

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Innenstadt

der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Mutschler

**Nachweis der Kinin-B1-Rezeptor-Hochregulation im Schwein
bei Tieren mit einer vorbestehenden Infektion**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Markus LEHNER

aus

München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Siebeck

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. A. Roggenkamp

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2003

Für
Meine Eltern

Renate und Albert[†]

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Pathophysiologie der Entzündung	5
1.1.1	SIRS	6
1.1.2	MODS	9
1.1.3	Therapieansätze in der Klinik	9
1.2	Humorale Systeme, aktiviert im Rahmen von SIRS	10
1.2.1	Kontaktphasesystem	12
1.2.2	Kallikrein-Kinin-System	12
1.2.2.1	Bradykininrezeptor-Subtypen	14
1.2.2.2	Nuclear Factor NF- κ B	19
1.3	Fragestellung	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Vorbereitung	23
2.2	Operation	24
2.3	Versuchsprotokoll	26
2.4	Wirkstoffe	28
2.4.1	Lipopolysaccharid (LPS)	28
2.4.2	Kinin B2-Rezeptorantagonist	28
2.4.3	Kinin B1-Rezeptorantagonist	28
2.4.4	Stimulationslösungen	29
2.5	Versuchsgruppen	29
2.6	Statistik	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Spezifität des Kinin B1-Rezeptors bei Tieren der Gruppe 1	34
3.2	Wirkung einer LPS-Infusion bei Tieren der Gruppe 1	37
3.3	Konstanz des Kinin B1-Rezeptors bei Tieren der Gruppe 0	37
3.4	Spezifität der Kinin B1 Antwort bei Tieren der Gruppe 0	38
4	DISKUSSION	40
5	ZUSAMMENFASSUNG	45
6	LITERATURVERZEICHNIS	47
7	LEBENS LAUF	56
8	DANKSAGUNG	57

1 EINLEITUNG

Eine der größten Herausforderungen der modernen Intensivmedizin der vergangenen 20 Jahre ist das Management schwerer Störungen der Homöostase des Körpers. Diese können sowohl durch infektiöse als auch durch nichtinfektiöse Ursachen entstehen.

Schon Hippokrates erkannte im Jahre 400 a.c.n. den Zusammenhang von "Kälte der Extremitäten bei einer akuten Erkrankung als ein für die Prognose schlechtes Zeichen", heute spricht man von der Zentralisation des Kreislaufs.

Ein lokalisiertes Entzündungsgeschehen wird durch eine physiologische Antwortreaktion am Ort des Geschehens kontrolliert. Kommt es jedoch zum Verlust der lokalen Integrität des Entzündungsprozesses oder wird durch ein nichtentzündliches, das Immunsystem alternierendes Trauma, eine systemische Antwort bewirkt, so zeigt sich klinisch das Bild einer generalisierten Entzündungsreaktion.

1.1 Pathophysiologie der Entzündung

Die körpereigene Abwehr stützt sich im wesentlichen auf drei Komponenten:

- Schrankenbildung gegen das Eindringen von pathogenen Keimen von außen
- Unspezifisches Immunsystem
- Antigen-spezifisches Immunsystem

Die sofort nach Traumatisierung ablaufende unspezifische Entzündungsreaktion ist die erste Antwort des Körpers auf mechanische, chemische oder mikrobielle Stimuli. Diese Reaktion wird sehr schnell und umfassend sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene ausgeführt. Interleukine, Histamin und Bradykinin (BK) spielen eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung der Mikrozirkulation während der sogenannten „toxic shock“ Syndrome. Makrophagen und Endothelzellen werden über diese Zytokine aktiviert und setzen die Komplement-, Kallikrein-Kinin-, Koagulations- und Fibrinolyse-Kaskadesysteme in Gang. Es resultieren zum einen Vasodilatation, erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Darüber

hinaus kommt es auf zellulärer Ebene zu einer gesteigerten Genexpression, z.B. für Kininrezeptoren. Klinisch resultieren die fünf Kardinalsymptome der Entzündung: "rubor, tumor, calor, dolor und functio laesa".

Die lokale Entzündungsreaktion auf einen exogenen Stimulus stellt zunächst eine physiologische Schutzfunktion des Körpers dar. Verliert diese Reaktion ihre lokale Kontrolle, so exarzerbiert das klinische Bild einer systemischen Antwort, es kommt zum "Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom", SIRS [Davies MG et al., 1997]. Gleichzeitig werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die für den Verlauf von SIRS entscheidend sind: ist die Immunantwort kompetent, die Entzündungsreaktion beschränkt, so kommt es zur „restitutio ad integrum“. Eine generalisierte Immunreaktion kann jedoch zum Multi-Organ-Dysfunktion-Syndrom (MODS) führen, das schließlich nur mit Defiziten zur Ausheilung kommt [Davies MG et al., 1997], aber auch zum Tode des Patienten führen kann (siehe 1.1.3).

1.1.1 SIRS

Neuere Erkenntnisse über die pathophysiologischen Zusammenhänge der Entzündungsreaktion im Körper machten die Einführung einer allgemein gültigen Nomenklatur notwendig.

Nach der Übereinkunft der Konsensus-Konferenz der *American Society of Critical Care Medicine* wurden 1991 folgende Definitionen getroffen [Bone RC et al., 1992]:

SIRS: Das "Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom" wird charakterisiert durch eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

rektale Temperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, Herzfrequenz $>90/\text{min.}$,

Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{P}_a\text{CO}_2 <4.3\text{kPa}$, Leukozytenzahl >12.000 oder $<4.000/\mu\text{l}$ oder 10 % Vorstufen.

SIRS kann sowohl durch Infektion (viral, bakteriell, Protozoen oder Pilze) als auch durch nicht infektiöse Ursachen wie Trauma, Autoimmunreaktionen, Leberzirrhose oder Pankreatitis verursacht werden.

Sepsis: Hier liegt ein SIRS aufgrund einer nachgewiesenen Infektion vor, die zu hämodynamischer Instabilität geführt hat. Die prognostisch ungünstigste Form ist der septische Schock, der von Kreislaufkollaps und Multiorganversagen begleitet wird und in 30 bis 100 % der Fälle tödlich verläuft. Betroffen sind vor allem abwehrgeschwächte Patienten auf Intensivstationen nach Polytraumatisierung und nach großen chirurgischen Eingriffen.

MODS: Liegt ein „Multi-Organ-Dysfunction-Syndrome“ vor, so kann die physiologische Homöostase aufgrund der mehrfachen Organdysfunktion nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Im Rahmen von SIRS können vier Hauptereignisse der inflammatorischen Antwort beschrieben werden:

- Vasodilatation,
- Erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität
- Zelluläre Aktivierung mit Zelladhäsion
- Gerinnungsaktivierung

Zytokine sind die physiologischen Botenstoffe der inflammatorischen Antwort und deren Hauptmoleküle sind Tumornekrosefaktor (TNF- α), Interleukine (IL-1 und IL-6), Interferone sowie als Bestandteile der zellulären Antwort das Monozyten-Makrophagen-System und Endothelzellen [Davies MG et al. 1997].

Nach der Theorie von BONE läuft die Entstehung von SIRS in drei Stufen ab. Diese sind von großer klinischer Bedeutung, um rechtzeitig eine differenzierte Therapie beginnen zu können [Bone RC et al. 1996]:

- Zunächst erfolgt auf ein lokales Ereignis eine lokale Antwort mit dem Ziel der Wundheilung durch Interaktion des retikulo-endothelialen Systems (RES) mit dem Endothel.

- Reichen die lokalen Abwehrmechanismen nicht aus, so werden durch Abgabe kleiner Mengen an Zytokinen Zellen wie Makrophagen und Thrombozyten aktiviert, die Homöostase ist gestört. Diese Akutphase wird durch den Abfall von pro-inflammatorischen Mediatoren und die Freisetzung endogener Antagonisten streng kontrolliert, BONE spricht hier von der Aktivierung eines "Compensatory-Anti-inflammatory-Reaktion-Syndroms (CARS), bis die Wundheilung abgeschlossen oder die Infektion besiegt ist [Bone RC et al. 1992].
- Kann die Homöostase nicht wieder hergestellt werden, beginnt eine heftige, den gesamten Organismus betreffende Reaktion; die Flut der inflammatorischen Mediatoren triggert sämtliche humorale Kaskadensysteme und führt somit zu einer ungehemmten und maximalen Stimulation des RES mit dem Verlust der Integrität von Mikrozirkulation mit der Folge des Endorganversagens.

Diese unkontrollierten systemischen Veränderungen führen zu Vasodilatation mit Verringerung des systemischen Widerstands der Gefäße, so dass es bei zugleich ablaufender Permeabilitätsänderung der Gefäße zu einem zusätzlichen Flüssigkeitsverlust in das Interstitium kommt [Quezado ZM et al. 1992]. Dieses Phänomen macht es so schwierig, bei hypotensiven Patienten im SIRS eine adäquate Volumensubstitution zu erzielen.

Es resultieren eine Minderperfusion der Organe mit Ödembildung sowie ein anaerober Metabolismus und schließlich die Entwicklung einer Endorgan-Dysfunktion (MODS) [Suffredini AF et al. 1992].

Aktiviert Endothelzellen wiederum exprimieren verschiedene Faktoren (TNF- α , Thromboxan A2 [TxA2]), die eine pro-koagulatorische Funktion des Endothels vermitteln. TNF- α triggert durch Aktivierung des extrinsischen Systems die Gerinnungskaskade, ebenso wie Endotoxin in der Lage ist, sowohl die Gerinnungskaskade als auch das fibrinolytische System zu aktivieren [Mohlen von der MA et al. 1995].

1.1.2 MODS

Das Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom ist in der operativen Intensivmedizin eine der häufigsten Todesursachen. Zu den Ursachen zählen überwiegend Sepsis, Trauma, Verbrennung, Pankreatitis und Schock. Über die pathophysiologischen Abläufe ist bis heute jedoch nur wenig bekannt, eine kausale Therapiemöglichkeit gibt es bisher nicht. Die Prognose von SIRS, respektive MODS, hängt in erster Linie von der Anzahl der betroffenen Organe ab. Die Mortalität bei Versagen eines Organs beträgt in den ersten 24 Stunden 22 % und steigt im Verlauf von 7 Tagen auf 41 % an. Versagen drei oder mehr Organsysteme, so liegt die Mortalität am ersten Tag bei 80 %, nach vier Tagen jedoch bei 100 %.

1.1.3 Therapieansätze in der Klinik

Sepsis und SIRS kann man als Folge einer unkontrollierten, persistierenden Entzündungsreaktion verstehen [Bartels H 1998]. Diese Kaskade von Infektion bis hin zu Schock und MODS sollten auf den unterschiedlichen Ebenen ihrer Aktivierung unterbrochen werden.

Angriffspunkte der additiven Sepsistherapie:

Infektionen, verursacht durch Bakterien, Viren, Pilze oder Trauma, führen zur Bildung von Triggermolekülen (Endotoxin, Exotoxin, Teichoidsäuren). Die Therapie mit monoklonalem Antiendotoxin und Antimediatoren hat sich bisher jedoch als weitgehend unwirksam erwiesen [Bone RC 1996]. Die hier zusammen spielenden Mechanismen erscheinen zu komplex, als dass sie durch die Injektion von Antikörpern behandelbar sind.

Nach Triggerung erfolgt die Ausschüttung von primären Mediatoren (TNF- α , IL-1, C5a), jedoch wurde der Aspekt der anti-inflammatorischen Reaktion bis hin zur Immunsuppression im Rahmen der Sepsistherapie bisher wenig berücksichtigt [Warren HS 1997].

Zu den sekundären Mediatoren des Sepsisgeschehens zählen Zytokine, Komplementfragmente, der „platelet activating factor“ (PAF) und Adhaesionsmoleküle;

hier ist eine direkte therapeutische Intervention durch Immunstimulation denkbar (z.B. durch Interferon- γ).

Selbst nach 20 Jahren intensiver Forschung ist eine kausale Therapie des Endotoxinschocks, respektive SIRS und MODS, nicht möglich. BONE kommt zu dem Standpunkt, dass für eine adäquate Therapie die Grundlagen und Zusammenhänge noch nicht verstanden sind und er postuliert nach seiner Drei-Stufentheorie die Auffassung, dass das Ziel einer jeden Therapie momentan das Verhindern der nächsten Stufe sein muss [Bone RC et al. 1992].

1.2 Humorale Systeme, aktiviert im Rahmen von SIRS

Schwere Infektionen, respektive Sepsis, SIRS und MODS, werden durch die Aktivierung von humoralen Kaskadesystemen bestimmt [Aasen AO, Buo L 1991]:

- Plasmatische Gerinnung
- Kallikrein-Kininsystem
- Fibrinolyse
- Komplementsystem

Ein operatives oder akzidentielles Trauma führt zur Zerstörung von Gewebe und Gefäßendothel und legt subendotheliales Kollagen frei, an das sich nun folgende Substanzen heften: das v. Willebrandprotein (FVIII), Thrombozyten (Blutstillung), Faktor FXII, Präkallikrein und hochmolekulares (High Molekular Weight) HMW-Kininogen.

Während Faktor FXIIa den endogenen Weg der Gerinnung in Gang setzt, aktivieren das aus traumatisierten Zellen freigesetzte Gewebsthromboplastin und der Faktor FVIIa den exogenen Weg der Gerinnungskaskade mit dem Ziel, Fibrin zu bilden.

Gleichzeitig fördert Thrombin die Thrombozytenaggregation. Nach der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Ausschüttung von Thromboxan A₂ (TxA₂). Aktivierte Endothelzellen wiederum können den Thromboxan-Gegenspieler Prostacyclin (Pcl₂) freisetzen und dadurch die Plättchenaggregation hemmen.

Das Gerinnungssystem ist über die Aktivierung von Präkallikrein durch den Faktor FXIIa mit dem Kallikrein-Kinin-System verknüpft. Umgekehrt ist das Kallikrein auch in der Lage, den Faktor FXII zu aktivieren und stimuliert chemotaktisch neutrophile Granulozyten zur Elastasefreisetzung. Kallikrein setzt aus HMW-Kininogen Bradykinin frei. Bradykinin wiederum wirkt als starker Vasodilatator senkend auf den Blutdruck und steigert durch Erweiterung der Interzellulargaps die Gefäßpermeabilität. Über Urokinase aktiviert Kallikrein Plasminogen zu Plasmin, wodurch eine wichtige Verbindung zu einem weiteren System entsteht: Plasmin, das ebenfalls durch Gewebplasminogen-Aktivator (t-PA) aus aktivierten Endothelzellen entsteht, startet die Fibrinolyse mit der Bildung von Fibrinolyseprodukten und hält somit das Blutgerinnungssystem im Gleichgewicht. Wie Kallikrein ist auch Plasmin in der Lage, HMW-Kininogen zu spalten, wodurch weiteres Bradykinin entsteht.

Als weiteres System kann Plasmin direkt oder indirekt über die Freisetzung des Spaltproduktes Faktor FXIIa aus dem Hagemanfaktor das Komplementsystem aktivieren. Bei dem Komplementfaktor C1 beginnt der klassische Weg des Komplementsystems, das dem unspezifischen humoralen Immunabwehrsystem zugerechnet wird und die Zerstörung bakterieller Keime bewirkt.

Sowohl experimentelle als auch klinische Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung dieser Proteasesysteme eng mit Komplikationen wie dem „Adult Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) [Cendan JC et al. 1995] und MODS [Pinsky MR et al., 1993] verbunden ist. Darüber hinaus ist die Freisetzung von Proteinasen aus zirkulierenden Zellen, wie z.B. Granulozyten-Elastase, ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Endothelschäden, die mit einer starken Veränderung der Membranpermeabilität einhergehen und somit zum Zelluntergang in den verschiedenen Organen führen [Goldie AS et al. 1995]. Durch die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS), das gesunden, freiwilligen Probanden intravenös verabreicht wurde, konnte den Proteinasen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Pathophysiologie der Sepsis zugeordnet werden [Suffredini AF et al. 1989]. TOBIAS konnte nachweisen, dass der Lipid-A-Teil von LPS den Faktor FXII aktiviert und somit zur Generierung von Plasma-Prekallikrein führt [Tobias PS et al. 1988].

1.2.1 Kontaktphasesystem

Ursprünglich konnte die Entstehung von Kallikrein durch den Kontakt von Plasma mit Glasoberflächen *in vitro* nachgewiesen werden, so dass das System, über das diese Generierung ablief, Kontaktsystem genannt wurde. Später wurde zunächst *in vitro* die Aktivierung des Systems durch Dextransulfat und Sulfatide [Fujikawa K et al. 1980] gezeigt. Dextransulfat als enger Verwandter von Mukopolysacchariden ist als löslicher Aktivator *in vivo* anerkannt, wie Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten [Schmid A et al. 1998]. Ebenso gelang es, eine durch Endotoxin vermittelte Aktivierung des Kontaktsystems nachzuweisen [Cadena dela RA et al. 1996]. Durch Kontakt mit Kollagen und Basalmembranen der endothelialen Matrix kann es ebenfalls zur Kontaktaktivierung mit den klinischen Zeichen des septischen Schocks kommen [Bonner G et al. 1990].

Vier Proteine sind nötig, um durch Kontaktaktivierung die Bildung von Kininen zu bewirken [Colman RW 1984]:

- Faktor FXII (Hageman-Faktor)
- Präkallikrein
- HMWK (High Molecular Weight Kininogen)
- Faktor FXI

1.2.2 Kallikrein-Kinin-System

Den ersten Hinweis auf die Substanzklasse der Kinine erbrachten die beiden französischen Chirurgen ABELOUS und BARDIER 1909 [Regoli D, Barabe J 1980]. Sie beobachteten im narkotisierten Hund einen vorübergehenden Blutdruckabfall nach intravenöser Gabe einer alkoholunlöslichen Fraktion aus menschlichem Urin (Urohypotensive). 1928 führten Frey und Kraut diesen Blutdruckabfall auf eine thermolabile, nicht dialysierbare Substanz zurück. Weitere Untersuchungen folgten und 1934 konnte WERLE die Herkunft dieser Substanz aus dem Pankreas nachweisen und nannte diese in Anlehnung an die griechische Bezeichnung für Pankreas: *Kallikrein* [Regoli D, Barabe J 1980].

Darüber hinaus konnte WERLE zeigen, dass Kallikrein ein Enzym ist, das mit Plasmakomponenten reagiert und ein wesentlich kleineres Molekül freisetzt, das er zunächst "darmkontrahierender Stoff" und später Kallidin nannte [Regoli D, Barabe J 1980].

Es wurden zwei Kallikreinarten differenziert: zum einen das Plasma-Kallikrein sowie das Gewebe-Kallikrein, die sich bezüglich ihres Molekulargewichts, der Substratspezifität, des immunologischen Charakters, der freigesetzten Kininart und ihrer funktionalen Bedeutung voneinander unterscheiden [Bhoola KD et al. 1992].

Kinine sind biologisch aktive Peptide, die nach Gewebstraumatisierung oder durch inflammatorische Stimuli zunächst lokal aus Prekursor-Kininogenen nach limitierter Proteolyse gebildet werden [Proud D, Kaplan AP 1988].

Bradykinin stellt einen der stärksten Vasodilatoren dar, der über direkte Interaktion glatte Muskelzellen über den Bradykinin-B₂-Rezeptor relaxiert [Wachtfogel YT et al. 1993]. Über die Öffnung der tight-junctions verstärkt Bradykinin die kapilläre Permeabilität. Bradykinin kann direkt Nervenendigungen stimulieren, so dass Schmerz entsteht. Die Summe dieser Reaktionen zeigt viele der Aspekte der inflammatorischen Reaktion. Bradykinin ist darüber hinaus ein spezifischer Agonist an Endothelzellen. Nach Inkubation mit Bradykinin produzieren Endothelzellen verschiedener Arten Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid (NO) [Wachtfogel YT et al. 1993]. Beide Substanzen verstärken den vasodilatatorischen Effekt von Bradykinin und sie sind gleichzeitig starke Inhibitoren der Plättchenaggregation, so dass Bradykinin - freigesetzt aus Kallikrein - einen indirekt hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat. Bradykinin wird, wie auch die meisten seiner Agonisten, sehr schnell durch endothelständige Peptidasen als auch durch Plasmapeptidasen wie Carboxypeptidase N und Angiotensin Converting Enzym (ACE) abgebaut.

Wird durch die Bildung der Kinine die Migration von Zellen aus dem Blut in das Gewebe gefördert, so resultiert die Aktivierung von immunkompetenten Zellen wie Mastzellen, Fibroblasten und Makrophagen [Boola KD et al. 1992a]. Es werden in fast jedem Organ glatte Muskelzellen, das autonome und periphere Nervensystem sowie das sensorische Nervensystem alteriert [Steranka 1988].

Wie REGOLI zeigen konnte, resultieren diese Vielzahl pathophysiologischer Effekte der Entzündungsreaktion aus der Aktivierung von zwei Rezeptorsubtypen [Regoli D et al. 1998].

Neben ihrem hypotensiven Effekt wurden andere pathophysiologische Wirkungen nachgewiesen: sie verursachen Schmerz [Regoli D, Barabe J 1980], vermitteln reaktive Hyperämie in exokrinen Drüsen [Hilton SM 1970], sind am vaskulären und zellulären Geschehen der Entzündungsreaktion beteiligt, scheinen an der Kontrolle des Blutdruckes beteiligt zu sein und können auch als protektive Agenzien der Hypertension wichtig sein. Im Rahmen von bestimmten Krankheiten scheinen sie ebenfalls eine Rolle zu spielen: sie verursachen Bronchokonstriktion bei Asthma, sind bei chronisch entzündlichen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis oder bei akut entzündlichen Ereignissen wie dem septischen Schock von Bedeutung [Regoli D, Barabe J 1980].

Diese unterschiedlichen Effekte werden durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren hervorgerufen [Hall JM 1992].

1.2.2.1 Bradykininrezeptor-Subtypen

Nach REGOLI wird die Antwort auf vasoaktive Kinine durch die Aktivierung zweier Rezeptoren übertragen [Regoli D et al. 1993]: der Kinin-B1- und -B2-Rezeptor, die zunächst über ihre Struktur-Funktionsbeziehung ihrer Agonisten und Antagonisten charakterisiert wurden [Blaukat A et al. 1999]. Natürliche Agonisten am Kinin B2-Rezeptor sind die Peptide Bradykinin und Lys-Bradykinin (Kallidin), die mittels Proteolyse durch die Serinprotease Kallikrein aus den Kininogenen entstehen [Blaukat A et al. 1999]. Bradykinin und Lys-Bradykinin sind starke Agonisten, aber ihre Abbauprodukte (desArg⁹-BK und Lys-desArg¹⁰-Kallidin), die proteolytisch durch die

Arginin-Carboxypeptidase entstehen, sind biologisch wenig stabile Peptide, jedoch stellen sie starke Agonisten am Kinin B1-Rezeptor dar.

Pharmakologische Studien in den späten 70er-Jahren konnten eine Typisierung der Rezeptoren in Kinin B1 und B2 vornehmen [Regoli D, Barabe J 1980]. Hess 1992 und Menke et al. 1994 identifizierten die beiden Gene der Bradykininrezeptoren im Menschen.

Die beiden Rezeptor-Subtypen bestehen jeweils aus sieben transmembranösen Helices [Menke JG et al. 1994]. Nach ihrer Aktivierung wird durch die Phospholipase C, gekoppelt an G-Protein, Inositol-3-Phosphat (IP₃) hydrolysiert oder Arachidonsäure durch die Phospholipase A₂ freigesetzt [Bascands JL et al. 1993].

Beide Rezeptoren zeigen unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Kininen: der Kinin B2-Rezeptor wird durch Bradykinin, der Kinin B1-Rezeptor durch Lys-Bradykinin aktiviert.

ARAMORI untersuchte die Wirkung nicht peptidischer Bradykininantagonisten auf menschliche Kinin-Rezeptoren [Aramori I et al. 1997]. FR167344 und FR173657 zeigten eine hohe Bindungsaffinität zum B2-Rezeptor, jedoch keine Affinität zum B1-Rezeptor. Sie verhinderten die B2-vermittelte IP₃-Hydrolyse und verursachten eine dosisabhängige Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin. Die ist gleichbedeutend mit einer Abschwächung der spezifischen Antwort.

AKBARY zeigt einen nützlichen Effekt des Bradykinin B2-Antagonisten HOE 140 in klinischen Phase-II-Studien bei Patienten mit chronischem Asthma bronchiale [Akbar AM et al. 1996].

Der Kinin B1-Rezeptor wird unter natürlichen Bedingungen - wenn überhaupt - nur in einer sehr geringen Anzahl expremiert. Er kann aber im verletzten Gewebe erheblich induziert werden. Dies kann *in vitro* durch inflammatorische Mediatoren wie IL-1 β und LPS bewirkt werden [Schanstra JP et al. 1998].

Bisher war es nicht sicher gelungen, die Rezeptorinduktion des Kinin B1-Rezeptors zu klären [Marceau F 1995]. Marceau konnte jedoch zeigen, dass IL-1 β *in vitro* und der Kinin-B1-Agonist *in vivo* über die Transkriptionsebene zu einer Hochregulation der

Kinin B1-Rezeptoren führen. Diese Aktivierung erfolgt durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Genetik:

Die für den Kinin B1-Rezeptor codierenden Gene konnten sowohl in der Ratte als auch beim Menschen identifiziert werden. Das humane Kinin B1-Rezeptor-Gen konnte sehr nahe an dem des Kinin B2-Rezeptors auf Chromosom 14 an Stelle 14q32 lokalisiert werden [Ni A et al. 1998]. MENKE konnten zeigen, dass die Aminosäuresequenz der beiden Kininrezeptoren zu 36 % homolog ist [Menke JG et al. 1994].

Der Kinin B2-Rezeptor ist grundsätzlich in sämtlichen Geweben und Zellkulturen vorhanden [Bathon JM et al. 1991], der Kinin B1-Rezeptor hingegen findet sich in natürlichen Zellen nicht oder nur in einer nicht signifikanten Anzahl. Er wird nur in einer begrenzten Anzahl von Zellkulturen expremiert, wie z.B. in embryonalen Lungenfibroblasten, glatten Muskelzellen der Gefäße und endothelialer Zellen [Ni A et al. 1998].

Der Kinin B1-Rezeptor ist durch verschiedene Stimuli induzierbar und seine rezeptorvermittelte Antwort ist ein zeit- und proteinsyntheseabhängiger Prozess. Seine Induktion kann durch folgende Ereignisse induziert werden:

Zum einen führt die Gewebsverletzung direkt, zum anderen die Inkubation von Gewebe *in vitro* oder *in vivo* mit proinflammatorischen Mediatoren wie LPS oder Zytokine (IL 1 β , IL2, IL8, TNF- α) zu einer Kinin B1-mRNA-Expression in humanen HepG2-Zellen [Ni A et al. 1998]. Ferner konnte NI zeigen, dass eine gleichzeitige Inkubation mit Glukokortikoiden (hier: Dexamethason) oder Proteinsyntheseinhibitoren (hier: Cyclohexamid) die Induktion von mRNA für den B1-Rezeptor der Kinine unterdrückt.

SCHANSTRA konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) eine Schlüsselrolle in der inflammatorischen Antwort des Immunsystems darstellt und durch B1-Agonisten wie des Arg¹⁰-Kallidin aktiviert wird und gleichzeitig auch an der Regulation des Kinin B1-Rezeptors beteiligt ist [Schanstra JP et al. 1998].

Der Bradykinin B1-Rezeptor wird nach inflammatorischer Stimulation hochreguliert. Die Inkubation von menschlichen Lungenfibroblasten mit Il-1 β und dem

B1-Rezeptoragonisten des Arg¹⁰-Kallidin führt zu einer Expression sowohl der Kinin B1-Rezeptor-mRNA als auch des Rezeptorproteins. Es konnte gezeigt werden, dass der Kinin B1-Rezeptor durch seinen eigenen Agonisten hochreguliert wird. Es handelt sich hier um einen Oberflächenrezeptor. Als second messenger Systeme gelten intrazelluläres, freies Kalzium sowie die Proteinkinase C. Die Kinin B1-Rezeptorhochregulation in diesem Versuch korrelierte mit der Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB, der ausschließlich an die NFκB-Bindungsstelle im Bereich der Promotorregion des menschlichen Kinin B1-Rezeptorgenes bindet [Schanstra JP et al. 1998].

Darüber hinaus konnte AUSTIN eindeutig nachweisen, dass die Bindung eines Agonisten an den Kinin B1-Rezeptor zur Bildung von IP-3 führt und es somit zu einem vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration kommt; dies zeigt, dass der Rezeptor an die Aktivierung der Phospholipase C gekoppelt ist [Austin CE et al. 1997].

Weitere Untersuchungen folgten, um die molekularen Mechanismen, die der Hochregulation der Kinin B1-Rezeptorexpression zu Grunde liegen, zu verstehen. Zunächst gelang die Isolation der für die Proteinbiosynthese des humanen Kinin B1-Rezeptors notwendigen Promotors [Ni A et al. 1998]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NF-κB an der dynamischen Regulation des menschlichen Kinin B1-Rezeptor-Genes beteiligt ist. Diese Untersuchungen fanden an humanen Leberzellen (HepG2) statt.

Kinin-B1-Rezeptorantagonisten:

Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten wurden rund 10 Jahre vor den Kinin B2-Antagonisten entwickelt.

REGOLI entwickelte den ersten B1-Antagonisten 1977 durch Ersetzen des c-terminalen Phenylalaninrestes mit Leucin (die Methode glich der, die 1974 bei der Erforschung des Angiotensin II angewandt wurde). Die Entfernung der aromatischen Gruppe am c-terminalen Ende lässt die Affinität zum Rezeptor nahezu unverändert, während die biologische Aktivität des Komplexes aufgehoben wird; dies konnte sowohl im Hasenmodell als auch beim Menschen nachgewiesen werden [Regoli D et al. 1978]. Der aromatische Phe⁸-Rest ist daher das Instrument der Rezeptoraktivierung, während die restlichen 7 Aminosäuren von desArg⁹-Bradykinin für die Bindung an den Rezeptor notwendig sind [Regoli D, Barabe J 1980]. Dieser aromatische Kern interagiert mit den

Rezeptorproteinen, die Bindung des negativ geladenen G-Proteins zu Lysin- oder Argininrest des Rezeptors wird sofort abgebrochen und das aktivierte G-Protein kann vom Rezeptor gelöst werden, um die Phospholipase C zu aktivieren.

Kinin-B2-Rezeptorantagonisten:

Die anfangs entwickelten Kinin B2-Antagonisten (D-Arg[Hyp³,D-Phe⁷,Leu⁸]-BK) sind retrospektiv betrachtet alle Antagonisten mit partiell agonistischer Aktivität. Dies führte zu verschiedenen Hypothesen, unter anderem wurde ein Kinin B3-Rezeptor postuliert [Farmer SG et al. 1989], der aber nie validiert werden konnte [Regoli D et al. 1993]. Die zweite Generation eines B2-Antagonisten wurde mit HOE 140 eingeführt: es zeigt eine hohe Affinität in sämtlichen Spezies, eine lange Wirkzeit von über 60 Minuten, eine gute Protektion vor enzymatischem Abbau [Wirth K et al. 1991].

Intraarteriell injiziertes HOE 140 blockiert in der Ratte die Effekte von exogen zugeführtem Bradykinin für über 60 Minuten, wodurch HOE 140 sehr nützlich für *in vivo* Studien wurde [Wirth K et al. 1991; Gobeil F et al. 1996]. Seine Aktion ist nur schwer reversibel [Rhaleb N et al. 1992].

Die dritte Generation von Kinin B2-Antagonisten liegt in der Entwicklung von nicht peptidischen, oral aktiven Antagonisten: WIN 64338 und FR173657 [Farmer SG et al. 1994, Scherrer D 1995]. WIN 64338 ist aber bei Versuchen am Menschen inaktiv [Regoli D 1994, Gobeil F et al. 1996].

FR 173657 stellt den ersten oral wirksamen Kinin B2-Antagonisten mit einer hohen Antagonisierungsrate in vielen Spezies dar. Er gilt bis heute als einziger Vertreter von Kinin B2-Antagonisten, der gänzlich inaktiv am Kinin B1-Rezeptor des Menschen ist [Aramori I et al. 1997].

1.2.2.2 Nuclear Factor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der an der Regulation mehrerer Gene teilnimmt, die an der Immun-, Akutphase- und inflammatorischen Antwort beteiligt sind [Baldwin AS 1996]. NF- κ B ist ein Heterodimer der rel-Familie der Transkriptionsfaktoren; in den Zellen sind diese Proteine ständig präsent, werden aber durch Bindung an inhibitorische Proteine (I κ B) inaktiv im Zytosol zurückgehalten.

Erfolgt nun eine Stimulation durch TNF α , LPS, IL-1, so führt dies zu einer phosphorylierungsabhängigen Proteolyse von I κ B, die es ermöglicht, dass der aktivierte NF κ B in den Nukleus transloziert wird und hier die Transkription durch Bindung an definierte Promoter-Elemente einleitet [Wiggins RC 1983].

Aktivierte NF- κ B-Komplexe werden in den Zellkern transloziert; diese Aktivierung geschieht als Reaktion auf Mitogene, Zytokine (IL1 β , IL2, TNF α), LPS und Lipopeptide [Wiggins RC 1983].

Innerhalb von wenigen Minuten nach Stimulation der Endothelzellen mit Zytokinen oder Endotoxin kann eine NF- κ B-Aktivierung mit anschließender Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden. NF- κ B stellt somit einen entscheidenden Transkriptionsfaktor für die Aktivierung von Adhaesionmolekül-Genen während der Inflammation auch *in vivo* dar [Chang CK et al. 1999].

Bisher konnten mehrere inhibitorische Proteine differenziert werden: I κ B α , I κ B β , I κ B γ . Verschiedene Kinasen sind in den Phosphorylierungsprozessen von I κ B involviert [Pan ZK et al. 1996].

Neutrophile Granulozyten verursachen Leberschäden im experimentellen Endotoxinschock. Angelockt werden sie durch Chemotaxis, Oberflächenadhaesion und Transmigration. Diese starke Anheftung und die transendotheliale Migration werden durch die Interaktion von Oberflächenmolekülen der Neutrophilen (Integrine) mit Oberflächenmolekülen der Endothelzellen vermittelt [Chang CK et al. 1999]. Endothelzellen exprimieren sogenannte vaskuläre (VCAM-1) und extravaskuläre Zellen

können sogenannte interzelluläre Adhaesionsmoleküle (ICAM-1) bilden. Durch Integrine auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten können diese mit den Endothelzellen und Gewebszellen interagieren [Essani NA et al. 1995]. Diese Adhaesionsmoleküle werden durch die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten gebildet. DNA-Bindungsbezirke von NF- κ B konnten in der Promotorregion der Adhaesionsmoleküle einschließlich ICAM-1, E-Selectin, P-Selectin und VCAM-1 nachgewiesen werden [Ledebur HC et al. 1995].

Antioxidantien wie Pyrrolidindithiocarbamat, N-Acetylcystein und Dimethylsulfoxid (DMSO) können die LPS- und Zytokin-induzierte Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zellreihen hemmen [Chang CK et al. 1999]. ESSANI konnte 1997 nachweisen, dass die NF- κ B-Hemmung in der Leber von endotoxämischen Mäusen durch DMSO direkt mit der Unterdrückung der ICAM-1-Gen-Expression verbunden ist [Essani NA et al. 1997].

Dies lässt vermuten, dass DMSO ein Schutzmechanismus ist, der mit der NF- κ B-Hemmung, der Hemmung der Leukozytenadhaesion und der Adhaesionsmolekül-Genexpression assoziiert ist [Essani NA et al. 1997]. CHANG konnte nachweisen, dass DMSO zu 32 % die NF- κ B-Aktivierung, zu 27 % die ICAM-1-Genexpression und zu 71 % die TNF α -Formation in Leberzellen der Ratte hemmt [Chang CK et al. 1999].

Regulation:

Die NF- κ B-Deaktivierung hängt sehr stark von der Anwesenheit des I κ B-Proteins ab.

Der Abbau von I κ B α hat zur Folge, dass gleichzeitig die Induktion der NF κ B-mRNA erfolgt [Sun SC et al. 1993].

Diese neu synthetisierten I κ B α -Proteine neutralisieren die Verlagerung von NF- κ B in den Nukleus [Arenzana-Seisdedos F et al. 1995] und hemmen auch die NF- κ B-Proteine im Zytosol. Allerdings ist das I κ B nicht in der Lage, die schon in den Kern translozierten NF- κ B-Proteine zu neutralisieren [Johnson DR et al. 1996].

Der proteolytische Abbau von I κ B wird durch eine Phosphorylierungsreaktion bewirkt; dieser Reaktionsschritt ist *in vivo* für die Aktivierung von NF- κ B nötig [Arenzana-Seisdedos F et al. 1995]: NF- κ B wird aus der Bindung von I κ B herausgelöst und damit aktiv. Die Enzyme, die an der Phosphorylierung mitwirken, sind verschiedene

Proteinkinasen: Casein-Kinase-II sowie die mitogenaktivierte Proteinkinase [Janosch P et al. 1996].

Nach VELASCO folgt auf einen Abbau von I κ B - verursacht durch z.B. exogene Stimuli - ein Anstieg von NF- κ B. Die zunächst nach Stimulation maximale Aktivität von NF- κ B bleibt für etwa 6 Stunden bestehen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zum einen der Spiegel von I κ B nicht ausreicht, um NF- κ B von seiner DNA zu trennen und zum anderen der NF- κ B-DNA-Komplex stabiler ist, so dass er länger aktiv bleibt [Velasco M et al. 1997].

Zusammenfassend weisen diese Daten auf die Existenz von Abbauwegen hin, die in diesem Modell abhängig von LPS und TNF α sind und die sehr schnell zur I κ B-Transkription führen und so zur Abschwächung der NF- κ B-abhängigen Antwort beitragen.

Glukokortikoide inhibieren die NF κ B-Aktivierung in epithelialen Zellen über einen unabhängigen Mechanismus der I κ B α Hochregulation und möglicherweise sind sie auch in einer Hemmung des Translozierungsprozesses vom Zytosol in den Nukleus involviert [Ohtsuka T et al. 1996].

Der Bradykinin-B1-Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der rezeptorvermittelten Aktion der Kinine [Marceau F 1995]. Der Nachweis des NF- κ B für die Induktion des Kinin B1-Rezeptor-Genes ist als ein weiterer Baustein von Mediatoren der inflammatorischen Reaktionen des Körpers anzusehen [Ni A et al. 1998].

Auch auf die NF- κ B-Aktivierung können Inhibitoren einwirken: BLADWIN konnte die Aktivierung von NF- κ B aus I κ B zeigen [Baldwin AS 1996]; darüber hinaus konnte BARNES nachweisen, dass Glukokortikoide (z.B. Dexamethason) die Expression des Kinin B1-Rezeptors auf Transkriptionsebene durch Downregulation der Kinin B1-Promotorgene hemmen [Barnes PJ et al. 1993].

Blockierte man nun aber die Proteinsynthese durch Inhibitoren wie Cycloheximid, so kam es trotzdem zu einer Kinin B1-Rezeptor-Induktion [Ni A et al. 1998].

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die LPS- oder IL-1-induzierte Hochregulation des Kinin B1-Rezeptors keiner Proteinbiosynthese bedarf [Ni A et al. 1998].

Frühere Untersuchungen von DRUMMOND und CAMPOS zeigten jedoch, dass in der Hochregulation die Proteinbiosynthese sehr wohl beteiligt ist [Drummond GR et al. 1995; Campos MM et al. 1996].

Die einzelnen Mechanismen, die zur Induktion der Kinin B1-Rezeptoren führen, sind bisher nicht hinreichend bekannt. HENKEL spricht von einer Superinduktion direkt durch NF- κ B, da sein natürlicher Inhibitor (I κ B) durch Hemmung der Proteinsynthese nicht mehr gebildet wird [Henkel T 1993].

1.3 Fragestellung

In der hier vorliegenden Studie sollte nun gezeigt werden, ob die unter experimentellen Bedingungen im Labor nachweisbare Hochregulation des Kinin B1-Rezeptors auch unter nicht experimentellen, natürlichen Bedingungen erfolgt.

Untersucht wurden im einzelnen folgende Fragen:

1. Ist der Kinin B1-Rezeptor in natürlich kranken Tieren versus gesunden Tieren vorhanden?
2. Ist der Kinin B1-Rezeptor funktionell und spezifisch?
3. Liegt eine Konstanz bezüglich des Vorhandenseins des Kinin B1-Rezeptors vor?

2 MATERIAL UND METHODEN

In der hier vorgelegten Studie verwendeten wir junge Läufer Schweine der Deutschen Landrasse mit einem Gewicht zwischen 15 und 30 kg. Die Tiere wurden vom Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim bezogen.

Alle Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und erfüllten die Bestimmungen des bayerischen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. August 1986.

2.1 Vorbereitung

Das jeweilige Versuchstier wurde zwölf Stunden vor dem Versuch von den anderen Tieren getrennt und erhielt lediglich Wasser ad libitum zu trinken. Als Prämedikation wurde den Tieren 3 mg/kg Körpergewicht (KG) Azaperone [Stresnil ®, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss] sowie 3.75 mg/kg KG Metomidat-Hydrochlorid [Hypnodil ®, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss] intramuskulär in den rechten Musculus gluteus maximus injiziert.

Die Narkose wurde nach etwa 20 Minuten mit 24 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium [Narcoren ®, Fa. Iffa Merieux, Laupheim] über eine Ohrvene intravenös eingeleitet und während des gesamten Versuchs mit einer Dauerinfusion von 0.54 mg/kgKG/h Piritramid [Dipidolor ®, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss] und 0.29 mg/kgKG/h Pancuroniumbromid [Pancuronium Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe] aufrechterhalten. Die Tiere wurden sodann orotracheal mit einem Portex 6.5 mm Tubus der Fa. Hythe, Großbritannien, intubiert. Anschließend erfolgte die Rasur im Operationsgebiet. Schließlich erfolgte die Lagerung auf dem OP-Tisch und die volumenkontrollierte Beatmung mit dem Beatmungsgerät Servo 900 C der Firma Siemens Elema AB, Solne, Schweden. Als fest eingestellte Parameter wurden festgelegt: Inspiratorische Sauerstoffkonzentration (F_iO_2): 40 %, Atemzugvolumen 10 ml/kg KG, Atemfrequenz: 20/min, Inspirationsdauer 25 %, Pausendauer 10 % und kein PEEP.

Zur kardialen Überwachung wurde ein Dreipunkt-EKG angelegt [Sirecust 402 Monitor der Fa. Siemens, München]. Über einen weiteren Monitor [Sirecus 404 Monitor der Fa. Siemens, München] wurde die endexpiratorische Kohlendioxid- (CO_2) Konzentration über eine CO_2 -Küvette gemessen sowie die Compliance und Resistance berechnet.

Anschließend erfolgte der nachfolgend beschriebene operative Eingriff.

2.2 Operation

Für die Durchführung der Versuche und deren Monitoring war es zunächst nötig, folgende Katheter im Versuchstier zu platzieren:

Vena jugularis externa links:

- vier zentral venöse Katheter (ZVK): Cavafix 0.8/1.4 mm, 70 cm, Fa. Braun, Melsungen
- eine 14 G, 8 cm lange Braunüle der Fa. Braun, Melsungen

Vena jugularis interna links:

- ein Swan-Ganz-Katheter (Thermodilutionskatheter, Modell 93A-131-7F) der Fa. American Edwards Laboratorien, Anasco, Puerto Rico

Arteria carotis interna links

- Arterieller Zuspritzkatheter 18 G, 12 cm der Fa. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Arteria femoralis rechts:

- Arterieller Druckkatheter und Lungenwasserkatheter (Femoral Artery Lung water Catheter, Modell 96-020-5F) der Fa. American Edwards Laboratories, Irvine CA, USA

Harnblase:

- Suprapubischer Blasenkateter (Cystofix Charrier (CH) 10) der Fa. Braun, Melsungen

Abdomen:

- Aszites-Sammelrohr (Darmrohr CH 16) Fa. Catheter & Tubes, Lynge, Dänemark

Durchführung

Die Versuchstiere wurden in Rechtsseitenlage auf dem OP-Tisch gelagert. Hautschnitt zwischen dem linken Mandibularwinkel, Darstellung der Vena (V.) jugularis externa am Vorderrand des Musculus (M.) sternokleidomastoideus und Einbringen von 4 ZVK sowie einer grosslumigen Braunüle. Diese diente als Zugang für die kontinuierliche Volumensubstitution mit Vollelektrolytlösung [Tutofusin®, Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen] sowie zur Blutabnahme laut Versuchsprotokoll. Über einen der zentralen Venenkatheter wurde kontinuierlich die Narkose verabreicht, über einen weiteren wurde kontinuierlich der zentrale Venendruck gemessen und über einen dritten wurde LPS, NaCl 0,9 % oder HOE 140 gegeben. Nun Darstellen der Vena jugularis interna sowie der Arteria (A.) carotis interna. Beide Gefäße werden jeweils doppelt angeschlungen, nach kranial ligiert und folgende Katheter eingebracht: ein arterieller Zuspritzkatheter in die A. carotis interna, über den die Tiere durch Bolusgaben mit 1, 3, 10 und 30 µg des Arg⁹-Bradykinin, Bradykinin (300 ng) und Acetylcholin (500 ng) der Fa. Sigma Chemical Co, St. Luis, MO, USA, stimuliert wurden. Über die V. jugularis interna wurde ein Pulmonalkatheter vorsichtig in einen Hauptast der A. pulmonalis eingeschwenkt und nach Lagekontrolle durch die charakteristische Druckkurve und Wedge-Druck in dieser Position fixiert. Der pulmonalarterielle Mitteldruck wurde kontinuierlich gemessen, ferner wurde die gemischt-venöse Blutabnahme über diesen Katheter durchgeführt. Als dritter Schritt wurde die A. femoralis rechts im Bereich des proximalen Oberschenkels doppelt angeschlungen, nach distal ligiert und über eine kleine Inzision der arterielle Druck- und Thermodilutionskatheter bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben und fixiert. Der Druckdom und die Temperatursonde wurden angeschlossen und geeicht. Über diesen Katheter wurde kontinuierlich der arteriell-systemische Blutdruck und die Körperkerntemperatur gemessen und aufgezeichnet, es konnte das Herzzeitvolumen und das extravaskuläre Lungenwasser gemessen sowie die arteriellen Blutgasanalysen durchgeführt werden. Über eine etwa 4 cm lange mediane Unterbauchlaparotomie im Bereich der kaudalen Zitzen wurde die Blase aufgesucht. Vorlegen einer Tabaksbeutelnaht, Stichinzision mit der Spaltkanüle des suprapubischen Blasenkateters, Einbringen des Katheters und Verschluss der Blase mittels vorgelegter Tabaksbeutelnaht.

2.3 Versuchprotokoll

Nach Beendigung der operativen Vorbereitung, die etwa 1 Stunde in Anspruch nahm, und nach einer weiteren Stunde Ruhephase wurden die Eingangswerte bestimmt (Stunde 0). Anschließend erfolgte die Beobachtung der Tiere für bis zu 8 Stunden.

Folgende Parameter wurden stündlich aufgezeichnet:

Es wurden Herzfrequenz, systemischer, arterieller Blutdruck, pulmonal-arterieller Mitteldruck, zentralvenöser Druck, das Herzzeitvolumen sowie das extravaskuläre Lungenwasser gemessen und dokumentiert.

Es erfolgte eine arterielle und gemischt-venöse Blutgasanalyse, Dokumentation der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration, des in- und expiratorischen Hubvolumens und des Atemminutenvolumens sowie des Spitzen-, Pausen- und Mitteldrucks. Darüber hinaus wurde das expiratorische $p\text{CO}_2$ (Kohlendioxid-Partialdruck der Expirationsluft) gemessen und die Compliance und Resistance vom Monitor abgelesen.

Alle zwei Stunden wurden folgende Parameter bestimmt:

Blutbild mit Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Erythrozytenzahl und Hämatokrit.

Parameter:

Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich über eine Dreipunkt-EKG-Ableitung der linken Thoraxhälfte abgeleitet und am Monitor [Sirecust 402 der Fa. Siemens, München] graphisch dargestellt.

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den in der Aorta abdominalis platzierten Femoraliskatheter kontinuierlich gemessen, auf einem Monitor [Sirecust 404 der Fa. Siemens, München] mit Hilfe eines Druckwandlers [Modell 800, Fa. Bentley Trantec] dargestellt und mit einem Plotter kontinuierlich aufgezeichnet.

Durch Kopplung mit dem Beatmungsgerät Servo 900C Ventilator der Fa. Siemens Elma AB, Schweden, konnten an diesem Monitor zusätzlich die dynamische Lungencompliance (ml/mbar) und der Beatmungsspitzendruck (mbar) abgelesen werden. Der pulmonal-arterielle Mitteldruck (mPAP), der zentral-venöse Vorhofdruck (ZVD) und der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PCWP) wurden ebenfalls kontinuierlich über den in der A. pulmonalis platzierten Swan-Ganz-Katheter bzw. über einen der

zentralvenösen Katheter gemessen und mit Hilfe mehrerer Druckwandler der Fa. Bentley Trantec, Modell 800, auf einem weiteren Monitor [Sirecust 404, Fa. Siemens, München] dargestellt. Während der LPS-Gabe bei Tieren der Gruppe 0 mit niedriger Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen wurde der mPAP kontinuierlich über den Schreiber aufgezeichnet.

Zur Messung des Herzzeitvolumens sowie des extravaskulären Lungenwassers wurden stündlich zunächst 10 ml eisgekühlte 5 %ige Glucoselösung [Glucose 5 Pfrimmer®, Pharmacia GmbH, Erlangen] über die Braunüle in die V. jugularis interna injiziert. Mittels des Thermodilutionscomputers [Lung Water Computer Modell 9310, Fa. American Edwards Laboratories, Santa Anna, USA] wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen berechnet [Ellings VB et al. 1982].

Darüber hinaus konnte über den Lungenwasser-Computer die Körperkerntemperatur gemessen werden.

Über ein speziell für Tierblut geeignetes Zählgerät [Contravas Haematology Systems, Contravas AG, Zürich, Schweiz] wurde alle zwei Stunden aus mit EDTA antikoaguliertem Blut die Leukozyten-, Erythrozyten und Thrombozytenzahl bestimmt.

Die Messung der Sauerstoffsättigung (SäO₂) und des Hämoglobingehalts (Hb) aus arteriellem und gemischtvenösen, heparinisierten Blut wurde mit einem nur für Tierblut verwendeten Messgerät OSM 2 Hemioximeter [Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark] durchgeführt.

Die Bestimmung der Blutgase (pO₂, pCO₂, pH-Wert, B.E. und HCO₃⁻) erfolgte aus derselben Blutprobe mit Hilfe des Blutgasanalysegerätes Modell 168 pH/blood gas analyzer Fa. Corning, Medfield, MA, USA.

Die Urin- und Aszitesproduktion in ml/h wurde stündlich über die Ableitungssysteme aus Blase und Peritoneum gemessen.

2.4 Wirkstoffe

2.4.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Tiere der Gruppe 0 erhielten das sehr gut wasserlösliche, bakterielle Lipopolysaccharid von *Salmonella abortus equi*, extrahiert nach der Methode von GALANOS [Galanos C et al. 1969]. Die Lösung der Firma Sebak GmbH, Aidenbach, wurde mit einer Konzentration von 1 µg/kg über eine Stunde intravenös infundiert. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass bei Versuchstieren die Gabe von LPS in einer Dosierung von 1 µg/kg KG ausreicht, die Expression des Kinin B1-Rezeptors zu induzieren, jedoch nicht zu gravierenden Änderungen von Blutdruck und Herzzeitvolumen führt.

2.4.2 Kinin B2-Rezeptor-Antagonist

Der Kinin B2-Rezeptorantagonist HOE 140 (d-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-dTic-Oic-Arg) [Wirth K et al. 1991] wurde uns von Prof. Dr. B.A. SCHOLKENS und Dr. K. WIRTH der Firma Hoechst AG, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Wir injizierten es in einer Dosis von 30 µg/kg Körpergewicht über 60 min intravenös.

2.4.3 Kinin B1-Rezeptor-Antagonist

Es handelt sich hier um einen spezifischen, kompetitiven Kinin-B1-Rezeptorantagonisten CP-0298 mit der Aminosäuresequenz Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-Bradykinin, der von der Fa. Cortech [Regoli D, Barabe J 1980] synthetisiert wurde.

Die verabreichte Dosis in der hier vorliegenden Studie betrug 3 µg/kg Körpergewicht/min.

2.4.4 Stimulationen

Die Trockensubstanzen von Bradykinin, desArg⁹-Bradykinin und Acetylcholin wurden von der Firma Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, bezogen. Es wurden jeweils neue Verdünnungsreihen mit isotoner Kochsalzlösung hergestellt und im Eisbad gekühlt. Die Stimulationsdosierungen von 1, 3, 10 und 30 µg desArg⁹-Bradykinin, 300 ng Bradykinin und 500 ng Acetylcholin wurden als konstantes Injektionsvolumen von einem Milliliter intraarteriell über den Katheter in der A. carotis interna verabreicht. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der zentralarterielle diastolische sowie der arterielle Mitteldruck kontinuierlich auf einem Papiersreiber [Modell BD 41, Kipp & Zonen, Holland] aufgezeichnet. Nach den Stimulationsversuchen wurde der induzierte diastolische Blutdruckabfall als Antwort in Prozent des Ausgangswertes vor Injektion errechnet. Es wurde der maximale Abfall des diastolischen Blutdrucks während der hypotensiven Phase nach Stimulation bestimmt.

2.5 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden sowohl klinisch als auch bezüglich ihrer hypotensiven Antwort nach Stimulation durch den Kinin B1-Rezeptoragonisten desArg⁹-Bradykinin eingeteilt.

Für die Eingruppierung der Tiere nach laborchemischen und klinischen Kriterien wurden folgende Parameter bestimmt:

Körpertemperatur (<38°C / >38°C), Beatmungsspitzenndruck (<20 mbar / >20 mbar), pulmonal-arterieller Spitzenndruck (<25 mbar / >25 mbar), Leukozytenzahl (10.000-25.000/µl / <10.000, >25.000/µl), p_aO₂ (>150 mmHg / <150 mmHg), Hb (>7 g% / <7 g%), klinischer Anhalt für Infektion (negativ / positiv).

Es wurden nicht alle Kriterien bei jedem Tier der entsprechenden Gruppe erfüllt.

Drei kranken Tieren mit einem Antwortverhalten der Gruppe 1 (erhöhte Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen) wurde zu Versuchsbeginn der spezifische Kinin B1-Rezeptorantagonist Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-Bradykinin (CP-0298) als

Dauerinfusion intravenös in einer Dosierung von 3 µg/kg Körpergewicht/min infundiert. Während der laufenden Infusion wurde mehrfach das Antwortverhalten auf Stimulation mit desArg⁹-BK, BK und ACh getestet.

Zwei weiteren kranken Schweinen mit einem Antwortverhalten der Gruppe 1 zu Versuchsbeginn wurde der spezifische Kinin B2-Rezeptorantagonist HOE 140 ebenfalls als intravenöse Dauerinfusion in der Dosierung 30 µg/kg Körpergewicht/h infundiert und ebenfalls mehrere Stimulationsversuche mit desArg⁹-BK, BK und ACh nach Infusion des B2-Antagonisten durchgeführt.

Bei drei kranken Tieren mit einem Antwortverhalten der Gruppe 1 zu Ausgangsbedingungen wurde LPS als Dauerinfusion mit 1µg/kg/h intravenös injiziert. Über einen achtstündigen Beobachtungszeitraum wurden die Tiere stündlich hinsichtlich ihrer Kinin B1-Antwort auf desArg⁹-BK, BK und ACh untersucht.

Vier gesunde Schweine mit einem Antwortverhalten der Gruppe 0 (niedere Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen) wurden vor und nach Infusion des Kinin-B1-Antagonisten CP-0298 mit 10 und 30 µg desArg⁹-BK stimuliert. Nach einer Zeitspanne von 30 Minuten wurde der vollständige Abbau des Kinin B1-Antagonisten durch Erreichen der Ausgangswerte auf die Stimulation von 10 und 30 µg desArg⁹-BK nachgewiesen. Waren die Ausgangswerte erreicht, so wurde der Kinin B2-Antagonist HOE 140 infundiert und ebenfalls das Antwortverhalten auf desArg⁹-BK, BK und ACh bestimmt.

Vier weiteren gesunden Schweinen mit einer Antwort der Gruppe 0 erhielten über acht Stunden 0.9 %ige Kochsalzlösung intravenös; stündliche Stimulationsversuche mit desArg⁹-BK, BK und ACh.

2.6 Statistik

Die 35 Tiere wurden in den beiden Gruppen bezüglich ihres Kinin B1-Antwortverhaltens mit dem χ^2 -Test verglichen (Tabelle 1).

In Abbildung 5 wurden die Mittelwerte des Blutdruckabfalls bei 10 und 30 μ g des Arg⁹-Bradykinin vor und nach Blockade des Kinin B1-Rezeptors berechnet und graphisch gegenübergestellt. Die Darstellung erfolgte als Mittelwerte der Parameter in den jeweiligen Gruppen; als Maß für die Streuung der Einzelwerte wurden die Standardfehler des Mittelwertes angegeben (mean +/- SEM). Die Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ im t-Test als signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

In diese Studie wurden insgesamt 35 Tiere eingeschlossen.

Nach Beendigung der Versuchsvorbereitungen einschließlich der operativen Platzierung der diversen Messkatheter wurden die Tiere zunächst untersucht und klinisch entweder als gesund oder krank eingestuft.

Kranke Tiere wiesen eines oder mehrere der folgenden Merkmale auf (n = 8):

Abszess	n = 1
Rasselgeräusche der Lunge	n = 2
Leukozytose	n = 1
Impetiginöse Hauteffloreszenzen	n = 1
Diarrhoe	n = 2
Lymphadenopathie	n = 1

Entsprechend ihrer Druckantwort auf Stimulation mit dem Kinin B1-Rezeptoragonisten desArg⁹-Bradykinin unter Ausgangsbedingungen wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Abfall des diastolischen Blutdruckes um 5 % und mehr bezogen auf die Ausgangswerte nach Injektion von 1 µg oder 3 µg desArg⁹-Bradykinin als Bolus.

Gruppe 0: Abfall des diastolischen Blutdruckes um 5 % oder mehr des Ausgangswertes bei 10 µg oder 30 µg desArg⁹-Bradykinin als Bolus.

Eine typische Blutdruckantwortkurve eines klinisch gesunden Tieres auf die Stimulation mit steigenden Dosen von desArg⁹-Bradykinin (1, 3, 10 und 30 µg), Bradykinin (300 ng) und Acetylcholin (500 ng) ist in Abbildung 1 [A] dargestellt. Die Antwort auf Bradykinin und Acetylcholin war unverändert (vgl. Abbildung 1 [B]), die Antwort auf desArg⁹-BK konnte nur bei 30 µg des Kinin B1-Rezeptoragonisten nachgewiesen werden, sodass dieses Tier der Gruppe 0 mit niedriger Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen zugeteilt wurde (Abbildung 1 [A]).

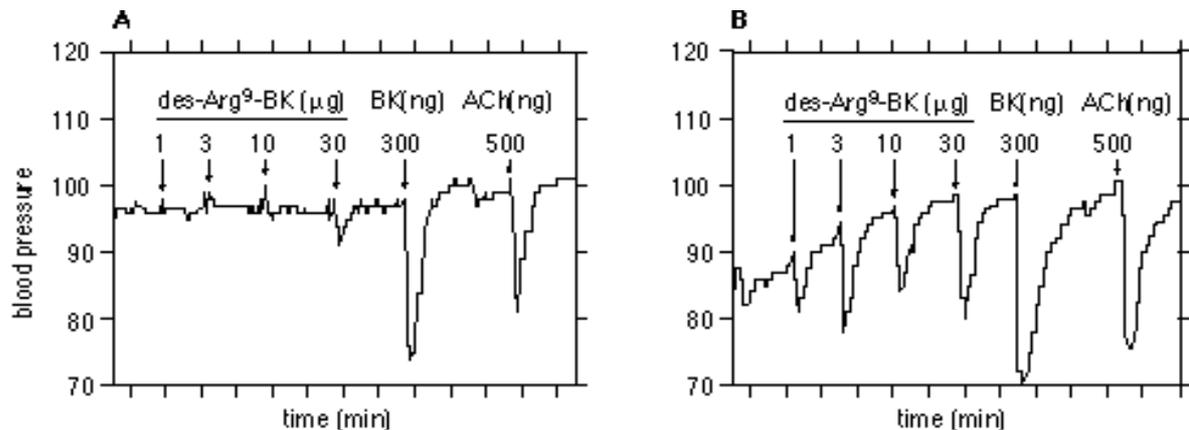


Abbildung 1 [A und B]: Blutdruck-Antwortkurve auf die Stimulation von steigenden Dosen des Arg⁹-Bradykinin (1, 3, 10 und 30 µg; 300 ng Bradykinin und 500 ng Acetylcholin) in einem Tier der Gruppe 0 [A] und in einem Tier der Gruppe 1 [B] mit erhöhter Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen.

Während der abschließenden Beurteilung der Blutdruckkurven war dem Untersucher der klinische Zustand des Tieres nicht bekannt.

Nach der Beurteilung gemäß unserem Versuchsprotokoll waren 27 Schweine als gesund eingestuft worden, acht wurden aufgrund der oben genannten Symptome als krank diagnostiziert.

Legt man nun die Stimulationsantwortkurven unter Ausgangsbedingungen zu Grunde, so zeigten 11 Tiere eine vermehrte Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors, sodass diese der Gruppe 1 zuzuordnen waren.

Der Blutdruckabfall nach Stimulation mit Bradykinin und Acetylcholin war in beiden Gruppen ähnlich.

In Abbildung 1 B ist die Antwortkurve eines Tieres mit einem Abszess am Hals abgebildet. Aufgrund der dosisabhängigen hypotensiven Antwort auf Stimulation mit des Arg⁹-Bradykinin mit einem Abfall von über 5 % des diastolischen Blutdruckes unter Ausgangsbedingungen erfolgte die Zuteilung in die Gruppe 1.

Vergleicht man das Antwortverhalten auf Stimulation mit Bradykinin und Acetylcholin mit einem gesunden Tier (Abbildung 1 [A]), so ist hier kein nennenswerter Unterschied zu sehen.

7 der 8 kranken Tiere (88 %), aber nur 4 der 27 gesunden Schweine (15 %) zeigten eine Antwortkurve der Gruppe 1 (Tabelle 1).

Hieraus ergibt sich, dass kranke Tiere signifikant öfter als gesunde Tiere ein Antwortverhalten der Gruppe 1 mit erhöhter Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen aufwiesen ($p=0.0004$, X^2 -Test).

		B1-Antwort		
		Gruppe 0 (B1 negativ)	Gruppe 1 (B1-positiv)	gesamt
Status	gesund	23	4 (15%)	27
	krank	1	7 (88%)	8
		24	11	

Tabelle 1: Auflistung der Kinin B1 Rezeptorantwort zu Ausgangsbedingungen der beiden Versuchstiergruppen in Beziehung zum klinischen Zustand der Tiere. Kranke Tiere hatten eine signifikant höhere Rate an der Kinin B1 Antwort der Gruppe 1 als gesunde (X^2 -test: $p=0.0004$).

3.1 Spezifität des Kinin B1-Rezeptors bei Tieren der Gruppe 1

Bei drei Tieren mit vermehrter Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors (Gruppe 1) unter Ausgangsbedingungen wurde CP-0298 (Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-Bradykinin) als kompetitiver Antagonist am Kinin B1-Rezeptor mittels intravenöser Dauerinfusion in einer Dosierung von 3 µg/kg KG/min zentralvenös infundiert.

Zwei weitere Tiere mit einer vermehrten Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen (Gruppe 1) erhielten als intravenöse Bolusinjektion den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten HOE 140 in einer Dosis von 30 µg/kg KG. Bei allen Tieren wurde während und nach der Infusion bzw. Injektion der Rezeptorantagonisten die Stimulation mit desArg⁹-Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin durchgeführt.

Bei den erkrankten Tieren der Gruppe 1 kam es unter kontinuierlicher Infusion des B1-Rezeptorantagonisten Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-Bradykinin mit 3 µg/kg/min zu einem Verlust der hypotensiven kardiovaskulären Antwort auf Stimulation mit steigenden Dosen von

desArg⁹-Bradykinin; jedoch zeigte sich eine unbeeinflusste Antwort auf Bradykinin (300 ng) und Acetylcholin (500 ng) (Abbildung 2).

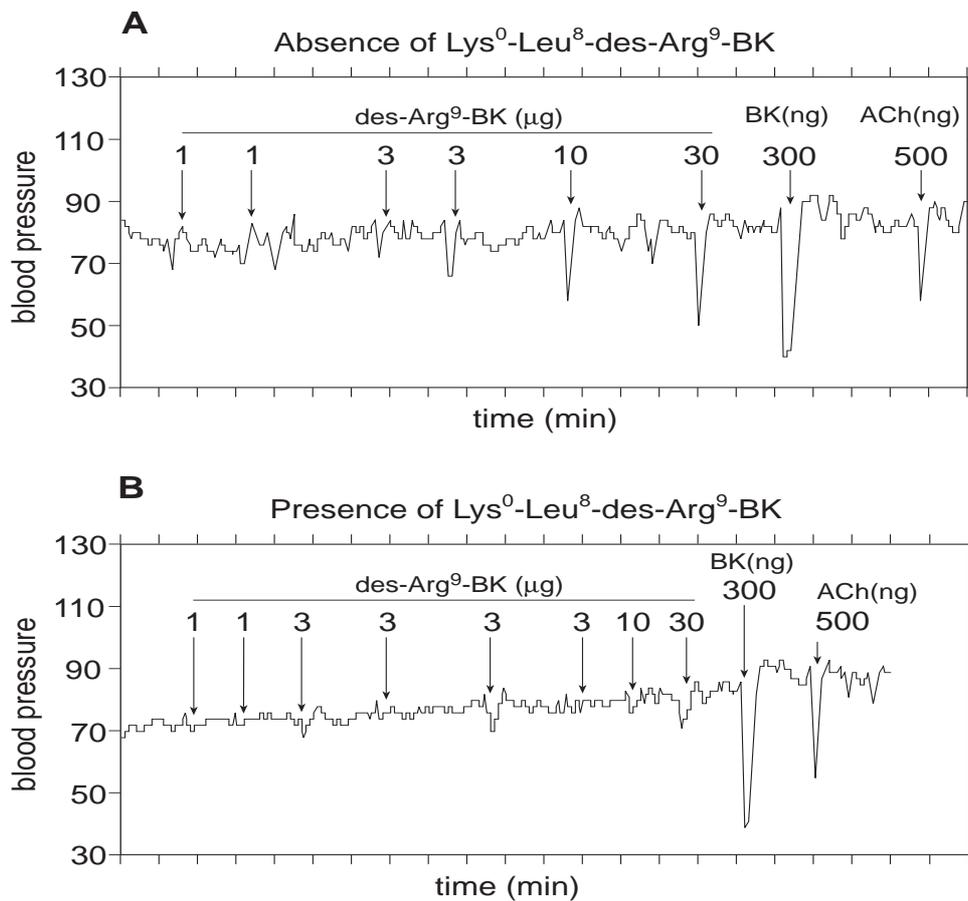


Abbildung 2 [A und B]: Typische Blutdruckantwort eines Tieres der Gruppe 1 auf Stimulation mit steigenden Dosen von desArg⁹-Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin vor [A] und nach [B] Injektion des Kinin B2 Antagonisten Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-Bradykinin (CP-0298); n=3.

Abbildung 2 zeigt die Blutdruckantwortkurve eines klinisch kranken Tieres mit erhöhter Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen (Gruppe 1) **vor** [A] und **nach** [B] Infusion des Kinin B1-Rezeptorantagonisten CP-0298 (Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-BK). Die deutliche hypotensive Antwort in [A] kann durch CP-0298 nahezu vollständig aufgehoben werden (B).

Durch Infusion des B₂-Rezeptorantagonisten HOE 140 konnte bei den Tieren der Gruppe 1 die Antwort auf die Bradykinin-Stimulation aufgehoben werden. Die Antwort auf desArg⁹-Bradykinin in steigender Dosierung blieb jedoch unbeeinflusst (Abbildung 3), sodass hier von einer vom Kinin B₁-Rezeptor vermittelten hypotensiven Antwort auszugehen ist.

Die Antwort auf Stimulation mit Acetylcholin wurde nicht beeinflusst.

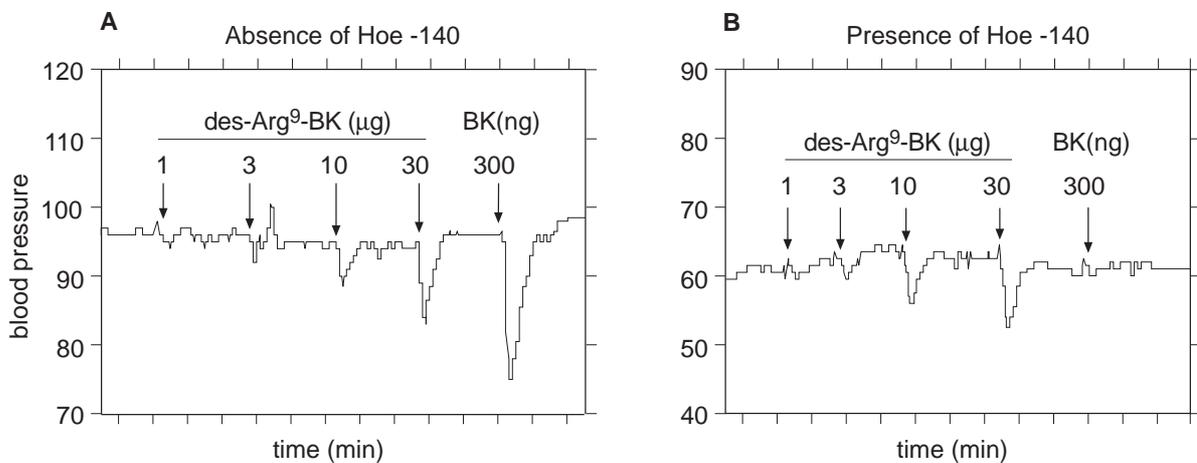


Abbildung 3: Typische Blutdruckantwort auf steigende Dosen von desArg⁹-Bradykinin und Bradykinin vor [A] und nach [B] Injektion des Kinin B₂-Rezeptorantagonisten HOE 140 (30µg i.v.) in einem Tier der Gruppe 1; n=2.

3.2 Wirkung einer LPS-Infusion bei Tieren der Gruppe 1

Drei kranken Tieren mit einer vermehrten Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen wurde LPS als Dauerinfusion mit $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ intravenös infundiert. Die Stimulation mit desArg^9 -Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin wurde danach stündlich wiederholt.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Änderung der Kinin B1-Antwort bei kranken Tieren der Gruppe 1 auch acht Stunden nach Infusion von LPS gekommen war.

3.3 Konstanz des Kinin B1-Rezeptors bei Tieren der Gruppe 0

Über einen Zeitraum von acht Stunden wurde der Verlauf der Druckantwortkurve auf Stimulation mit desArg^9 -Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin bei vier gesunden Tieren mit niedriger Stimulierbarkeit des B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen untersucht (Gruppe 0).

Hierfür bekamen die Tiere eine physiologische Kochsalzlösung über acht Stunden infundiert. Die Stimulation mit desArg^9 -Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin wurde stündlich wiederholt.

In Abbildung 4 sind die Antwortkurven zu Versuchsbeginn [A] und im Verlauf nach acht Stunden [B] dargestellt:

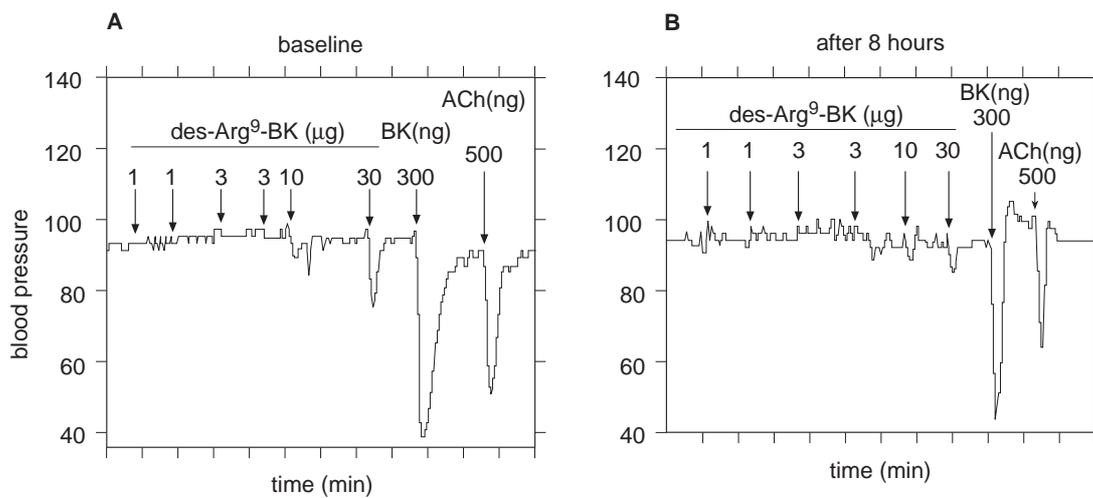


Abbildung 4: Blutdruckantwort auf steigende Dosen des Arg⁹-Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin zu Ausgangsbedingungen [A] und nach 8 Stunden [B] in einem Tier der Gruppe 0.

Die Infusion von physiologischer Kochsalzlösung über acht Stunden führte zu keiner nennenswerten Änderung der Druckantwortkurven auf Stimulation mit des Arg⁹-Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin.

3.4 Spezifität der Kinin B1-Antwort bei Tieren der Gruppe 0

Auch bei den vier gesunden Schweinen mit niedriger Stimulierbarkeit des B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen wurde die Stimulation mit 10 µg und 30 µg des Arg⁹-Bradykinin vor und während der Infusion des B1-Antagonisten Lys⁰-Leu⁸-des Arg⁹-Bradykinin (CP-0298) durchgeführt.

Nach einer Auswaschperiode von mindestens 30 Minuten nach Ende der Infusion des Bradykinin B1-Antagonisten wurde die Rückkehr der ursprünglichen B1-Antwort bestätigt und im Anschluss die Stimulation mit 10 µg und 30 µg des Arg⁹-Bradykinin wiederholt unter der Infusion des B2-Antagonisten HOE 140.

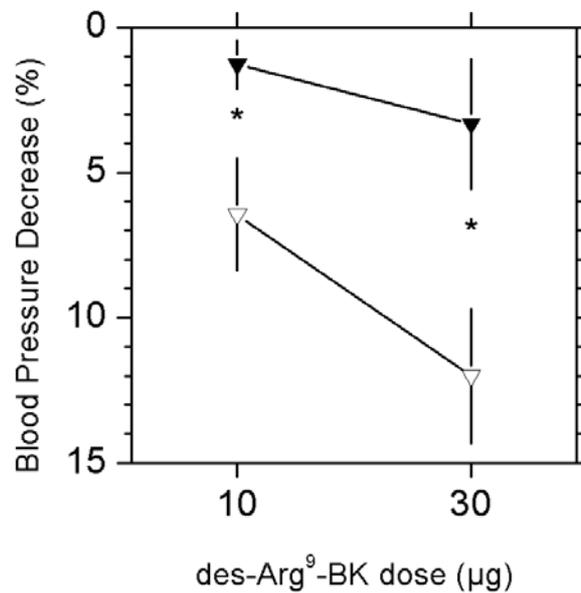


Abbildung 5: Blutdruckabfall in % des Ausgangsblutdruckes in insgesamt vier Tieren der Gruppe 0 zu 10 und 30 µg des-Arg⁹-Bradykinin vor [▽] und nach [▼] Injektion des Kinin B1-Antagonisten Lys⁰Leu⁸des-Arg⁹-Bradykinin (CP-0298) als Mittelwerte mit Standardabweichung; [*]: p<0,05 (t-Test); n=4.

Hier zeigte sich bei relativ schwachen Druckantwortkurven auf 10 µg und 30 µg des-Arg⁹-Bradykinin in vier gesunden Tieren mit einer B1-Antwort der Gruppe 0 eine noch weitere Reduktion bis hin zum kompletten Verlust der B1-Antwort durch Infusion des B1-Antagonisten Lys⁰-Leu⁸-des-Arg⁹-Bradykinin (CP-0298), aber nicht durch Infusion des B2-Antagonisten HOE 140 (Abbildung 5); p<0.05 (t-Test).

Vom Bradykinin B1-Rezeptor ist bekannt, dass er während der experimentellen, LPS-induzierten Sepsis im Schwein hochreguliert wird [Siebeck M et al. 1996].

Die Studie sollte zeigen, dass diese Hochregulation des Kinin B1-Rezeptors auch in Tieren stattfindet, die auf natürlichem Wege im Aufzuchtbetrieb eine Infektion erworben hatten.

Das Sepsismodell am Schwein wurde aufgrund der hämodynamischen und pulmonalen Reaktionen im septischen Schock verwendet, die denen des Menschen sehr ähnlich sind [Dodds A 1982].

Aus einem Versuchstierkollektiv von 35 Tieren konnten wir insgesamt 8 Tiere herausfiltern, die klinisch eine extern erworbene Infektionskrankheit aufwiesen.

Im gesunden Tier ist unter Ausgangsbedingungen der Hauptrezeptor, über den die hypotensive Antwort nach Stimulation mit einem Kinin vermittelt wird, der Kinin B2-Rezeptor. Dies konnte sowohl in dieser als auch in vorausgegangenen Studien nachgewiesen werden [Siebeck M et al. 1996].

Der Kinin B2-Rezeptor ist in den meisten Geweben vorhanden und funktionell, wohingegen der B1-Rezeptor nur in einer sehr geringen Anzahl in den unterschiedlichen Geweben vorliegt.

Somit ergibt sich bei Stimulation eines gesunden Tieres eine maximale hypotensive Antwort auf 300 ng Bradykinin, wohingegen des Arg⁹-Bradykinin auch in einer Dosis von unter 30 µg nur geringe Schwankungen der Grundlinie verursacht; bei 30 µg kommt es zu einem mäßigen Blutdruckabfall (siehe Abbildung 1).

15 % (4 von 27 Tieren) der Studientiere ohne klinisch relevante Infektion zeigten dennoch eine Antwort der Gruppe 1, der Kinin B1-Rezeptor war somit vorhanden. Hierfür könnten zwei Gründe postuliert werden:

- Es bestand möglicherweise eine subklinische Infektion, die noch nicht manifest war und so zur klinischen Klassifizierung in die Gruppe der gesunden Tiere führte;
- Eine endogene Ursache hat zur Expression des Rezeptors als Antwort auf das Trauma während des operativen Eingriffs der Versuche geführt.

Untersuchungen an gesunden Kaninchen zeigten lediglich einen Kinin B2-Rezeptor-vermittelten Blutdruckabfall ohne B1-Rezeptorantwort [Bachvarov DR et al. 1995]. Injiziert man jedoch den Tieren LPS von E. coli, so kommt es innerhalb von vier bis sechs Stunden zur Expression des Bradykinin B1-Rezeptors, ähnlich wie es unsere Arbeitsgruppe im Schweineversuch zeigen konnte.

Infundierte man jedoch kranken Tieren mit einem Antwortverhalten der Gruppe 1 zu Ausgangsbedingungen LPS als Dauerinfusion, so kam es zu keiner Änderung der Kinin B1-Antwort nach Stimulation mit des-Arg⁹-Bradykinin, Bradykinin und Acetylcholin.

Die hypotensive Antwort nach Stimulation mit desArg⁹-BK in steigender Dosierung konnte in der Gruppe 1 durch den selektiven Kinin B1-Antagonisten Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-BK, aber nicht durch den selektiven Kinin B2-Antagonisten HOE 140 aufgehoben werden, sodass hier eine B1-vermittelte hypotensive Antwort angenommen werden muss (Abbildung 3 und 4).

Im Gegensatz hierzu zeigten 88 % der als klinisch krank eingestuften Tiere eine Kinin B1-Rezeptor-vermittelte hypotensive Antwort zu Beginn des Beobachtungszeitraums. Dies wurde ebenfalls durch einen selektiven Antagonisten und Agonisten kontrolliert. Hier kam es nach Infusion des Kinin B1-Antagonisten zu einem kompletten Aufheben der hypotensiven Antwort, nicht aber nach Infusion eines Kinin B2-Antagonisten.

Beide Gruppen - gesunde wie kranke Tiere - zeigten gleiche Antwortkurven zum B2-Agonisten Bradykinin sowie zu Acetylcholin.

Diese Daten stehen im Einklang mit Rezeptorautoradiographie-Studien von SCHREMMER-DANNINGER für den Kinin B1-Rezeptor-Agonisten [³H]-desArg¹⁰-Kallidin. Hier wurde an Gefrierschnitten von Arterien zum einen gesunder Schweine, zum anderen von Tieren mit vorab bestehender Infektion und LPS-behandelter Schweine das Vorhandensein des Kinin B1-Rezeptors untersucht.

In den Arterienschnitten gesunder Schweine konnten nur vereinzelt Silberketten ohne Vorzug für eine bestimmte Gewebestruktur gefunden werden. Dies zeigt, dass unter normalen Bedingungen im gesunden Tier keine oder nur eine sehr geringe Anzahl von Kinin B1-Rezeptoren vorhanden ist.

Im Gegensatz hierzu wurde eine dreifach höhere spezifische Kinin B1-Rezeptorbindung des radioaktiv markierten Agonisten sowohl bei den natürlich kranken Tieren als auch bei den mit LPS vorbehandelten Tieren beobachtet. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in Untersuchungen ohne Endothel [Schremmer-Danninger E et al. 1996].

Allerdings ist nicht klar, ob die konstitutive Kinin B1-Rezeptor-Antwort über dasselbe Rezeptormolekül übertragen wird wie die induzierte Kinin B1-Antwort im natürlich kranken bzw. im mit LPS stimulierten Tier.

Gesunde Tiere, die in derselben Weise operativ vorbereitet wurden wie die kranken Schweine und wiederholt mit Bradykinin, desArg⁹-Bradykinin und Acetylcholin stimuliert wurden, zeigten eine stabile Antwort sowohl nach Kinin B1- als auch nach B2-Stimulation über den achtstündigen Beobachtungszeitraum (siehe Abbildung 5).

Diese Ergebnisse zeigen, dass während des Beobachtungszeitraums durch die standardisierten Versuchsbedingungen keine weitere Induktion der Kinin B1-Rezeptor-vermittelten hypotensiven Antwort in gesunden Tieren stattfindet.

Dies ist von vielfacher Bedeutung.

Während einer Infektion oder Entzündungsreaktion ist das Kallikrein-Kinin-System nachweislich beteiligt [Bhoola KD et al. 1992].

DRAPEAU konnte zeigen, dass verschiedene Mechanismen aktiviert werden, die zu einem unterschiedlichen Metabolismus von Bradykinin und Lys-Bradykinin führen, so dass deren Abbauprodukte desArg⁹-Bradykinin und Lys-desArg⁹-Bradykinin entstehen, welche wiederum als selektive Kinin B1-Rezeptoragonisten wirken [Drapeau G et al. 1991].

Aktiviert neutrophile Granulozyten können zur Dysfunktion des endothelialen Angiotensin Converting Enzyms (ACE) führen. Kinine werden überwiegend über die Aktivierung des ACE und der Carboxypeptidase abgebaut, so dass es zur Anreicherung der B1-Rezeptoragonisten desArg⁹-Bradykinin und Lys-desArg⁹-Bradykinin kommt. Darüber hinaus führen auch bestimmte Noxen wie LPS von *E. coli* zu einer Zytokininformation wie z.B. Interleukin 1, das ebenfalls zur Hochregulation des Kinin B1-Rezeptors führt [Bouthillier J et al. 1987].

Schanstra konnte zeigen, dass die Hochregulation der Gen-Expression des menschlichen Kinin-B1-Rezeptors durch den Transkriptionsfaktor NF-κB geregelt wird. Der Nachweis

einer homologen Hochregulation scheint ein entscheidender neuer Gesichtspunkt der Kininrezeptoren zu sein. Seine Beobachtung zeigt einen weiteren Unterschied in der Genexpression des Kinin B1- und B2-Rezeptors [Schanstra JP et al. 1998]. Der Kinin B2-Rezeptor wird durch eine verlängerte Inkubation mit seinen Agonisten down reguliert [Praddaude F et al. 1995], was höchstwahrscheinlich durch eine Wiederaufnahme des Rezeptors in die Zelle bewirkt wird [Austin CE et al. 1997]. Unter inflammatorischen Bedingungen wird der Kinin B1-Rezeptor hochreguliert und die Produktion von NF κ B und IL-1 β stimuliert [Pan ZK et al. 1996]. Eine verlängerte Kinin B2-Rezeptorstimulation durch inflammatorische Stimuli könnte *in vivo* zu einer Induktion der Kinin B1-Rezeptoren führen. Dieser Effekt konnte durch den Kinin B1-Agonisten desArg¹⁰-Kallidin noch verstärkt werden [Schanstra JP et al. 1998].

PHAGOO et al. 1999 zeigte, dass die Autoregulation der Kinin-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Reaktionen spielt. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktionen kommt es zur Anreicherung von Bradykinin und Kallidin sowie deren Spaltprodukte desArg⁹-Bradykinin und desArg¹⁰-Kallidin, die durch die Aktivität der Carboxypeptidase N und M (Kininase I) entstehen. Die Inkubation der Lungenfibroblasten mit Bradykinin führte zu einem raschen Abfall der Kinin B2-Rezeptoren auf etwa 10 % des Ausgangswertes nach wenigen Minuten. Die Anzahl der Kinin B1-Rezeptoren hingegen stieg zeitverzögert um das zwei- bis dreifache an. Die Inkubation mit desArg¹⁰-Kallidin zeigte keinen Effekt auf den Kinin B2-Rezeptor, jedoch nahm die Dichte des Kinin B1-Rezeptors um das drei- bis vierfache zu.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der hier vorliegenden Studie zum ersten Mal gezeigt wurde, dass der Kinin B1-Rezeptor bei kranken Schweinen vorhanden und funktionell ist, die ihre Krankheit unter natürlichen Bedingungen in der Versuchstierzucht ohne vorherigen Kontakt zum Labor erworben hatten.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Theorie, dass es auf der Rezeptorebene des Kallikrein-Kinin-Systems zu wesentlichen Veränderungen während der inflammatorischen Entzündungsreaktion kommt.

Darüber hinaus zeigte diese Studie, dass die experimentelle Induktion des Kinin B1-Rezeptors durch die Gabe von LPS im Tierexperiment – die in unserer Arbeitsgruppe seit langem angewandt wird – vergleichbar ist mit einer natürlich erworbenen Krankheit, so dass hier ein valides Modell der LPS-induzierten Sepsis vorliegt.

Es erfordert noch weitere Studien, um herauszufinden, ob eine Hemmung oder Aktivierung des Bradykinin B1-Rezeptors nun eher nützlich oder schädlich ist, um die sepsisinduzierte Hypotension respektive das Multiorganversagen abzuschwächen oder zu verhindern. Die kombinierte Blockade des Kinin B1- und B2-Rezeptors erbrachte keinen Benefit in Hinblick auf das Überleben der Sepsis, wie wir in einer Studie unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten [Siebeck M et al. 1996].

Entscheidend könnte hier für die Entwicklung von Therapieoptionen die weitere Erforschung der Rezeptorregulation auf Transkriptionsebene sein. So ist der Transkriptionsfaktor NF κ B an der Aktivierung verschiedener inflammatorischer Gene beteiligt. Er wird im Zytoplasma der meisten Zellen gefunden. In ruhenden Zellen liegt er zunächst als inaktiver Komplex vor [Baeuerle PA 1998].

Versteht man diese regulativen Mechanismen der Kinin B1-Rezeptorgene, können in Zukunft möglicherweise Therapien gegen die sepsisinduzierte Hypotension und das Multiorganversagen entwickelt werden, die auf der Ebene der Genregulation und Rezeptorexpression angreifen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als wichtige Mediatoren der akuten und chronischen Entzündungsreaktion gelten Bradykinin und seine Derivate. Als Rezeptoren dieser Kinine sind der Kinin B2- und B1-Rezeptor bekannt. Der B1-Rezeptor ist im gesunden Tier nicht oder nur in sehr geringer Anzahl vorhanden, kann jedoch tierexperimentell durch Injektion von Lipopolysacchariden der Bakterienzellwand expremiert und hochreguliert werden.

Ziel dieser Arbeit war der Beweis einer Kinin B1-Rezeptorhochregulation im Rahmen der inflammatorischen Antwort bei Schweinen, die unter natürlichen Bedingungen eine das Immunsystem alternierende Infektion erworben hatten.

In der hier vorliegenden Studie wurde die kardiovaskuläre Antwort auf Stimulation mit desArg⁹-BK, BK und ACh gesunder Schweine mit der Reaktion von Schweinen verglichen, die klinisch krank aus dem Aufzuchtbetrieb in das Labor kamen.

Eine erhöhte Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen (Gruppe 1) wiesen 88% der nach standardisierter klinischer Untersuchung als krank diagnostizierten Schweine auf, die Druckantwortkurven auf Stimulation mit BK und ACh waren unverändert. Im Gegensatz hierzu zeigten nur 15% der als klinisch gesund eingestuften Tiere eine vermehrte Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors zu Versuchsbeginn ($p=0,00004$). Das Antwortverhalten konnte in jeder Gruppe durch Infusion der selektiven Kinin B2- und B1-Rezeptorantagonisten (HOE 140, Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-BK) als rezeptorspezifisch nachgewiesen werden. Die Infusion physiologischer Kochsalzlösung über acht Stunden bei Tieren mit niedriger Stimulierbarkeit des Kinin B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen führte zu keinerlei Änderung der Druckantwort, sodass hier die Konstanz des Kinin B1-Rezeptors gezeigt wurde. Bei Tieren mit erhöhter Stimulierbarkeit des B1-Rezeptors unter Ausgangsbedingungen kam es unter Dauerinfusion des Kinin B1-Rezeptorantagonisten CP-0298 (Lys⁰-Leu⁸-desArg⁹-BK) zu einem Verlust der kardiovaskulären Antwort. Die Infusion des Kinin B2-Rezeptorantagonisten HOE 140 beeinflusste die Druckantwort auf steigende Dosen von desArg⁹-BK nicht, sodass die Spezifität der sepsisinduzierten B1-Hochregulation bewiesen werden konnte.

Somit wurde in der hier vorliegenden Studie zum ersten Mal nachgewiesen, dass der im gesunden Tier nicht oder nur in sehr geringer Anzahl vorhandene Kinin B1-Rezeptor nachgewiesen und funktionell hochreguliert wird, sobald sich die Schweine mit einer

Infektion im Aufzuchtberieb auseinander gesetzt hatten. Die tierexperimentell induzierte Sepsis nach LPS-Injektion mit Hochregulation des Kinin B1-Rezeptors konnte hiermit als valides Modell der systemischen, durch bakterielle Lipopolysaccharide induzierte Entzündungsreaktion bestätigt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aasen AO, Buo L (1991)

Activation of humoral systems: coagulation, fibrinolysis and plasma kallikrein activation.

Schlag G (Hrsg.): Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure

Akbary AM, Wirth KJ, Schoelkens BA (1996)

Efficiency and tolerability of Icatiband (HOE 140) in patients with moderately sepsis.

Immunopharm 1996, 33 (1-3): 238-42

Aramori I, Zenkoh J, Morikawa N, O'Donnell N, Asano M, Nakamura K, Iwami M, Kojo H, Notsu Y (1997)

Novel subtype-selective nonpeptide bradykinin receptor antagonists FR 167344 and FR 173657.

Mol Pharm 1997, 51 (2): 171-6

Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelerie F, Thomas D, Hay RT (1995)

Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B.

Mol Cell Biol 1995, 15(5):2689-96

Austin CE, Faussner A, Robinson HE, Chakravarty S, Kyle DJ, Bathon JM, Proud D (1997)

Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways.

J Biol Chem 1997, 272 (17): 11420-5

Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivee JF, Levesque L, Rioux F, Drapeau G, Marceau F (1995)

Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor.

J Pharmacol Exp Ther 1995, 275(3): 1623-30

Baeuerle PA (1998)

Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF-kappa B puzzle?

Curr Biol 1998, 8 (1): R19-22 Review

Baldwin AS (1996)

The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.

Annu Rev Immunol 1996, 14: 649-83

Barnes PJ, Adcock IM. (1993)

Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms.

Trends Pharmacol Sci 14: 436-41

- Bascands JL, Pecher C, Girolami (1993)
Indirect inhibition by bradykinin of cyclic AMP generation isolated rat glomeruli and mesangial cells.
Mol Pharmacol 1993, 44 (4): 818-26
- Bartels H, Zantl N, Holzmann B (1998)
Spezielle Therapieansätze zur Durchbrechung der Kaskade – Von SIRS zu MODS.
Langenbecks Arch Chir 1998, Suppl. II: 615-18
- Bathon JM, Proud D (1991)
Bradykinin antagonists.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1991, 31: 129-62
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992)
Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens and kininases.
Pharm Rev 1992, 44 (1): 1-63
- Bhoola KD, Elson CJ, Dieppe PA (1992a)
Kinins: key mediators in inflammatory arthritis?
Br J Rheumatol 1992, 31: 509-18
- Blaukat A, Herzer K, Schroeder C (1999)
Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtyp-specific phosphorylation.
Biochem 1999, 38: 1300-9
- Bone RC (1992)
Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.
Chest 1992, 101(6): 1644-55
- Bone RC (1996)
Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS.
Crit Care Med 1996, 24 (7): 1125-1128
- Bonner G, Preis S, Schunk U, Toussaint C, Kaufmann W (1990)
Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans.
J Cardiovasc Pharmacol 1990, 15 Suppl 6: S46-56
- Bouthillier J, Deblois D, Marceau F (1987)
Studies on the induction of pharmacological responds to desArg⁹-Bradykinin in vitro and in vivo.
Br J Pharmacol 1987, 92: 257-64

Cadena dela RA, Majluf-Cruz A, Stadnicki A, Agosti JM, Colman RW, Suffredini A (1996)

Activation of the contact and fibrinolytic systems after intravenous administration of endotoxin to normal human volunteers: correlation with the cytokine profile.

Immunopharmacol 1996 Jun;33(1-3): 231-7

Campos MM, Souza GE, Calixto JB (1996)

Upregulation of B1 receptor mediating des-Arg9-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin.

Br J Pharmacol 1996, 117(5): 793-8

Cendan JC, Moldawer LL, Souba WW, Copeland EM, Lind DS (1994)

Endotoxin-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is regulated by cytokines.

Arch Surg 1994, 129(12): 1296-300

Chang CK, Lianes S, Schumer W (1999)

Nuclear factor kappa B.

J Surg Res 1999, 82: 294-299

Colman RW (1969)

Activation of plasminogen by human plasma kallikrein.

Biochem Biophys Res Commun 1969, 35: 273-9

Colman RW (1984)

Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system.

J Clin Invest 1984, 73(5): 1249-53

Davies MG, Hagen PO (1997)

Systemic inflammatory response syndrome.

Br J Surg 1997, 84(7): 920-35

Dodds WJ (1982)

The pig model for biomedical research.

Fed Proc 1982, 41: 247-56

Drapeau G, Chow A, Ward PE (1991)

Metabolism of bradykinin analogs by angiotensin I converting enzyme and carboxypeptidase N.

Peptides 1991, 12: 631-8

Drummond GR, Cocks TM (1995)

Endothelium-dependent relaxation to the B1 kinin receptor agonist des-Arg9-bradykinin in human coronary arteries.

Br J Pharmacol 1995 Dec;116(8): 3083-5

- Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H (1995)
Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure.
Hepatology 1995, 21 (6): 1632-9
- Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H (1997)
Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury.
Shock 1997, 7 (2): 90-6
- Farmer SG, Burch RM, Meeker SA, Wilkins DE (1989)
Evidence for a pulmonary B3 bradykinin receptor.
Mol Pharmacol 1989, 36(1):1-8
- Farmer SG, DeSiato MA (1994)
Effects of a novel nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist on intestinal and airway smooth muscle: further evidence for the tracheal B3 receptor.
Br J Pharmacol 1994, 112(2): 461-4
- Fujikawa K, Heimark RL, Kurachi K, Davie EW (1980)
Activation of bovine factor XII (Hageman factor) by plasma kallikrein.
Biochemistry 1980, 19(7): 1322-30
- Galanos C, Luderitz O, Westphal O (1969)
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides.
Eur J Biochem 1969, 9(2): 245-9
- Gobeil F, Neugebauer W, Filteau C, Jukic D, Allogho SN, Pheng LH, Nguyen-Le XK, Blouin D, Regoli D (1996)
Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists.
Hypertension 1996, 28(5): 833-9
- Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, Barclay GR, Jackson RE, Grant IS, Ramsay G, Blyth AS, Howie JC (1995)
Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group.
JAMA 1995, 274(2): 172-7
- Hall JM (1992)
Bradykinin receptors.
Gen Pharmacol 1997, 28 (1): 1-6

- Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle P (1993)
Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B.
Nature 1993 Sep 9;365(6442): 182-5
- Hess JF, Borkowski JA, Young GS (1992)
Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK 2) receptor.
Biochem Biophys Res Comm 1992, 184: 260-8
- Hilton SM, Torres SH (1970)
Selective hypersensitivity to bradykinin in salivary glands with ligated ducts.
J Physiol 1970, 211(1): 37-48
- Janosch P, Schellerer M, Seitz T, Reim P, Eulitz M, Brielmeier M, Kolch W, Sedivy JM, Mischak H (1996)
Characterization of IkappaB kinases. IkappaB-alpha is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate.
J Biol Chem 1996, 271(23): 13868-74
- Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S, Pober JS (1996)
A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells.
J Biol Chem 1996, 271(27): 16317-22
- Ledebur HC, Parks TP (1995)
Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers.
J Biol Chem 1995, 270 (2): 933-43
- Marceau F (1995)
Kinin B1 receptors: A review.
Immunopharmacol 1995, 30: 1-26
- Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994)
Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor.
J Biol Chem 1994, 269 (34): 21583-6
- Mohlen von der MA, van Deventer SJ, Levi M, van den Ende B, Wedel NI, Nelson BJ, Friedmann N, ten Cate JW 1995
Inhibition of endotoxin-induced activation of the coagulation and fibrinolytic pathways using a recombinant endotoxin-binding protein (rBPI23).
Blood 1995, 85(12): 3437-43

Navarrete-Navarro P, Rodriguez A, Reynolds N, West R, Habashi N, Rivera R, Chiu WC, Scalea T (2001)

Acute respiratory distress syndrome among trauma patients: trends in ICU mortality, risk factors, complications and resource utilization.

Intensive Care Med 2001, 27(7): 1133-40

Ni A, Chao L, Chao J (1998)

Transcription factor nuclear factor kappa B regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation.

J Biol Chem 1998, 273 (5): 2784-91

Ohtsuka T, Kubota A, Hirano T, Watanabe K, Yoshida H, Tsurufuji M, Iizuka Y, Konishi K, Tsurufuji S (1996)

Glucocorticoid-mediated gene suppression of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, through impairment of NF-kappa B activation.

J Biol Chem 1996, 271(3): 1651-9

Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC (1996)

Bradykinin stimulates NF kappa B activation and Interleukin-1 beta gene expression.

J Clin Invest 1996, 98 (9): 2042-9

Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM (1999)

Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts.

Mol Pharmacol 1999, 56(2): 325-33

Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E (1993)

Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality.

Chest 1993, 103(2): 565-75

Praddaude F, Tack I, Emond C, Bascands JL, Girolami JP, Tran-Van T, Regoli D, Ader JL.

In vivo and in vitro homologous desensitization of rat glomerular bradykinin B2 receptors.

Eur J Pharmacol 1995, 294(1): 173-82

Proud D, Kaplan AP (1988)

Kinin formation: mechanisms and role of inflammatory disorders.

Annu Rev Immunol 1988, 6: 49-83

Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ (1998)

Bradykinin receptors and their antagonists.

Eur J Pharmacol 1998, 348: 1-10

- Quezado ZM, Natanson C (1992)
Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock.
Am J Kidney Dis 1992, 20(3): 214-22
- Regoli D, Barabe J (1980)
Pharmacology of bradykinin and related kinins.
Pharm Rev 1980, 32 (1): 1-43
- Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE (1993)
Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis.
Can J Physiol Pharmacol 1993, 71 (8): 556-67
- Regoli D, Marceau F, Barabe J (1978)
De novo formation of vascular receptors for bradykinin.
Can J Physiol Pharmacol 1978, 56: 674-7
- Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, Sawutz DG (1994)
Bradykinin receptor types and B2 subtypes.
Life Sci 1994;55(10): 735-49
- Rhaleb N, Rouissi N, Jukic D, Regoli D (1992)
Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist.
Eur J Pharmacol 1992, 210: 115-20
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL (1998)
The B1-agonist [desArg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappa B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts.
J Clin Invest 1998, 101 (10): 2080-91
- Scherrer D, Daeffler L, Trifilieff A, Gies JP (1995)
Effects of WIN 64338, a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, on guinea-pig trachea.
Br J Pharmacol 1995, 115(7): 1127-8
- Schmid A, Eich-Rathfelder S, Whalley ET, Cheronis JC, Scheuber HP, Fritz H, Siebeck M (1998)
Endogenous B1 receptor mediated hypotension produced by contact system activation in the presence of endotoxemia.
Immunopharmacol 1998; 40(2): 131-7

Schremmer-Danninger E, Offner A, Siebeck M, Heinz-Erian P, Gais P, Roscher AA (1996)

Autoradiographic visualization of B1 bradykinin receptor in porcine vascular tissue in the presence or absence of inflammation.

Immunopharmacol 1996, 33: 95-100

Siebeck M, Spannagl E, Schorr M (1996)

Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock

Immunopharmacol 1996, 33: 81-4

Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE (1989)

The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin.

N Engl J Med 1989, 321(5): 280-7

Suffredini AF, Shelhamer JH, Neumann RD, Brenner M, Baltaro RJ, Parrillo JE (1992)

Pulmonary and oxygen transport effects of intravenously administered endotoxin in normal humans.

Am Rev Respir Dis 1992, 145(6):1398-403

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC (1993)

NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway.

Science 1993 Mar 26;259(5103): 1912-5 Related Articles, Links

Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ (1988)

A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis.

J Biol Chem 1988, 263(27): 13479-81

Velasco M, Diaz-Guerra MJ, Martin-Sanz P, Alvarez A, Bosca L (1997)

Rapid Up-regulation of IkappaBbeta and abrogation of NF-kappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide.

J Biol Chem 1997, 272(37): 23025-30

Wachtvogel YT, Cadena de la RA (1993)

Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system.

Thromb Res 1993, 72 (1): 1-21

Warren HS (1997)

Strategies for the treatment of sepsis.

N Engl J Med 1997, 336 (13): 952-53

Wiggins RC (1983)

Kinin release from high molecular weight kininogen by the activation of Hageman factor.

J Biol Chem 1983, 258 (14): 8963-70

Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J (1991)

HOE 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vivo studies.

Br J Pharmacol 1991, 102 (3): 774-7

Wirth KJ, Heitsch H, Scholkens B (1995)

Kinin receptor antagonists: unique probes in basic and clinical research.

Can J Physiol Pharmacol 1995, 73 (7): 797-804

7 LEBENS LAUF

Name: Markus Hans Albert LEHNER
 Geburtsdatum: 14.11.1971
 Geburtsort: München
 Familienstand: verheiratet
 Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung: 1978 – 1982 Grundschule, München Neuhausen
 1982 – 1991 Adolf-Weber-Gymnasium, München
 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 1991 – 1992 Dr. v. Haunersches Kinderspital

Hochschulstudium: 1992 – 1999 Studium der Humanmedizin an der
 Ludwig-Maximilians-Universität München

- Herbst 1995 Ärztliche Vorprüfung
 - Herbst 1996 1. Staatsexamen
 - Herbst 1998 2. Staatsexamen
 - Herbst 1999 3. Staatsexamen

Approbation: 01.06.2001

Berufstätigkeit: 1999 – 2001 Arzt im Praktikum
 Kinderchirurgische Klinik der LMU
 Dr. v. Haunersches Kinderspital
 Direktor: Prof. Dr. med. I. Joppich

Seit Juni 2001 Assistenzarzt
 Kinderchirurgische Klinik der LMU
 Dr. v. Haunersches Kinderspital
 Direktor: Prof. Dr. med. I. Joppich,
 seit 01.04.03: Prof. D. v. Schweinitz

Seit Juli 2003 Kindernotarzt
 im Rahmen des Notarzdienstes
 der Berufsfeuerwehr München

Herrn Prof. Dr. med. M. Siebeck danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung der Arbeit, insbesondere für die Beratung und Diskussion bei der Auswertung der Versuche.

Frau Dr. med. S. Eich-Rathfelder und Herrn Dr. med. E. Spannagl danke ich für die Einarbeitung in die experimentelle Arbeitsweise.

Frau T. Schorr, Herrn Dr. med. A. Schmid und Herrn Dr. med. Moutasem Daoud-Ghadieh danke ich für die tatkräftige Assistenz bei den Versuchen und für die Eingabe der Daten in den Computer.

Schließlich danke ich meiner Ehefrau für die praktischen Tipps und Anregungen sowie für die Durchsicht des Manuskripts.