1):255]. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(1):231–242. doi:10.1006/bbrc.1998.9921
- Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study [published correction appears in *Circulation* 1996 Sep 15;94(6):1490]. *Circulation.* 1996;94(3):258–265. doi:10.1161/01.cir.94.3.258
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):357–386.
- Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(10):845–852. doi:10.1038/nrd1522
- Marceau F, Bachelard H, Bouthillier J, et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. *Int Immunopharmacol.* Published online February 24, 2020. doi:10.1016/j.intimp.2020.106305 82, 106305. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106305>
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):357–386.

- Marceau F, Rivard GE, Hébert J, et al. Picomolar Sensitivity Analysis of Multiple Bradykinin-Related Peptides in the Blood Plasma of Patients With Hereditary Angioedema in Remission: A Pilot Study. *Front Allergy*. 2022;3:837463. Published 2022 Feb 11. doi:10.3389/falgy.2022.837463
- Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdös EG. Enhancement of bradykinin and re-sensitization of its B2 receptor. *Hypertension*. 1999;33(3):835–843. doi:10.1161/01.hyp.33.3.835
- Marcic BM, Erdös EG. Protein kinase C and phosphatase inhibitors block the ability of angiotensin I-converting enzyme inhibitors to resensitize the receptor to bradykinin without altering the primary effects of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(2):605–612.
- Margolius HS. Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1998;16(4):337–349. doi:10.1007/BF02737655
- Maurer M, Magerl M, Betschel S, et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema-The 2021 revision and update. *Allergy*. 2022;77(7):1961–1990. doi:10.1111/all.15214
- McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*. 1999;6(1):7–22.
- McDowell SE, Coleman JJ, Ferner RE. Systematic review and meta-analysis of ethnic differences in risks of adverse reactions to drugs used in cardiovascular medicine. *BMJ*. 2006;332(7551):1177–1181. doi:10.1136/bmj.38803.528113.55
- McGlinchey PG, McCluskey DR. Hereditary angioedema precipitated by estrogen replacement therapy in a menopausal woman. *Am J Med Sci*. 2000;320(3):212–213. doi:10.1097/00000441-200009000-00014
- McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993–1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077
- McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993–1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077

- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86(1):279–367. doi:10.1152/physrev.00012.2005
- Meotti FC, Campos R, da Silva K, Paszcuk AF, Costa R, Calixto JB. Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B₁ and B₂ receptors and intracellular kinase pathways. *Br J Pharmacol.* 2012;166(3):1127–1139. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01830.x
- Messerli FH, Nussberger J. Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. *Lancet.* 2000;356(9230):608–609. doi:10.1016/S0140-6736(00)02596-4
- Michel CC, Neal CR. Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability. *Microcirculation.* 1999;6(1):45–54.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science.* 1994;264(5158):582–586. doi:10.1126/science.8160017
- Miles AA, Miles EM. Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea pigs. *J Physiol.* 1952;118(2):228–257. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004789
- Minshall RD, Tan F, Nakamura F, et al. Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells [published correction appears in *Circ Res* 1998 Jan 9;82(1):137]. *Circ Res.* 1997;81(5):848–856. doi:10.1161/01.res.81.5.848
- Mirza H, Yatsula V, Bahou WF. The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996;97(7):1705–1714. doi:10.1172/JCI118597
- Mishra B, Saddichha S, Kumar R, Akhtar S. Risperidone-induced recurrent giant urticaria. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(4):558-559. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02909.x
- Mithani H, Hurwitz TA. Paroxetine-induced angioedema and tongue swelling. *J Clin Psychiatry.* 1996;57(10):486.

- Moellman JJ, Bernstein JA, Lindsell C, et al. A consensus parameter for the evaluation and management of angioedema in the emergency department. *Acad Emerg Med*. 2014;21(4):469–484. doi:10.1111/acem.12341
- Mohorn PL, Roebuck LD, Raybon-Rojas E, Duncan C. C1 esterase inhibitor for angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema at a community teaching health system: A brief retrospective propensity-matched cohort study. *Am J Emerg Med*. 2021;49:6–9. doi:10.1016/j.ajem.2021.05.036
- Mulinari R, Benetos A, Gavras I, Gavras H. Vascular and sympathoadrenal responses to bradykinin and a bradykinin analogue. *Hypertension*. 1988;11(6 Pt 2):754–757. doi:10.1161/01.hyp.11.6.754
- Müller-Strahl G, Kottenberg K, Zimmer HG, Noack E, Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J Physiol*. 2000;522 Pt 2(Pt 2):311–320. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00311.x
- Muraro A, Worm M, Alviani C, et al. EAACI guidelines: Anaphylaxis (2021 update). *Allergy*. 2022;77(2):357–377. doi:10.1111/all.15032
- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 1997;388(6643):678–682. doi:10.1038/41780
- Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109–119. doi:10.1007/s10456-008-9099-z
- Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):103–111. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.2
- Nielsen EW, Gramstad S. Angioedema from angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor treated with complement 1 (C1) inhibitor concentrate. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(1):120–122. doi:10.1111/j.1399-6576.2005.00819.x
- Nielsen EW, Johansen HT, Høgåsen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema. *Scand J Immunol*. 1996;44(2):185–192. doi:10.1046/j.1365-3083.1996.d01-298.x

- Nisly SA, Kara A, Knight TB. Simvastatin: a risk factor for angioedema?. *Journal of Pharmacy Technology*. 2013 May;29(3):149–52.
- Nottebaum AF, Cagna G, Winderlich M, et al. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med*. 2008;205(12):2929–2945. doi:10.1084/jem.20080406
- Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*. 1998;351(9117):1693–1697. doi:10.1016/S0140-6736(97)09137-X
- Nussberger J, Cugno M, Cicardi M. Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med*. 2002;347(8):621–622. doi:10.1056/NEJM200208223470820
- Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(6):1321–1322. doi:10.1016/s0091-6749(99)70030-8
- Oike Y, Ogata Y, Higashi D, Matsumura T, Numata Y. Fatal angioedema associated with enalapril. *Intern Med*. 1993;32(4):308–310. doi:10.2169/internalmedicine.32.308
- Omori K, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T. Multiple roles of the PGE₂ -EP receptor signal in vascular permeability. *Br J Pharmacol*. 2014;171(21):4879–4889. doi:10.1111/bph.12815
- Oschatz C, Maas C, Lecher B, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity*. 2011;34(2):258–268. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.008
- Palmquist S, Mathews B. Isolated intestinal type angioedema due to ACE-inhibitor therapy. *Clin Case Rep*. 2017;5(5):707–710. Published 2017 Mar 31. doi:10.1002/ccr3.925
- Pancioli A, Brott T, Donaldson V, Miller R. Asymmetric angioneurotic edema associated with thrombolysis for acute stroke. *Ann Emerg Med*. 1997;30(2):227–229. doi:10.1016/s0196-0644(97)70147-1
- Parker JC, Stevens T, Randall J, Weber DS, King JA. Hydraulic conductance of pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cell monolayers. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;291(1):L30–L37. doi:10.1152/ajplung.00317.2005
- Passos GF, Fernandes ES, Campos MM, et al. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. J Immunol. 2004;172(3):1839–1847. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1839
- Pellacani A, Brunner HR, Nussberger J. Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects. Clin Sci (Lond). 1994;87(5):567–574. doi:10.1042/cs0870567
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(14):8140–8145. doi:10.1073/pnas.120035997
- Pfaue A, Schuler PJ, Mayer B, Hoffmann TK, Greve J, Hahn J. Clinical features of angioedema induced by renin-angiotensin-aldosterone system inhibition: a retrospective analysis of 84 patients. J Community Hosp Intern Med Perspect. 2019;9(6):453–459. Published 2019 Dec 14. doi:10.1080/20009666.2019.1698259
- Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both [published correction appears in N Engl J Med. 2004 Jan 8;350(2):203]. N Engl J Med. 2003;349(20):1893–1906. doi:10.1056/NEJMoa032292
- Pichler WJ, Lehner R, Späth PJ. Recurrent angioedema associated with hypogonadism or anti-androgen therapy. Ann Allergy. 1989;63(4):301–305.
- Pirahanchi Y, Sharma S. Physiology, Bradykinin. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 11, 2023.
- Pichler WJ, Lehner R, Späth PJ. Recurrent angioedema associated with hypogonadism or anti-androgen therapy. Ann Allergy. 1989;63(4):301–305.
- Potter SM. Vital imaging: two photons are better than one. Curr Biol. 1996;6(12):1595–1598. doi:10.1016/s0960-9822(02)70782-3

- Predescu SA, Predescu DN, Palade GE. Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell*. 2001;12(4):1019–1033. doi:10.1091/mbc.12.4.1019
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 1999;402(6764):884–888. doi:10.1038/47260
- Psarros F, Koutsostathis N, Farmaki E, Speletas MG, Germenis AE. Hereditary angioedema in Greece: the first results of the greek hereditary angioedema registry. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(4):326–332. doi:10.1159/000366276
- Qadri F, Bader M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(1):31–44. doi:10.1080/14728222.2018.1409724
- Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. 2013;(73):e50062. Published 2013 Mar 16. doi:10.3791/50062
- Raj R, Sidhu BS. Angioneurotic oedema with tadalafil: A rare case report. *Indian J Psychiatry*. 2006;48(4):263–264. doi:10.4103/0019-5545.31562
- Ramchandran R, Mehta D, Vogel SM, Mirza MK, Kouklis P, Malik AB. Critical role of Cdc42 in mediating endothelial barrier protection in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(2):L363–L369. doi:10.1152/ajplung.90241.2008
- Randall MD, Alexander SP, Bennett T, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229(1):114–120. doi:10.1006/bbrc.1996.1766
- Rasmussen ER, Bygum A. ACE-inhibitor induced angio-oedema treated with complement C1-inhibitor concentrate. *BMJ Case Rep*. 2013;2013:bcr2013200652. Published 2013 Oct 4. doi:10.1136/bcr-2013-200652
- Rasmussen ER, Mey K, Bygum A. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema--a dangerous new epidemic. *Acta Derm Venereol*. 2014;94(3):260–264. doi:10.2340/00015555-1760
- Rasmussen ER, Pottegård A, Bygum A, von Buchwald C, Homøe P, Hallas J. Angiotensin II receptor blockers are safe in patients with prior angioedema related to angiotensin-converting enzyme inhibitors - a nationwide registry-based cohort study. *J Intern Med*. 2019;285(5):553–561. doi:10.1111/joim.12867

- Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980;32(1):1–46.
- Regoli D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol.* 1977;55(4):855-867. doi:10.1139/y77-115
- Regoli DC, Marceau F, Lavigne J. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol.* 1981;71(1):105–115. doi:10.1016/0014-2999(81)90391-5
- Rex DAB, Deepak K, Vaid N, et al. A modular map of Bradykinin-mediated inflammatory signaling network. *J Cell Commun Signal.* 2022;16(2):301–310. doi:10.1007/s12079-021-00652-0
- Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic D, et al. Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Qic8]bradykinin). *Eur J Pharmacol.* 1992;210(2):115-120. doi:10.1016/0014-2999(92)90661-m
- Riha HM, Summers BB, Rivera JV, Van Berkel MA. Novel Therapies for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Induced Angioedema: A Systematic Review of Current Evidence. *J Emerg Med.* 2017;53(5):662–679. doi:10.1016/j.jemermed.2017.05.037
- Rivera JO. Losartan-induced angioedema. *Ann Pharmacother.* 1999;33(9):933–935. doi:10.1345/aph.18350
- Rubinstein E, Stolz LE, Sheffer AL, Stevens C, Bousvaros A. Abdominal attacks and treatment in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:71. Published 2014 Apr 9. doi:10.1186/1471-230X-14-71
- Rudolf J, Grond M, Schmülling S, Neveling M, Heiss W. Orolingual angioneurotic edema following therapy of acute ischemic stroke with alteplase. *Neurology.* 2000;55(4):599–600. doi:10.1212/wnl.55.4.599
- Ruocco NA, Bergelson BA, Yu TK, Gavras I, Gavras H. Augmentation of coronary blood flow by ACE inhibition: role of angiotensin and bradykinin. *Clin Exp Hypertens.* 1995;17(7):1059–1072. doi:10.3109/10641969509033651
- Rupprecht R, Vente C, Gräfe A, Fuchs T. Angioedema due to losartan. *Allergy.* 1999;54(1):81–82. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00035.x

- Sabaté-Brescó M, Rodríguez-Garijo N, Azofra J, et al. A Comparative Study of Sex Distribution, Autoimmunity, Blood, and Inflammatory Parameters in Chronic Spontaneous Urticaria with Angioedema and Chronic Histaminergic Angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(6):2284–2292. doi:10.1016/j.jaip.2021.03.038
- Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, Marceau F. Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol.* 2002;61(3):546–553. doi:10.1124/mol.61.3.546
- Sachs B, Meier T, Nöthen MM, Stieber C, Stingl J. Arzneimittelassoziierte Angioödeme : Bradykinin im Fokus [Drug-induced angioedema: Focus on bradykinin]. *Hautarzt.* 2018;69(4):298–305. doi:10.1007/s00105-017-4119-9
- Saisho Y, Itoh H. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and angioedema: a class effect?. *Diabetic Medicine.* 2013 Apr;30(4):e149–50.
- Salama RAM, El Gayar NH, Georgy SS, Hamza M. Equivalent intraperitoneal doses of ibuprofen supplemented in drinking water or in diet: a behavioral and biochemical assay using antinociceptive and thromboxane inhibitory dose-response curves in mice. *PeerJ.* 2016;4:e2239. Published 2016 Jul 19. doi:10.7717/peerj.2239
- Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988;11(2 Pt 2):I153–I157. doi:10.1161/01.hyp.11.2_pt_2.i153
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8258-8263. doi:10.1073/pnas.1432869100
- Saravi B, Li Z, Lang CN, et al. The Tissue Renin-Angiotensin System and Its Role in the Pathogenesis of Major Human Diseases: Quo Vadis?. *Cells.* 2021;10(3):650. Published 2021 Mar 15. doi:10.3390/cells10030650
- Sato M, Engelman RM, Otani H, et al. Myocardial protection by preconditioning of heart with losartan, an angiotensin II type 1-receptor blocker: implication of bradykinin-dependent and bradykinin-independent mechanisms. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III346–III351. doi:10.1161/01.cir.102.suppl_3.iii-346

- Sauvé L, Gras-Champel V, Decocq G, Masson H, Andréjak M. Angioedèmes associés à la prise de dihydropyridines [Angioedema associated with the use of dihydropyridines]. *Thérapie*. 1999;54(1):64–65.
- Savard M, Labonté J, Dubuc C, Neugebauer W, D'Orléans-Juste P, Gobeil F Jr. Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biol Chem*. 2013;394(3):353–360. doi:10.1515/hsz-2012-0295
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 4):771–780. doi:10.1242/jcs.01653
- Schartl M, Bocksch WG, Dreyse S, Beckmann S, Franke O, Hüntten U. Remodeling of myocardium and arteries by chronic angiotensin converting enzyme inhibition in hypertensive patients. *J Hypertens Suppl*. 1994;12(4):S37–S42.
- Scherrer D, Schmidlin F, Haddad EB, Kassel O, Landry Y, Gies JP. Glucocorticoids increase bradykinin B2 receptor gene transcription in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1999;359(3):153–159. doi:10.1007/pl00005337
- Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(11):4095–4098. doi:10.1073/pnas.85.11.4095
- Schmaier AH. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;109(8):1007–1009. doi:10.1172/JCI15490
- Schmaier AH. The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. *Thromb Haemost*. 2004;91(1):1–3.
- Schmidlin F, Scherrer D, Daeffler L, Bertrand C, Landry Y, Gies JP. Interleukin-1 β induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1998;53(6):1009–1015.
- Schmidt K, Andrew P, Schrammel A, et al. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells [published

- correction appears in Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002 Feb;282(2):following Table of Content]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281(5):H2053-H2061. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.5.H2053
- Schmidt TD, McGrath KM. Angiotensin-converting enzyme inhibitor angioedema of the intestine: a case report and review of the literature. Am J Med Sci. 2002;324(2):106–108. doi:10.1097/00000441-200208000-00011
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. Lancet. 2007;369(9568):1208–1219. doi:10.1016/S0140-6736(07)60242-6
- Schnyder B, Brockow K. Pathogenesis of drug allergy--current concepts and recent insights. Clin Exp Allergy. 2015;45(9):1376–1383. doi:10.1111/cea.12591
- Schoenfeld AK, Lahrsen E, Alban S. Regulation of Complement and Contact System Activation via C1 Inhibitor Potentiation and Factor XIIa Activity Modulation by Sulfated Glycans – Structure-Activity Relationships. PLoS One. 2016;11(10):e0165493. Published 2016 Oct 26. doi:10.1371/journal.pone.0165493
- Schuster C, Reinhart WH, Hartmann K, Kuhn M. Angioödem unter ACE-Hemmern und Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten: Analyse von 98 Fällen [Angioedema induced by ACE inhibitors and angiotensin II-receptor antagonists: analysis of 98 cases]. Schweiz Med Wochenschr. 1999;129(9):362–369.
- Settipane GA. Adverse reactions of aspirin and related drugs. Arch Intern Med. 1981;141(3 Spec No):328–332. doi:10.1001/archinte.141.3.328
- Shariat-Madar Z, Mahdi F, Warnock M, et al. Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. Blood. 2006;108(1):192–199. doi:10.1182/blood-2006-01-0094
- Shesely EG, Maeda N, Kim HS, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(23):13176–13181. doi:10.1073/pnas.93.23.13176
- Shi S, Koya D, Kanasaki K. Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes. Fibrogenesis Tissue Repair. 2016;9:1. Published 2016 Feb 13. doi:10.1186/s13069-016-0038-0

- Shiber JR. Angioedema of the arytenoids. *N. Engl. J. Med.* 2006;353, 15.
- Shimuta SI, Barbosa AM, Borges AC, Paiva TB. Pharmacological characterization of RMP-7, a novel bradykinin agonist in smooth muscle. *Immunopharmacology.* 1999;45(1-3):63–67. doi:10.1016/s0162-3109(99)00150-2
- Sigler C, Annis K, Cooper K, Haber H, Van deCarr S. Examination of baseline levels of carboxypeptidase N and complement components as potential predictors of angioedema associated with the use of an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Arch Dermatol.* 1997;133(8):972-975.
- Sigmon DH, Beierwaltes WH. Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension.* 1993;22(2):237–242. doi:10.1161/01.hyp.22.2.237
- Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension.* 1998;31(2):649–656. doi:10.1161/01.hyp.31.2.649
- Sinert R, Levy P, Bernstein JA, et al. Randomized Trial of Icatibant for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Induced Upper Airway Angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(5):1402–1409.e3. doi:10.1016/j.jaip.2017.03.003
- Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS. Bradykinin B2 receptor modulates renal prostaglandin E2 and nitric oxide. *Hypertension.* 1997;29(3):757–762. doi:10.1161/01.hyp.29.3.757
- Sjöstrand M, Wei C, Cook W, et al. Assessment of Saxagliptin Efficacy: Meta-Analysis of 14 Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Diabetes Ther.* 2017;8(3):587–599. doi:10.1007/s13300-017-0261-8
- Skalli S, Wion-Barbot N, Baudrant M, Lablanche S, Benhamou PY, Halimi S. Angio-oedema induced by dual dipeptidyl peptidase inhibitor and angiotensin II receptor blocker: a first case report. *Diabet Med.* 2010;27(4):486–487. doi:10.1111/j.1464-5491.2010.02973.x
- Soubrier F, Hubert C, Testut P, Nadaud S, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens.* 1993;11(5):471–476. doi:10.1097/00004872-199305000-00001

- Souza DG, Lomez ES, Pinho V, et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol.* 2004;172(4):2542–2548. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2542
- Stadnicki A, Mazurek U, Gonciarz M, et al. Immunolocalization and expression of kallistatin and tissue kallikrein in human inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2003;48(3):615–623. doi:10.1023/a:1022569623350
- Stanke-Labesque F, Mallaret M, Lefebvre B, Hardy G, Caron F, Bessard G. 2-Arachidonoyl glycerol induces contraction of isolated rat aorta: role of cyclooxygenase-derived products. *Cardiovasc Res.* 2004;63(1):155–160. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.024
- Steinbach O, Schweder R, Freitag B. C1-Esterase-Inhibitor bei ACE-Hemmer-induziertem schwerem Angioödem der Zunge [C1-esterase inhibitor in ACE inhibitor-induced severe angioedema of the tongue]. *Anaesthesiol Reanim.* 2001;26(5):133–137.
- Steinbicker AU, Liu H, Jiramongkolchai K, et al. Nitric oxide regulates pulmonary vascular smooth muscle cell expression of the inducible cAMP early repressor gene. *Nitric Oxide.* 2011;25(3):294–302. doi:10.1016/j.niox.2011.05.006
- Stevens T, Phan S, Frid MG, Alvarez D, Herzog E, Stenmark KR. Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(7):783–791. doi:10.1513/pats.200803-027HR
- Stewart JM. Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides.* 2004;25(3):527–532. doi:10.1016/j.peptides.2003.10.016
- Stoldt J, Cox C, Matusz E. Tranexamic acid use in the setting of ACE inhibitor induced angioedema. *Am J Emerg Med.* 2022;55:. doi:10.1016/j.ajem.2022.01.041
- Straka BT, Ramirez CE, Byrd JB, et al. Effect of bradykinin receptor antagonism on ACE inhibitor-associated angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(1):242–248.e2. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.051
- Strassen U, Bas M, Wirth M, et al. Efficacy of human C1 esterase inhibitor concentrate for treatment of ACE-inhibitor induced angioedema. *Am J Emerg Med.* 2023;64:121–128. doi:10.1016/j.ajem.2022.12.001

- Sulpizio AC, Pullen MA, Edwards RM, Brooks DP. The effect of acute angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition on plasma extravasation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309(3):1141–1147. doi:10.1124/jpet.103.064105
- Sun X, Ma SF, Wade MS, et al. Functional promoter variants in sphingosine 1-phosphate receptor 3 associate with susceptibility to sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(7):L467–L477. doi:10.1152/ajplung.00010.2013
- Sun Z, Li X, Massena S, et al. VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd. *J Exp Med*. 2012;209(7):1363–1377. doi:10.1084/jem.20111343
- Suvorava T, Pick S, Kojda G. Selective impairment of blood pressure reduction by endothelial nitric oxide synthase dimer destabilization in mice. *J Hypertens*. 2017;35(1):76–88. doi:10.1097/HJH.0000000000001127
- Takada M, Hattori S. Presence of fenestrated capillaries in the skin. *Anat Rec*. 1972;173(2):213–219. doi:10.1002/ar.1091730210
- Talaei A, Faraji Rad S, Borhani Moghani M, Talaei A. Acquired Angioedema Induced by Risperidone. *Iran J Psychiatry Behav Sci*. 2018;12(3):e4807. <https://doi.org/10.17795/ijpbs-4807>.
- Tauseef M, Knezevic N, Chava KR, et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J Exp Med*. 2012;209(11):1953–1968. doi:10.1084/jem.20111355
- Tauseef M, Kini V, Knezevic N, et al. Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2008;103(10):1164–1172. doi:10.1161/01.RES.0000338501.84810.51
- Terreehorst I, Reitsma S, Cohn DM. Current treatment of angioedema induced by ACE inhibitors. *Current Treatment Options in Allergy*. 2019 Mar 15;6:18–26.
- Theer P, Hasan MT, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett*. 2003;28(12):1022–1024. doi:10.1364/ol.28.001022

- Thennes T, Mehta D. Heterotrimeric G proteins, focal adhesion kinase, and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* 2012;83(1):31–44. doi:10.1016/j.mvr.2011.05.004
- Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell.* 2010;39(3):468–476. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.013
- Stotter BR, Ferguson MA. Should ACE inhibitors and ARBs be used in combination in children?. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(9):1521–1532. doi:10.1007/s00467-018-4046-8
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33238–33243. doi:10.1074/jbc.M002615200
- Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 2002;39(4-5):173–185. doi:10.1016/s1537-1891(03)00007-7
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350–4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- Ulmer JL, Garvey MJ. Fatal angioedema associated with lisinopril. *Ann Pharmacother.* 1992;26(10):1245–1246. doi:10.1177/106002809202601012
- Umar MU, Abdullahi AT. Self-limiting Atypical Antipsychotics-induced Edema: Clinical Cases and Systematic Review. *Indian J Psychol Med.* 2016;38(3):182–188. doi:10.4103/0253-7176.183089
- Vallance P, Patton S, Bhagat K, et al. Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet.* 1995;346(8968):153–154. doi:10.1016/s0140-6736(95)91211-8
- van Rijnsoever EW, Kwee-Zuiderwijk WJ, Feenstra J. Angioneurotic edema attributed to the use of losartan. *Arch Intern Med.* 1998;158(18):2063–2065. doi:10.1001/archinte.158.18.2063

- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:134–145. doi:10.1196/annals.1420.016
- Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989;13(6 Pt 2):658–667. doi:10.1161/01.hyp.13.6.658
- Vasekar M, Craig TJ. ACE inhibitor-induced angioedema. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012;12(1):72–78. doi:10.1007/s11882-011-0238-z
- Veronez CL, Mendes AR, Leite CS, et al. The Panorama of Primary Angioedema in the Brazilian Population. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(6):2293–2304.e5. doi:10.1016/j.jaip.2020.11.039
- Vestweber D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol.* 2000;190(3):281–291. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<281::AID-PATH527>3.0.CO;2-Z
- Vleeming W, van Amsterdam JG, Stricker BH, de Wildt DJ. ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management. *Drug Saf.* 1998;18(3):171–188. doi:10.2165/00002018-199818030-00003
- Vogel SM, Gao X, Mehta D, et al. Abrogation of thrombin-induced increase in pulmonary microvascular permeability in PAR-1 knockout mice. *Physiol Genomics.* 2000;4(2):137–145. Published 2000 Dec 18. doi:10.1152/physiol-genomics.2000.4.2.137
- Vogel SM, Malik AB. Cytoskeletal dynamics and lung fluid balance. *Compr Physiol.* 2012;2(1):449–478. doi:10.1002/cphy.c100006
- Walls RM, Pollack CV Jr. Successful cricothyrotomy after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a report of two cases. *Ann Emerg Med.* 2000;35(2):188–191. doi:10.1016/s0196-0644(00)70139-9
- Wang DZ, Chao L, Chao J. Hypotension in transgenic mice overexpressing human bradykinin B2 receptor. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2):488–493. doi:10.1161/01.hyp.29.1.488
- Warin RP, Cunliffe WJ, Greaves MW, Wallington TB. Recurrent angioedema: familial and oestrogen-induced. *Br J Dermatol.* 1986;115(6):731–734. doi:10.1111/j.1365-2133.1986.tb06656.x

- Warner KK, Visconti JA, Tschampel MM. Angiotensin II receptor blockers in patients with ACE inhibitor-induced angioedema. *Ann Pharmacother*. 2000;34(4):526–528. doi:10.1345/aph.19294
- Warrier MR, Copilevitz CA, Dykewicz MS, Slavin RG. Fresh frozen plasma in the treatment of resistant angiotensin-converting enzyme inhibitor angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;92(5):573–575. doi:10.1016/S1081-1206(10)61766-8
- Waschke J, Baumgartner W, Adamson RH, et al. Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H394–H401. doi:10.1152/ajpheart.00221.2003
- Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1296–H1305. doi:10.1152/ajpheart.00687.2004
- Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Curry FE. Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(2):H704–H711. doi:10.1152/ajpheart.01076.2003
- Weber MA, Messerli FH. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angioedema: estimating the risk. *Hypertension*. 2008;51(6):1465–1467. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.111393
- Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol*. 1964;23(1):101–12. doi:10.1083/jcb.23.1.101
- Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005;437(7058):497–504. doi:10.1038/nature03987
- Berman DM, Kozasa T, Gilman AG. The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Nov 1;271(44):27209–12.
- White WB, Bresalier R, Kaplan AP, et al. Safety and tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren in combination with angiotensin receptor blockers and thiazide diuretics: a pooled analysis of clinical experience of 12,942 patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(7):506–516. doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00438.x

- Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163(1):284–291. doi:10.1016/0006-291x(89)92133-5
- Wiemer G, Schölkens BA, Wagner A, Heitsch H, Linz W. The possible role of angiotensin II subtype AT2 receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *J Hypertens Suppl.* 1993;11(5):S234–S235.
- Williams TJ, Morley J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature.* 1973;246(5430):215–217. doi:10.1038/246215a0
- Williams TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature.* 1977;270(5637):530–532. doi:10.1038/270530a0
- Wu YH, Tsai KC, Ho MP. Tranexamic acid use for ACE inhibitor induced angioedema. *Am J Emerg Med.* 2022;59:189. doi:10.1016/j.ajem.2022.05.009
- Yan Y, Shirakabe K, Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol.* 2002;158(2):221–226. doi:10.1083/jcb.200112026
- Yang XP, Liu YH, Mehta D, et al. Diminished cardioprotective response to inhibition of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in B(2) kinin receptor gene knockout mice. *Circ Res.* 2001;88(10):1072–1079. doi:10.1161/hh1001.090759
- Yang YH, Morand E, Leech M. Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(10):595–603. doi:10.1038/nrrheum.2013.126
- Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium [published correction appears in *Mol Cell Biol.* 2009 Jun;29(12):3451]. *Mol Cell Biol.* 2009;29(8):2011–2022. doi:10.1128/MCB.01472-08
- Telmisartan Randomised Assessment Study in ACE iNtolerant subjects with cardiovascular Disease (TRANSCEND) Investigators, Yusuf S, Teo K, et al. Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial [published correction appears in *Lancet.* 2008 Oct 18;372(9647):1384]. *Lancet.* 2008;372(9644):1174–1183. doi:10.1016/S0140-6736(08)61242-8

- Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf S, Sleight P, et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients [published correction appears in 2000 May 4;342(18):1376] [published correction appears in N Engl J Med 2000 Mar 9;342(10):748]. N Engl J Med. 2000;342(3):145–153. doi:10.1056/NEJM200001203420301
- ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. N Engl J Med. 2008;358(15):1547–1559. doi:10.1056/NEJMoa0801317
- Zhou Y, Dirksen WP, Babu GJ, Periasamy M. Differential vasoconstrictions induced by angiotensin II: role of AT1 and AT2 receptors in isolated C57BL/6J mouse blood vessels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(6):H2797–H2803. doi:10.1152/ajpheart.00466.2003
- Zhou Y, Dirksen WP, Zweier JL, Periasamy M. Endothelin-1-induced responses in isolated mouse vessels: the expression and function of receptor types. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287(2):H573-H578. doi:10.1152/ajpheart.01170.2003
- Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, et al. Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. J Clin Invest. Published online July 1, 2013. doi:10.1172/JCI66549
- Zuberbier T, Abdul Latiff AH, Abuzakouk M, et al. The international EAACI/GA²LEN/EuroGuiDerm/APAAACI guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria. Allergy. 2022;77(3):734–766. doi:10.1111/all.15090
- Zuraw BL. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: Four types and counting. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(3):884-885. doi:10.1016/j.jaci.2018.01.015

Publikationen

Originalarbeiten (peer-review)

1. Gholamreza-Fahimi, E., **Bisha, M.**, Hahn, J., Straßen, U., Krybus, M., Khosravani, F., Hoffmann, T. K., Hohlfeld, T., Greve, J., Bas, M., Twarock, S., & Kojda, G. (2020). Cyclooxygenase activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 123, 109797. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109797>

Beitrag: Miles Assay-Experimente, Mitarbeit bei der Planung der ABRASE Studie, Vorbereitung und Verteilung der Injektionslösungen an die anderen Studienzentren, Rekrutierung von Freiwilligen, Durchführung und Dokumentation der klinischen Experimente in Zusammenarbeit mit dem Studienarzt in Düsseldorf, Sammlung und Zusammenstellung aller Daten, Verfassen des Manuskripts.

2. **Bisha, M.**, Dao, V. T., Gholamreza-Fahimi, E., Vogt, M., van Zandvoort, M., Weber, S., Bas, M., Khosravani, F., Kojda, G., & Suvorava, T. (2018). The role of bradykinin receptor type 2 in spontaneous extravasation in mice skin: Implications for non-allergic angio-oedema. *British Journal of Pharmacology*, 175, 1607-1620. <https://doi.org/10.1111/bph.14166>

Beitrag: Genotypisierungs- und Real-Time- PCR, Antikörpervalidierung als auch Western-Blot-Analyse, Organbad-Experimente, Miles Assay-Experimente, Two-photon-laser Experimente, Sammlung und Zusammenstellung als auch Analyse und Interpretation der Daten sowie Verfassen des Manuskripts.

Die Argumentation der ersten beiden Publikationen spiegeln die Diskussion meiner Dissertation wider.

3. Dao, V. T., Medini, S., **Bisha, M.**, Balz, V., Suvorava, T., Bas, M., & Kojda, G. (2016). Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin ii type 2 receptors. *Biochemical Pharmacology*, 112, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.011>

Beitrag: Zellkultur, Real-time PCR, Antikörpervalidierung als auch Western-Blot-Analyse, ACE-Aktivitätsmessung

4. Lange-Asschenfeldt, C., Schable, S., Suvorava, T., Fahimi, E. G., **Bisha, M.**, Stermann, T., Henning, U., & Kojda, G. (2016). Effects of varenicline on alpha4-containing nicotinic acetylcholine receptor expression and cognitive performance in mice. *Neuropharmacology*, 107, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.025>

Beitrag: Antikörpervalidierung und Western-Blot-Analyse

Kongressbeiträge

Gholamreza-Fahimi E., Krybus M., **Bisha M.**, Kurz T., Hansen F.K. and Kojda G. AT₂ activation reduces ACE activity. Poster presentation delivered at the 86th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology – DGPT, 2.–5. March 2020, Leipzig, Germany. Published: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2020) 393 (Suppl 1): Page 64 Poster 150.

Krybus M., Gholamreza-Fahimi E., Khosravani F., **Bisha M.**, Kojda G. Relative importance of NO and prostaglandins as mediators of bradykinin-induced skin edema in mice. Poster presentation delivered at the 86th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology – DGPT, 2. –5. March 2020, Leipzig, Germany. Published: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2020) 393 (Suppl 1): Page 65 Poster 151.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.**, Hahn J., Straßen U., Krybus M., Khosravani F., Hoffmann T., Hohlfeld T., Greve J., Bas M., Twarock S. and Kojda G. A bradykinin in skin edema trial (ABRASE) – implications for non-allergic angioedema. Poster presentation delivered at the Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, 1.–4. September 2019, Heidelberg, Germany.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.**, Krybus M., Kurz T., Hansen F.K. and Kojda G. Activation of AT₂ potentiates bradykinin-induced extravasation – role of ACE. Poster presentation delivered at the Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, 1.–4. September 2019, Heidelberg, Germany.

Krybus M., Gholamreza-Fahimi E., Khosravani F., **Bisha M.** and Kojda G. Role of prostaglandins in bradykinin-induced skin edema in mice. Poster presentation delivered at the Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, 1.–4. September 2019, Heidelberg, Germany.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.** and Kojda G. Involvement of Prostaglandins in Bradykinin induced skin edema in mice. Poster presentation at: Bradykinin symposium, 5.– 6. September 2018, Berlin, Germany.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.**, Twarock S., Hohlfeld T. and Kojda G. A Bradykinin in Skin Edema Trial (ABRASE) – first results. Oral Presentation at the Bradykinin symposium, 5.–6. September 2018, Berlin, Germany.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.**, Kurz T., Hansen F.K. and Kojda G. Angiotensin-converting enzyme activity is attenuated by selective stimulation of angiotensin II type two receptor. Poster presentation delivered at the Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, 26.–29. September 2017 – DPhG, Saarbrücken, Germany.

Bisha M., Gholamreza-Fahimi E., Dao V.T. and Kojda G. Bradykinin receptor type two mediated dermal extravasation in mice is potentiated by moexipril. Poster presentation delivered at the European Society of Cardiology Congress – ESC, 26.–30. August 2017, Barcelona, Spain. Published: European Heart Journal, Volume 38, Issue suppl_1, August 2017, ehx504.P4487.

Bisha M., Gholamreza-Fahimi E., Dao V.T. and Kojda G. Bradykinin induced skin edema in mice is dependent on cyclooxygenase activity. Poster presentation delivered at the European Society of Cardiology Congress – ESC, 26.–30. August 2017, Barcelona, Spain. Published: European Heart Journal, Volume 38, Issue suppl_1, August 2017, ehx504.P4488.

Gholamreza-Fahimi E., **Bisha M.**, Hansen F.K., Kurz T. and Kojda G. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by selective stimulation of angiotensin II type 2 receptor. Poster presentation delivered at the 83rd German Pharm-Tox Summit, 6.–9. March 2017. Published: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2017) 390 (Suppl 1): Page 38 Poster 64.

Bisha M., Gholamreza-Fahimi E., Khosravani F. and Kojda G. Role of prostaglandins for bradykinin induced skin edema in mice. Poster presentation delivered at the 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology – DGPT, 6.–9. March 2017, Heidelberg, Germany. Published: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2017) 390 (Suppl 1): Page 38 Poster 65.

Bisha M., Gholamreza-Fahimi E., Dao V.T. and Kojda G. Role of moexipril for bradykinin receptor type two mediated dermal extravasation in mice. Poster presentation

delivered at the 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology – DGPT, 6.–9. March 2017, Heidelberg, Germany. Published: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2017) 390 (Suppl 1): Page 38 Poster 66.

Bisha M., F. Khosravani, V. T. Dao, T. Suvorava, G. Kojda Endothelial-specific overexpression of bradykinin receptor type two in angioedema research Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2016) P322 (Suppl 1): S75 DOI 10.1007/s00210-016-1213-y

Gholamreza-Fahimi E., Khosravani F., **Bisha M.**, Dao V.T., Suvorava T., van Zandvoort M., Kojda G. Evaluation of non-invasive Two-photon laser microscopy to study endothelial permeability in-vivo. Poster presentation delivered at the 82nd German Pharm-Tox Summit, 29. February-3. March 2016, Berlin, Germany. Published: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2016) 389 (Suppl 1): S75 Poster 321.

Weber, S., F. Hansen, F. Herbst, **Bisha M.**, S. Agouri, T. Dao, F. Khosravani, K. Znamirski, E. Boeser and M. Bas (2015). Contribution of nitric oxide to bradykinin induced angioedema. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Springer 233 Spring ST, New York, NY 10013, United States.

F. Khosravani, T. Suvorava, N. Brockmann, V.T. Dao, **Bisha M.**, M. Kassack, M. Bas, G. Kojda Effects of NO on the expression and function of bradykinin type 2 receptors. Role for angioedema? European Heart Journal, Volume 34, Issue suppl_1, 1 August 2013, P4173, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh309.P4173>

Agouri, S., **Bisha M.**, Dao, V. V., Suvorava, T., & Kojda, G. (2012, March). Phospho p38 MAPK dependent Upregulation of vascular AT2 receptor expression by nitric oxide. In Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (Vol. 385, No. SUPPL 1, pp. 3–4). One Now York Plaza, Suite 4600, New York, United States: Springer.

Lebenslauf

Marion Bisha

geboren in Düsseldorf

2003

Abitur

Juli. 2003 – Juli 2004

FSJ im Trägerverein ambulanter Hilfsdienste e.V. Düsseldorf

Okt. 2004 – Apr. 2009

Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Feb. 2008 – März. 2008

BASF Betriebspraktikum „Molecular Modelling“ unter der Leitung von Prof. Dr. Schleifer in Ludwigshafen

Mai. 2009 – Mai. 2010

Pharmaziepraktikantin in der „Apotheke im Hauptbahnhof“ in Düsseldorf

Sep. 2010

Approbation als Apothekerin

Okt. 2010 – Aug. 2013

Apothekerin in der „Metropolitan Pharmacy“, Airport Düsseldorf

Jan. 2012 – Okt. 2017

Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Düsseldorf

Nov. 2017 – Sep. 2018

Filialleitung der Farmaplust Apotheke, Wegberg

Okt.. 2018 – Jan. 2021

Elternzeit

Feb. 2021 – Dez. 2021

„Apothekerin vom Dienst“ in Impfzentren der Apothekerkammer Nordrhein

Jan. 2022 – heute

Co-Referentin der Apothekerkammer Nordrhein „Fortbildung von Schutzimpfungen“

Sep. 2013 – heute

Apothekerin in der avantiMed Apotheke Mülheim

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herr Prof. Kojda, der meine Dissertation betreut und begutachtet hat. Seine fachliche Expertise, sein ständiger Rat und seine unermüdliche Unterstützung waren von unschätzbarem Wert für den Abschluss dieser Arbeit. Prof. Kojda hat mich stets mit Geduld und Verständnis begleitet und mir geholfen, meine wissenschaftlichen Fähigkeiten zu schärfen.

Meine Eltern, ihr habt mich mein ganzes Leben lang begleitet, mich unterstützt und in mir den Glauben an meine Fähigkeiten gestärkt. Ihr seid immer meine größte Motivation gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der in den schwierigen Phasen dieser Arbeit unerschütterlich an meiner Seite stand und mir die Kraft und die nötige Motivation gab, dieses Projekt zu vollenden.

Ebenso möchte ich meinen Geschwistern danken. Euer Zuspruch und eure Unterstützung haben mir geholfen mich auf meine Ziele zu konzentrieren.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ort und Datum

Unterschrift