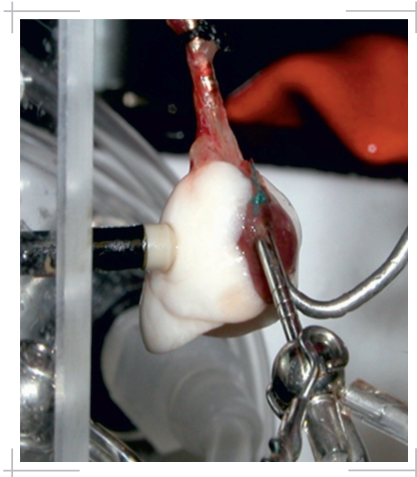


Einfluss von Kohlenmonoxid und Carbon Monoxide-Releasing Molecules auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2024

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2024

© 2024 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Einfluss von Kohlenmonoxid und *Carbon Monoxide-Releasing Molecules* auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Patricia Albus-Krieger

geb. Albus
aus Bad Nauheim

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Exzellenzcluster Kardio-Pulmonales System

Gutachter: Prof. Dr. Natascha Sommer

Gutachter: Prof. Dr. Konstantin Mayer

Tag der Disputation: 18. April 2024

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	1
1.2	Medizinische Bedeutung der HPV	2
1.3	Pulmonale Hypertonie (PH)	3
1.3.1	Definition der PH	3
1.3.2	Ätiologie und Pathogenese der PH	3
1.3.3	Klassifikation der PH	4
1.3.4	Aktuelle medikamentöse Therapieoptionen der PAH	6
1.4	Sauerstoffsensoren und Mediatoren der HPV: Stand der Forschung	7
1.4.1	Mitochondrien	8
1.4.2	Hämoxigenase und Cytochrom P450 (CYP450)	8
1.4.3	Mediatoren	9
1.5	Sauerstoffsensoren und Mediatoren in der HPV: Aktuelle Ansatzpunkte	10
1.5.1	Cytochrome als Sauerstoffsensoren	10
1.5.1.1	Mitochondriale Cytochrome (Atmungskette)	10
1.5.1.2	CYP450	11
1.5.2	CO als Mediator	11
1.5.2.1	Beschreibung und Rolle als mögliches Therapeutikum	11
1.5.2.2	Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CORMs)	13
1.5.2.3	Angriffspunkte von CO	15
1.5.2.4	Auswirkungen von CO auf die HPV	16
1.5.2.5	Auswirkungen von CO auf die PH	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Tierversuchsgenehmigung	18
2.2	Versuchstiere	18
2.3	Materialien	18
2.3.1	Geräte	18
2.3.2	Software	19
2.3.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.3.4	Präparationsmaterialien	20
2.3.5	Pharmaka, Chemikalien und Gase	20
2.4	Isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge	21
2.4.1	Einführung	21

2.4.2	Versuchsaufbau	22
2.4.3	Systeminstandhaltung	24
2.4.4	Narkose und Intubation	25
2.4.5	Präparation des Herz- Lungen-Pakets	26
2.4.6	Steady-state-Phase	27
2.4.7	Einschlusskriterien	28
2.4.8	Druck- und Gewichtsregistrierung	28
2.4.9	Applikation von CO	28
2.4.10	Sicherheitsvorkehrungen	29
2.5	Remissionsspektrometrie	29
2.5.1	Grundlagen der Remissionsspektrometrie	29
2.5.2	Messung der Redox-Zustände	30
2.5.3	Experimentelle Vorgehensweise	31
2.5.4	Störfaktoren	32
2.6	Verwendete Substanzen und Applikationsmodi	33
2.6.1	Substanzen	33
2.6.1.1	CO	33
2.6.1.2	Sulfaphenazole	33
2.6.1.3	U-46619	33
2.6.1.4	KCl	33
2.6.1.5	[RU(CO) ₃ Cl ₂] ₂ (CORM-2)	33
2.6.1.6	Ru(CO) ₃ Cl(glycinate) (CORM-3)	34
2.6.2	Versuchsgruppen	34
2.6.3	Versuchsablauf	35
2.6.3.1	Kontrollversuche mit hypoxischer Beatmung	36
2.6.3.2	Versuche mit CO	36
2.6.3.3	Kontrollversuche mit U-46619	36
2.6.3.4	Kontrollversuche mit KCl	37
2.6.3.5	Versuche mit Sulfaphenazole	38
2.6.3.6	Versuche mit CORMs	38
2.6.3.7	Versuche zur Analyse der CO-Freisetzung durch die CORMs	39
2.7	Auswertung der Parameter	40
2.8	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Einfluss von CO auf den pulmonalen Gefäßtonus	41
3.1.1	Einfluss von CO auf den pulmonalvaskulären Gefäßtonus während normoxischer und hypoxischer Ventilation	41

3.1.2	Wirkung von CO auf die durch U-46619- und KCl-induzierten Vasokonstriktion	42
3.1.3	Vergleich zu der Wirkung von Sulfaphenazole auf den pulmonalen Gefäßtonus	43
3.2	Wirkung von CORMs auf den pulmonalvaskulären Tonus	43
3.2.1	Freisetzung von CO durch die CORMs in hämoglobinhaltigem Perfusat	43
3.2.2	Einfluss von CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus in erythrozytenfreier Pufferlösung	46
3.2.3	Einfluss von CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus in erythrozytenhaltiger Pufferlösung	51
3.3	Einfluss von CO und CORMs auf die Remissionsspektren des CYP450 und der mitochondrialen Cytochrome	54
3.3.1	Einfluss des inhalativen CO	54
3.3.2	Einfluss von CORMs auf CYP450 und mitochondriale Cytochrome	59
4	Diskussion	61
4.1	Wirkung von CO	61
4.1.1	Einfluss von CO auf den pulmonalen Gefäßtonus	62
4.1.2	Auswirkung von CO auf CYP450 und mitochondriale Cytochrome	63
4.2	Wirkung von CORM-2 und CORM-3	65
4.2.1	<i>In vitro</i> Messungen zur CO-Freisetzung durch CORM-2 und CORM-3	66
4.2.2	Wirkung von CORM-2 und CORM-3 in der blutfrei gespülten, isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge	66
4.2.3	Wirkung von CORM-2 und CORM-3 in der isolierten, mit erythrozytenhaltigem Perfusat perfundierten Mauslunge	68
4.2.4	Einfluss von CORMs auf die Cytochrome	69
4.3	Diskussion zur Methodik	69
5	Ausblick	71
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Literaturverzeichnis	77
9	Abkürzungsverzeichnis	94

10	Abbildungsverzeichnis	99
11	Tabellenverzeichnis	102
12	Anhang	103
12.1	Publikationen	103
12.1.1	Originalarbeiten	103
12.2	Erklärung zur Dissertation	104
12.3	Danksagung	105
12.4	Tabellarischer Lebenslauf	106

1 Einleitung

1.1 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Die HPV bezeichnet einen essentiellen physiologischen Mechanismus zur Optimierung des Gasaustausches in der Lunge. Sie ist die Antwort der Lungengefäße auf eine Abnahme des alveolären Sauerstoffpartialdrucks (alveoläre Hypoxie) und passt die regionale Lungendurchblutung an die bestehende alveoläre Ventilation an, indem der Blutfluss von Arealen mit niedrigem alveolären Sauerstoffpartialdruck (pO_2) umgeleitet wird in Areale mit besserer Sauerstoffverfügbarkeit^{1,2}. Alveoläre Hypoxie bedingt dabei eine Konstriktion der präkapillären, teilmuskularisierten Arteriolen. Diese Konstriktion ermöglicht die Einschränkung der Durchblutung schlecht ventilierter Lungenabschnitte und die Umleitung des Blutstroms in besser ventilerte Areale, wodurch die arterielle Oxygenierung optimiert wird³. 1946 wurde durch Ulf von Euler und Göran Liljestrand zum ersten Mal postuliert, dass die HPV der Verbesserung der Ventilations-Perfusions-Verteilung dient, weswegen die HPV auch „Euler-Liljestrand-Mechanismus“ genannt wird⁴.

Die zu Grunde liegenden Mechanismen der HPV sind bislang nicht vollständig geklärt, jedoch konnte durch verschiedenste Beobachtungen eine genauere Charakterisierung der HPV vorgenommen werden⁵. In *in vivo* Studien und an explantierten Lungen verschiedener Spezies konnte herausgefunden werden, dass die HPV bereits ab einer milden Hypoxie beginnt, in Kaninchenlungen bei einer alveolären O_2 -Konzentration $\leq 10\%$ (pO_2 75 mmHg)^{6,7}. In *in vivo* Studien konnte sie ab einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) von 0,12-0,15 unter atmosphärischem Druck ausgelöst werden⁸⁻¹⁰. In den meisten Untersuchungen an Ratten und Mäusen konnte, ähnlich wie beim Menschen, ein biphasischer Verlauf der HPV beobachtet werden. Es konnte zwischen zwei unterschiedlichen, von der Dauer der Hypoxie abhängigen Phasen unterschieden werden, einer akuten Vasokonstriktion, die sich nach wenigen Sekunden der Hypoxie einstellt und ein Druckmaximum nach ca. 5 Minuten aufweist und nach weiteren 5-15 Minuten wieder teilweise nachlässt, sowie eine subakute oder protrahierte Vasokonstriktion, die bei Anhalten der Hypoxie nach Minuten bis Stunden auftritt. Möglicherweise existiert noch eine 3. Phase, die mit einer Augmentation der protrahierten Vasokonstriktion einhergeht. Diese hat aber weniger investigative Aufmerksamkeit erlangt¹¹.

Bei anhaltender genereller alveolärer Hypoxie führt der Mechanismus der HPV zum Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes und gemeinsam mit dem *Remodeling* der Gefäße (s.u.), zur Entwicklung der pulmonalen Hypertonie.

1.2 Medizinische Bedeutung der HPV

Eine Dysregulation der HPV unter pathophysiologischen Bedingungen kann in zwei Richtungen geschehen, die unterschiedliche Auswirkungen auf den Körper haben. Aus einer Beeinträchtigung der HPV, wie sie z.B. im Zuge einer Pneumonie auftritt, kann eine verminderte Oxygenierung des arteriellen Blutes resultieren. Obwohl die betroffenen Areale der Lunge schlecht ventiliert werden, sind sie also bei Ausfall der HPV immer noch gut perfundiert, wodurch das pulmonalkapilläre Blut vermindert mit Sauerstoff angereichert wird. Im Extremfall kommt es zu einem Shuntfluss in den betroffenen Arealen, wodurch die systemische arterielle Oxygenierung durch dessen Beimengung vermindert wird. Bei Sepsispatienten kann die durch den Shuntfluss bedingte Hypoxämie zu lebensbedrohlichen Zuständen führen^{12, 13}. Eine Verschlechterung der HPV wird außerdem auch im Zusammenhang mit dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS)¹⁴, der Leberzirrhose¹⁵ oder auch während einer Narkose¹⁶ beschrieben.

Anders verhält es sich bei Erkrankungen im Zuge derer es, z.B. durch eine Beeinträchtigung der respiratorischen Funktion, zu einer globalen, prolongierten alveolären Hypoxie kommt (dies ist auch der Fall bei längerem Aufenthalt in großen Höhen). Zu diesen Erkrankungen zählen u.a. „*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*“ (COPD), interstitielle Lungenerkrankungen und neurologische Erkrankungen. Hierbei kommt es zu einer generalisierten HPV, die, wenn sie länger bestehen bleibt, schließlich zusammen mit einem „*Remodeling*“ der pulmonalen Widerstandsgefäße zur pulmonalen Hypertonie führt. Dieses sogenannte *Remodeling* besteht aus einer Hypertrophie und teilweise auch Hyperplasie aller drei Schichten der Gefäße. Dies wiederum hat eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands zufolge und, als Konsequenz, eine anhaltende pulmonale Hypertonie (s.u.). Aus der erhöhten Nachlast resultiert eine extreme Druckbelastung des rechten Ventrikels, der dann hypertrophiert. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Rechtsherzinsuffizienz und zum sogenannten „*Cor pulmonale chronicum*“, welches bei Dekompensation zum Tode führen kann¹⁷.

Die Aufdeckung des pulmonalen Sauerstoffsensormechanismus, welcher der HPV zu Grunde liegt, würde also neue Möglichkeiten der Beeinflussung einer beeinträchtigten HPV eröffnen,

aber auch zur Entwicklung eines neuen Ansatzes in der medikamentösen Therapie der HPV bedingten pulmonalen Hypertonie beitragen.

1.3 Pulmonale Hypertonie (PH)

1.3.1 Definition der PH

Eine pathologische Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßsystem (pulmonale Hypertonie, PH) wurde bisher definiert durch einen invasiv gemessenen mittleren pulmonalarteriellen Druck (mPAP) ≥ 25 mmHg in Ruhe¹⁸. Auf dem *6th World Symposium on Pulmonary Hypertension (WSPH)* in Nizza 2018 wurde jedoch eine neue Definition der PAH vorgeschlagen, die die Senkung der Obergrenze des normalen mPAP von 24 mmHg auf 20 mmHg beinhaltet¹⁹. Somit wäre die PH dann definiert als ein mPAP > 20 mmHg. Die therapeutische Relevanz dieser Definition ist allerdings noch unklar.

1.3.2 Ätiologie und Pathogenese der PH

Vernachlässigt man die sogenannte postkapilläre pulmonale Hypertonie, die durch einen Anstieg des Druckniveaus bei erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken entsteht, so ist die Ursache der pulmonalen Hypertonie eine präkapilläre Vasokonstriktion oder ein eingeschränkter aktiver Vasodilationsmechanismus, sowie ein Querschnittsverlust (fehlende Distension) durch *Remodeling* (s.o.) der Gefäßwände, Verlust von Gefäßen („*vascular pruning*“) oder durch Okklusion von Arterien.

Außer der HPV, die bei alveolärer Hypoventilation sowie atmosphärischer Hypoxie auftritt, existieren noch weitere Pathomechanismen, die zur Entstehung einer PH führen, die im Folgenden kurz aufgelistet werden.

- 1) Die Obliteration im Rahmen von Lungenembolien oder lokalen Thromben
- 2) Die sich primär durch Herzvittien ergebende mechanische Belastung (hydrostatische Kräfte und Scherkräfte) bei Hyperzirkulation
- 3) Die Inflammation, die sich bei Kollagenosen, dem *Toxic Oil Syndrome* (Spanisches Ölsyndrom) und den entzündlichen Lungenkrankheiten ergibt
- 4) Die genetische Disposition
- 5) Weitere Mechanismen, z.B. im Rahmen von Medikamenten, bei Leberzirrhose oder chronischen Virusinfektionen

Verschiedene Krankheitsbilder können über die oben aufgelisteten Mechanismen eine Gefäßengstellung und Umbauprozesse in der Lungenstrombahn zur Folge haben. Die resultierende pulmonale Hypertonie wird durch Vasokonstriktion unterhalten und durch *Remodeling* fixiert²⁰.

Die Pathogenese der PH ist multifaktoriell. Ungeachtet der zu Grunde liegenden Ursache oder Assoziationen sind mehrere verknüpfte Mechanismen in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der PH relevant, wobei die endotheliale Dysfunktion eine wesentliche Rolle spielt. Sie ist charakterisiert durch eine Überproduktion von Vasokonstringenzen und proliferativen Faktoren, wie Endothelin-1, und einer Reduktion von Vasodilatoren und antiproliferativen Faktoren, wie Prostazyklin (verursacht durch eine verminderte Endothelzell-Prostazyklinsynthase-Aktivität) und Stickstoffmonoxid (NO, verursacht u.a. durch eine herabgesetzte NO-Synthase-Expression)²¹.

1.3.3 Klassifikation der PH

Während in früheren Jahren lediglich zwischen einer primären (idiopathischen) pulmonalen Hypertonie und einer sekundären Form infolge zugrunde liegender Erkrankungen unterschieden wurde, wurde die klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie im Rahmen des "*3rd World Symposium on Pulmonary Arterial Hypertension*" 2003 in Venedig neu festgelegt und umfasst fünf Gruppen. Basierend auf neuen Erkenntnissen und Publikationen wurden über die Jahre immer wieder leichte Modifizierungen vorgenommen, so zunächst während des vierten Weltsymposiums 2008 in Dana Point und zuletzt erneut während des sechsten Weltsymposiums 2018 in Nizza²². Es werden weiterhin fünf Klassen unterschieden, die folgende Auflistung beruht auf der in Nizza festgelegten modifizierten Klassifikation.

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1 Idiopathische PAH (iPAH)
 - 1.2 Hereditäre PAH (hPAH)
 - 1.3 Medikamenten- und Giftstoff-induzierte PAH
 - 1.4 PAH assoziiert mit:
 - 1.4.1 Kollagenosen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Pfortaderhochdruck
 - 1.4.4 Angeborenenen Herzfehlern

- 1.4.5 Schistosomiasis
- 1.5 PAH mit gutem Langzeit-Ansprechen auf Calcium-Kanal-Blocker
- 1.6 PAH mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung (Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH))
- 1.7 Persistierende PH des Neugeborenen (PPHN)
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen
 - 2.1 PH aufgrund von Herzversagen mit erhaltener linksventrikulärer Auswurfraction LVEF
 - 2.2 PH aufgrund von Herzversagen mit eingeschränkter LVEF
 - 2.3 Herzklappenerkrankungen
 - 2.4 Kongenitale/Erworbene kardiovaskuläre Zustände, die zu einer postkapillären PH führen
- 3. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/oder Hypoxämien
 - 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
 - 3.2 Restriktive Lungenerkrankungen
 - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischter restriktiver and obstruktiver Komponente
 - 3.4 Hypoxie ohne Lungenerkrankung
 - 3.5 Anlagebedingte Lungenfehlbildungen
- 4. Pulmonale Hypertonie infolge pulmonalarterieller Verschlüsse
 - 4.1 Chronisch thrombotische und/ oder embolische Krankheiten (CTEPH)
 - 4.2 Andere pulmonalarterielle Verschlüsse
- 5. Pulmonale Hypertonie unklarer und/oder multifaktorieller Mechanismen
 - 5.1 Hämatologische Erkrankungen (myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie)
 - 5.2 Systemische oder metabolische Erkrankungen (Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vasculitis, Glykogenspeicherkrankheiten, Gaucher-Erkrankung, Schilddrüsenerkrankungen)
 - 5.3 Andere (Tumor, Mediastinitis, dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz)
 - 5.4 Komplexe kongenitale Herzfehlbildungen

1.3.4 Aktuelle medikamentöse Therapieoptionen der PAH

Aktuell steht nur für die PAH und CTEPH eine zugelassene spezifische Therapie zur Verfügung. Im Folgenden soll ein Überblick über die Therapie der PAH, als Modellerkrankung einer präkapillären Form der PH, gegeben werden. Die Therapie der PAH hat sich in den letzten Jahrzehnten durch die klinische Etablierung verschiedener PH-Medikamente (Prostanoide, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, lösliche Guanylatzyklase-Stimulatoren [sGC-Stimulatoren]) deutlich verbessert. Kontrollierte Studien zeigen, dass durch die genannten Wirkstoffe die klinische Symptomatik vermindert, die körperliche Belastbarkeit gesteigert und die Krankheitsprogression verzögert werden können. Zudem kann im Vergleich zu historischen Kontrollkollektiven auch die Prognose verbessert werden.

Für die gezielte Therapie der PAH stehen in Deutschland mittlerweile zahlreiche Medikamente aus fünf verschiedenen Substanzklassen zur Verfügung:

- Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA; Ambrisentan, Bosentan, Macitentan),
- Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (PDE5i; Sildenafil, Tadalafil),
- sGC-Stimulatoren (Riociguat)
- Prostazyklin-Analoga (Epoprostenol, Iloprost, Treprostinil) beziehungsweise
- Prostazyklin-Rezeptor-Agonisten (Selexipag).

Riociguat erhielt als erstes Medikament die Zulassung für die Therapie der nichtoperablen oder rezidivierenden CTEPH.

Die PAH ist aktuell nicht heilbar. Zudem weisen viele Patienten trotz intensiver Behandlung mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln immer noch erhebliche Beschwerden auf, die mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und mit einer begrenzten Lebenserwartung einhergehen (Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für PAH 57%–59% und für inoperable CTEPH 53%–69%)²³. Neue Therapieansätze für die PAH sollten daher weiter erforscht werden. Außerdem gibt es für andere präkapillären Formen der PH, insbesondere die PH bei Lungenerkrankungen/Hypoxie keine spezifischen Therapieansätze^{24, 25}. Es gibt derzeit keine Empfehlung für die Anwendung der PAH-spezifischen Medikamente zur Behandlung der anderen Gruppen der PH mangels evidentem Nutzen²⁶. Aktuell zielt die Therapie v.a. auf die Therapie der Grunderkrankung ab. Ein pulmonalvaskulär spezifischer Ansatz ist möglicherweise die Abschwächung der HPV, wobei dies auch zu einer Verschlechterung der Ventilation-Perfusions-Verteilung und damit Oxygenierungsstörung führen kann²⁷. Zu einer

therapeutischen Beeinflussung der HPV ist allerdings auch ein weiteres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen nötig.

1.4 Sauerstoffsensoren und Mediatoren der HPV: Stand der Forschung

Trotz intensiver Forschung sind die grundlegenden Mechanismen der HPV noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere der primäre Sauerstoffsensormechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt, während die Effektormechanismen weitgehend bekannt sind.

Als Effektorzellen der HPV wurden die glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells* = PASMC) der präkapillären Widerstandsgefäße am Eingang der Azini, also jenseits der Bronchioli terminalis und vor den Alveolen, identifiziert²⁸⁻³¹. Außerdem werden die PASMC im Falle der akuten Hypoxie auch als Sensorzellen für die Hypoxie diskutiert, da sowohl isolierte PASMC als auch endothelfreie pulmonalarterielle Gefäßbringe eine spezifische Antwort (Konstriktion) auf akute Hypoxie zeigten³²⁻³⁴. Akute Hypoxie löste in isolierten PASMC sowohl eine Erhöhung der Kalziumkonzentration als auch eine Kontraktion aus. Diese Charakteristik war spezifisch für die PASMC und konnte bei Gewebeproben aus systemischer Gefäßmuskulatur nicht nachgewiesen werden. So zeigten isolierte glatte Muskelzellen aus cerebralen Gefäßen von Katzen einen Spannungsverlust (gemessen an der Änderung der Zelllänge) als Antwort auf akute Hypoxie und des Weiteren hatte hypoxische Exposition keinerlei Effekt auf Ringe aus mesenterialen Widerstandsgefäßen der Ratte^{32, 34}.

Eine Rolle des Endothels bei der akuten HPV wird aufgrund oben genannter Ergebnisse nicht angenommen, ist aber umstritten^{35, 36}, während für die protrahierte Hypoxie (länger als 30 Minuten andauernd) von einer Beteiligung der Endothelzellen ausgegangen wird, wie an untersuchten pulmonalarteriellen Ringen von Ratten gezeigt wurde³⁷⁻³⁹.

Der terminale Signaltransduktionsweg, der zu einer Kontraktion der präkapillären PASMC führt, involviert einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch einen Influx aus dem Extrazellulärraum (und wahrscheinlich auch von intrazellulären Speichern), der durch eine Inhibierung von Kaliumkanälen und dadurch bedingten Membrandepolarisation mit folgender Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ausgelöst wird. Des Weiteren sind TRPC6 Kanäle, wahrscheinlich über die Membrandepolarisation, essentiell an dem intrazellulären Kalziumanstieg beteiligt⁴⁰⁻⁴². Außerdem wurde, zumindest im Falle der protrahierten HPV, eine Kalziumsensibilisierung (Ca^{2+} -Sensibilisierung) durch die Aktivierung einer Rho-Kinase vorgeschlagen^{43, 44}.

Im Folgenden sollen die aktuellen Konzepte des Sauerstoffsensor-Mechanismus vorgestellt und ein Überblick über die verschiedenen Theorien zur Identität möglicher *second messenger* gegeben werden.

1.4.1 Mitochondrien

Es ist seit langem bekannt, dass Mitochondrien zentral an dem Sauerstoffsensormechanismus der akuten HPV beteiligt sind, was alleine schon deshalb naheliegend ist, da sie die Hauptverbraucher des eingeatmeten Sauerstoffes sind. Es wurde gezeigt, dass Inhibitoren der mitochondrialen Elektronentransportkette eine Hemmung der HPV zur Folge haben, sowohl in isolierten Lungen, als auch in Pulmonalarterien⁴⁵⁻⁴⁷. Des Weiteren zeigen PASMC ohne funktionierende Atmungskette keine Hypoxie-spezifischen Reaktionen⁴⁸. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Isofor 2 der Untereinheit 4 der Cytochrom c Oxidase essentiell für die Hypoxie-Antwort in PASMC und HPV ist⁴⁹, so dass die zentrale Rolle der Mitochondrien bestätigt werden konnte.

1.4.2 Hämoxigenase und Cytochrom P450 (CYP450)

Als weiterer Mechanismus neben den Mitochondrien wurde vorgeschlagen, dass die Hämoxigenase-2 (HO-2) über eine Cytochrom P450 (CYP450)-abhängige Freisetzung von Kohlenmonoxid (CO) eine Rolle im Sauerstoffsensing spielen könnte⁵⁰. Dieses Konzept wurde bei der akuten Hypoxie in sauerstoffsensitiven Zellen des Karotiskörperchen vorgeschlagen. Dabei wurde postuliert, dass der „*large conductance calcium and voltage gated potassium channel* (B_K)“, der mit der HO-2 assoziiert ist, durch eine Hypoxie-bedingte verminderte Freisetzung von CO inhibiert wird und dadurch zu einer Membrandepolarisation führt, die eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung und Aktivierung der Glomuszellen bewirkt⁵¹.

Für das Abbauprodukt CO konnte bereits vor langer Zeit ein Einfluss auf die Glomuszellaktivität nachgewiesen werden⁵².

Außerdem konnte an Zellen des Glomus caroticum eine Inhibierung des B_K-Kanals während Hypoxie demonstriert werden, was andeutet, dass HO-2 ein möglicher Sauerstoffsensor sein könnte, der die Aktivität des Kanals unter Sauerstoffdeprivation mit Hilfe von CO als Botenstoff kontrolliert⁵⁰. Auch an zellfreien Glomuszellmembranen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie den B_K-Kanal inaktiviert⁵³. Für die HPV wurde allerdings gezeigt, dass der B_K-Kanal und HO-2 nicht essentiell beteiligt ist, da HO-2- und B_K-Kanal-defiziente Mäuselungen keinen Unterschied in der Stärke der akuten und protrahierten Phase der HPV im Vergleich mit entsprechenden Wildtypen zeigten⁵⁴.

1.4.3 Mediatoren

Als Mediatoren in der Signalkaskade der HPV werden verschiedene Stoffe diskutiert und die dazu entstandenen Theorien sind teilweise konträr zueinander. Großer Konsens herrscht über die Wichtigkeit bestimmter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wonach dem Superoxid-Anion (O_2^-) und dem Wasserstoffperoxid H_2O_2 , eine entscheidende Rolle zuzukommen scheint. Dabei stellt v.a. die mitochondriale Elektronentransportkette eine Quelle für ROS unter akuter Hypoxie dar.

Um die Zelle mit Adenosintriphosphat (ATP) zu versorgen, wird über der inneren mitochondrialen Membran ein Protonengradient aufgebaut. Die Elektronen werden in der Atmungskette (Atmungskettenkomplex I-IV) entlang eines Redox-Gradienten transportiert und schließlich von Komplex IV auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch dieser zu Wasser reduziert wird. Die Elektronen können allerdings v.a. an Komplex I und III auch (akzidentiell) auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, wodurch Superoxid-Radikale entstehen.

Gemäß der initialen Hypothese wurde vorgeschlagen, dass es unter akuter Hypoxie zu einer verminderten Freisetzung von ROS kommt, wodurch über eine Änderung des Redox-Zustandes der Zelle (Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion, GSH/GSSG, und reduziertem zu oxidiertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, NADH/NAD⁺) entsprechende spannungsabhängige Kanäle (K_v -Kanäle) beeinflusst werden.

Eine entgegengesetzte Hypothese schlug allerdings vor, dass akute Hypoxie zu einem Anstieg von ROS und damit verbundenen Signalprozessen führt⁷. Diese Hypothese wurde durch verschiedene Untersuchungen mit ROS-Detektoren und Inhibitoren untermauert und durch kürzliche Untersuchungen mit transgenen Tieren, die eine verminderte Hypoxie-induzierte ROS-Freisetzung und fehlende Hypoxieantwort zeigten, unterstützt^{49, 55}.

Neben Mediatoren der HPV gibt es eine Reihe von Modulatoren, zu denen unter anderem Abbauprodukte der Arachidonsäure (AA) gehören. Bei der Oxidation von Arachidonsäure durch CYP-Monooxygenasen (P450-Hydroxylase [CYP4A] und P450-Epoxygenasen [CYP2C]) entstehen als Metaboliten 19- und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (HETEs) und Epoxyeicosatriensäuren (EETs), deren Rolle im pulmonalen Metabolismus in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus gerückt ist⁵⁶. Es wurde postuliert, dass diese CYP450-abhängigen Eicosanoide eine spezifische Rolle in der HPV spielen⁵⁷. 20-HETEs dilatieren isolierte Pulmonalarterien aus menschlichen Lungen⁵⁸ und Kaninchenlungen⁵⁹. Im Gegensatz dazu führen sie zu einer potenten Kontraktion der Nierenarterien, Gehirnarterien und der Arteriolen⁶⁰. EETs vermindern den Gefäßtonus von isolierten Kaninchen⁶¹ und Hundelungen⁶², können aber auch zu einer

Vasokonstriktion von pulmonalen Gefäßen führen⁶³ oder die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion verstärken⁶⁴. Aktuell wird angenommen, dass diese Substanzen die HPV modulieren, aber nicht essentiell am Sauerstoffsensormechanismus beteiligt sind⁶⁵.

1.5 Sauerstoffsensoren und Mediatoren in der HPV: Aktuelle Ansatzpunkte

1.5.1 Cytochrome als Sauerstoffsensoren

Cytochrome (cyto=Zelle, chrôma=Farbe, griechisch) sind Bestandteile potentieller primärer Sauerstoffsensoren, darunter die Cytochrome der Atmungskette und Cytochrom P450, die in dieser Arbeit näher untersucht werden. Cytochrome bilden neben den verwandten Hämoglobin und Myoglobin eine Untergruppe der Hämproteine und sind Redox-aktive Proteine, die eisenhaltiges (Fe = Eisen) Häm als prosthetische Gruppe besitzen und deren biologische Funktion in der Elektronenübertragung besteht. Das Häm alterniert hier zwischen dem Fe²⁺- und Fe³⁺-Zustand (reversibler Valenzwechsel des Häm-Eisenatoms vom zweiwertigen zum dreiwertigen Zustand, wobei ein Elektron freigesetzt wird: $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$). Somit fungieren sie als Oxidoreduktasen und spielen eine wichtige Rolle im Sauerstoffmetabolismus. Cytochrome weisen spezifische Absorptionsspektren des sichtbaren Lichtes auf (zwischen 400 und 600 nm) und können anhand dieser Eigenschaft in einzelne Untergruppen eingeteilt werden. Mit Hilfe dieser besonderen Charakteristik können sie auch identifiziert werden. Darüber hinaus können sie ihre Absorptionseigenschaften z.B. in Abhängigkeit des Redoxzustandes ändern.

1.5.1.1 Mitochondriale Cytochrome (Atmungskette)

An der inneren Membran der Mitochondrien läuft der letzte Schritt des oxidativen Katabolismus ab, die sogenannte oxidative Phosphorylierung, die für die ATP-Synthese zuständig ist. Dabei sind verschiedene Cytochrome beteiligt: Cytochrom c, das Elektronen von Komplex III auf Komplex IV überträgt; Cytochrom b_{lh} (Cytochrom b563 und b566), das an der Elektronenübertragung von Ubiquinol auf Ubiquinon in Komplex III beteiligt ist und Cytochrom aa₃ (Cytochrom a und a₃), das an der Elektronenübertragung auf Sauerstoff in Komplex IV beteiligt ist. Durch Messung des Redoxzustandes dieser Cytochrome kann somit ein Akkumulation von Elektronen in der Atmungskette detektiert werden, wie sie unter Hypoxie auftreten kann⁶⁶.

1.5.1.2 CYP450

Das menschliche Genom besitzt mehr als 100 verschiedene Gene der CYP450-Superfamilie. Es wurden zudem etliche Subtypen entdeckt. Im Komplex mit Kohlenmonoxid (CO) weisen sie ein Absorptionsmaximum bei 450 nm auf, woher ihr Name rührt. Über dieses spezifische CO-Spektrum und spektrale Veränderungen durch Substratbindungen kann CYP450 leicht identifiziert werden⁶⁷.

CYP450-Enzyme kommen praktisch in allen Formen des Lebens vor. In Tieren wurden sie in nahezu allen Organen nachgewiesen. Besonders hohe Konzentrationen fanden sich in der Leber, im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge⁶⁸⁻⁷⁰. Sie spielen eine große Rolle im oxidativen Metabolismus und sind daher sauerstoffsensibel.

Die Rolle der CYP450 bei der HPV ist nicht vollständig geklärt, es wurde aber gezeigt, dass eine Inhibierung der CYP450 die HPV moduliert, wobei die Aktivität der CYP450 für die HPV nicht essentiell zu sein scheint⁷¹. Des Weiteren ist unklar, über welchen Mediator CYP450 die HPV beeinflusst. In Frage kommt CO als Abbauprodukt von Häm oder HETEs/EETs (siehe oben).

1.5.2 CO als Mediator

1.5.2.1 Beschreibung und Rolle als mögliches Therapeutikum

CO ist ein farb- geruch- und geschmackloses Gas, welches toxische Eigenschaften besitzt. Es ist ein strukturelles Analogon des Sauerstoffes und besitzt eine um circa 217-fach höhere Affinität zu Hämoglobin als Sauerstoff^{72, 73}. Seit langem ist CO als toxische Substanz bekannt, jedoch wird seine wichtige biologische Rolle als Signalmolekül immer deutlicher⁷⁴.

Diverse gasförmige Moleküle werden schon seit längerem im therapeutischen Bereich eingesetzt oder klinisch getestet, so z.B. Wasserstoff (H₂), O₂, Distickstoffmonoxid (N₂O), Kohlenstoffdioxid (CO₂), Helium (He), Xenon (Xe), Stickstoff (N₂), Stickstoffmonoxid (NO) oder Ozon (O₃)⁷⁵⁻⁷⁹. In den letzten Jahren ist nun CO in den Fokus der Wissenschaft gerückt und wurde zum Gegenstand mehrerer präklinischer Studien, in denen therapeutische Applikationen untersucht wurden.

Der menschliche Körper selbst bildet CO in geringen Mengen. Tenhunen und Schmidt haben als erste die Hämoxxygenase (HO) als das Enzym identifiziert, das hauptsächlich für die endogene Produktion von CO verantwortlich ist⁸⁰. Endogenes CO entsteht durch den enzymatischen Abbau von Porphyrinmolekülen des Häms durch die HO. Unter physiologischen Bedingungen

wurde die Produktionsrate des endogenen CO im Menschen (70 kg Körpergewicht) in Ruhe auf circa 18 $\mu\text{mol/h}$ geschätzt^{81, 82}. In der Oxidation von Häm ist HO das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym, welches unter O_2 -Verbrauch und Übertragung von Elektronen der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase zur Bildung von Biliverdin führt und dabei CO und zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) freisetzt (Abb 1-1). Drei Isoformen der HO existieren, die konstitutiv exprimierten HO-2 und HO-3 und die stressinduzierbare HO-1^{80, 83}.

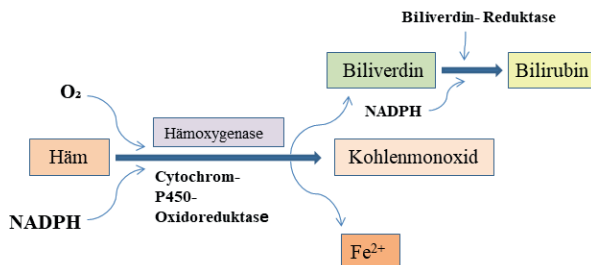


Abbildung 1-1: Abbau von Häm durch die Hämoxigenase unter Freisetzung von endogenem Kohlenmonoxid

Die Beteiligung als Signalmolekül und protektive Rolle des endogenen CO wurde in verschiedenen zellulären oder tierischen Modellen nachgewiesen. In Zellkulturen konnte eine potente antiinflammatorische, antiapoptotische und antiproliferative Wirkung des CO aufgezeigt werden⁸⁴⁻⁸⁶.

In vivo konnte gezeigt werden, dass inhalatives CO in verschiedenen Tiermodellen von akuten Lungenerkrankungen bis hin zum ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) in der Lage ist, das Gewebe über oben genannte Effekte zu schützen⁸⁷. Außerdem zeigte es in niedriger Dosierung eine Verbesserung von ischämischen Folgeschäden nach Ischämie-Reperfusionssyndrom (*ischemia-reperfusion-injury*)⁸⁸ und konnte die Abstoßungsrate von Lungen- und Gefäßtransplantaten erniedrigen⁸⁹⁻⁹¹. Andere Erkenntnisse beinhalten die Beobachtung, dass CO die Lunge in Modellen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose über einen antiproliferativen Effekt auf die Fibroblasten^{92, 93} und beatmungsinduzierter Lungenschädigung (*ventilator-induced lung injury*) über einen antiinflammatorischen Effekt⁹⁴ schützt. Vasodilatative Eigenschaften von CO, auch in Pulmonalgefäßen, wurden ebenfalls beschrieben⁹⁵. So konnte bereits *in vivo* eine Abschwächung der HPV durch kontinuierliche Inhalation von CO gezeigt werden. Hierbei wurden Ratten 21 Tage lang unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gehalten und 50 ppm CO oder keinem CO exponiert. Hierbei zeigte CO bei den chronisch hypoxischen

Mäusen eine abschwächende Wirkung auf den bei der rein hypoxisch gehaltenen Gruppe höheren PAP und das rechtsventrikuläre Gewicht. Einen Einfluss auf den basalen Gefäßtonus unter Normoxie zeigte CO jedoch nicht⁹⁶.

Die Untersuchungen und Studien zu den therapeutischen Eigenschaften von CO innerhalb der letzten beiden Dekaden haben bemerkenswerte Ergebnisse erbracht. Dennoch darf die immanente toxische Natur von CO nicht außer Acht gelassen werden, die bei Inhalation größerer Mengen zu schwerwiegenden systemischen Komplikationen und neurologischen Störungen führen kann.

Trotz erster vielversprechender Ergebnisse auch am Menschen, wurde bisher keine Zulassung der Therapie mit CO bei einer humanen Erkrankung erreicht, wofür verschiedene Gründe ursächlich sind, z.B. eine mangelnde Effektivität in den klinischen Studien. Dennoch konnte anhand dieser Studien gezeigt werden, dass die Administration von niedrigen Dosen von CO sicher erscheint⁹⁷.

Die Applikation am Menschen in sicheren, therapeutischen Dosen, ohne dabei die Schwelle zur Toxizität zu überschreiten, stellt sich als anspruchsvoll dar und bleibt weiterhin Bestandteil zukünftiger Forschung. Theoretisch gibt es drei denkbare Applikationsarten für CO als Therapeutikum im menschlichen Körper. Erstens könnte das durch Induktion der HO-1 auf ein relevantes Niveau geschehen, was jedoch auch Risiken beinhaltet, wie zum Beispiel die Progression verschiedener Erkrankungen, wie Neurodegeneration und Karzinogenese⁹⁸. Zweitens gäbe es die Möglichkeit der Inhalation von CO. Und drittens wäre eine intravenöse oder orale Gabe von einer Substanz möglich, die es vermag, CO freizusetzen. Dieser neuere wissenschaftliche Ansatz, CO in therapeutischen Dosen durch sogenannte *Carbon Monoxide-Releasing Molecules* verabreichen zu können, wird im Folgenden beschrieben.

1.5.2.2 Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CORMs)

Die oben beschriebenen Ergebnisse aus den Tiermodellen zeigen, dass eine kontrollierte Gabe von CO einen therapeutischen Nutzen in einer Anzahl pathologischer Zustände erbringen könnte.

Die neueste Errungenschaft im Hinblick auf diese Ambition besteht in der Entwicklung und Testung sogenannter CORMs (*CO-releasing molecules*), einer Gruppe chemischer Komplexverbindungen (Übergangsmetallcarbonyle), bestehend aus einem Übergangsmetall als Zentralatom und CO als Liganden. Sie sind in der Lage kleine kontrollierte Mengen von CO in ihre Umgebung abzugeben und stellen somit ein plausibles Werkzeug dar, um die

pharmakologischen Effekte und den Wirkmechanismus dieses Gases zu studieren. Auf diesem Gebiet leistete Motterlini Pionierarbeit, indem er in den letzten Jahren eine genaue Charakterisierung und Beschreibung verschiedener Übergangsmetallcarbonyle als potentielle CORMs vornahm und deren CO-Freisetzung und Wirkung in verschiedenen Modellen testete^{99, 100}.

Eine Reihe verschiedener Varianten dieser CO-Träger, die z.B. Mangan (CORM-1), Ruthenium (CORM-2 und -3), Bor (CORM-A1) oder Eisen (CORM-F3) enthalten, wurden von Motterlini untersucht. In mehreren Studien konnten sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Modellen vasodilatatorische, antiischämische und antiinflammatorische Effekte verschiedener CORMs aufgezeigt werden^{99, 101-103}.

In den letzten Jahren hat die Entwicklung der CORMs stark expandiert und es kann zwischen einer großen Anzahl an CORM-Arten unterschieden werden, die sich mittels unterschiedlicher Auslöser der CO-Freisetzung klassifizieren lassen. Hierzu gehören beispielsweise Lösungsmittel-getriggerte CORMs, Photo-CORMs, Enzym-getriggerte CORMs, Temperatur-getriggerte CORMs, Oxidations-getriggerte CORMs oder pH-getriggerte CORMs¹⁰⁴.

CORM-1 gibt CO nach Stimulation mit Licht ab, wohingegen CORM-2 und CORM-3 CO in der Anwesenheit von Hämproteinen freisetzen¹⁰². Jedoch ist CORM-2 nur in organischen Lösungsmitteln löslich. Daher ist einzig CORM-3 in der Lage, CO in physiologischen Flüssigkeiten wie Blut freizusetzen^{105, 106}. Die beiden Substanzen wurden als mögliche therapeutische Werkzeuge in der Behandlung der pulmonalen Inflammation (CORM-2) oder der pulmonalen Hypertonie (CORM-3) beschrieben (Details siehe unten)¹⁰⁷. Von CORM-2 wurde berichtet, dass es eine dauerhafte Vasodilation in kontrahierten Aortenringen der Ratte induzierte und zu einer beträchtlichen Reduktion von Hypertension *in vivo* führte¹⁰⁸.

Die bisherigen Erfolge erwecken die Aussicht, die chemischen Komplexe in der Zukunft als CO-basierte Pharmaka in einer Reihe von Erkrankungen einsetzen zu können.

Jedoch wurde der Effekt der CORMs auf den pulmonalvaskulären Widerstand und deren Einfluss auf die HPV bisher nicht im Detail untersucht. Des Weiteren ist noch unklar, in wie weit die CORMs einen toxischen Effekt in der Lunge ausüben. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von CORM-2 und CORM-3 auf die pulmonale Vasoreagibilität in Normoxie und Hypoxie sowie deren Interaktion mit den zellulären Cytochromen in isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslungen untersucht. Die Effekte wurden mit denen von inhaliertem CO verglichen.

1.5.2.3 Angriffspunkte von CO

Die Affinität von CO zu Metallatomen erlaubt eine Interaktion mit einer hohen Anzahl an Metallproteinen¹⁰⁹. Diese Eigenschaft impliziert, dass alle Häm-enthaltenden Proteine mögliche Angriffspunkte für CO darstellen können. Diese beinhalten auch diejenigen, die Häm als prosthetische Gruppe enthalten, z.B. Hämoglobin, Myoglobin, sGC, Cyclooxygenasen, Cytochrome (z.B. CYP450, Cytochrome der Atmungskette), induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder NADPH-Oxidasen. CO kann durch Bindung an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe die biologische Aktivität dieser Hämproteine modulieren. CO kann aber auch potentiell an Proteine binden, die andere Metallionen enthalten, so wie Zink, Kupfer oder Mangan¹¹⁰.

Interessant für die vorliegende Arbeit war die Bindung von CO an Strukturen, die bekannterweise eine mögliche Rolle im Mechanismus der HPV spielen. Miller und Hales zeigten, dass CO über eine Blockade von CYP450 zu einer Einschränkung der HPV führte⁷¹.

Außerdem konnte am *Glomus caroticum* demonstriert werden, dass CO über eine Bindung am Cytochrom a3 der mitochondrialen Atmungskette, Hypoxie-abhängige Signalwege in Glomuszellen auslöste und das darauffolgende Hypoxie-induzierte Signal abschwächte. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Cytochrom a3 (und damit die mitochondriale oxidative Phosphorylierung) als Sauerstoffsensoren des *Glomus caroticum* dient und spekuliert, dass es möglicherweise auch als primärer Sauerstoffsensoren der HPV in der Lunge eine Rolle spielt¹¹¹⁻¹¹³. Gleichzeitig könnte CO über eine Interaktion mit Cytochrom a3 den pulmonalvaskulären Tonus modifizieren.

Weiterhin wurde in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta von Kaninchen gezeigt, dass CO ebenfalls an die Hämgruppe der sGC bindet, genau wie NO, der klassische Agonist der sGC. Dies geschieht jedoch mit einer wesentlich schwächeren Wirkung. Die durch die Bindung bewirkte Aktivierung der sGC hatte eine Stimulation der Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zur Folge, die wiederum zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und einer damit verbundenen Vasodilatation führte^{114, 115}. Es war außerdem zu beobachten, dass die endogene Produktion von CO in isolierten, glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta und PASMCs aus Ratten, durch Erhöhung der Transkriptionsrate des HO-1-Genes, unter hypoxischen Bedingungen zunahm. Gleichzeitig konnte eine Erhöhung des cGMP-Spiegels gemessen werden, auch unter Blockade der NO-Produktion. Dies unterstützt die Annahme, dass CO, über Aktivierung der sGC, ein endogener Regulator des vaskulären Tonus darstellt^{116, 117}.

1.5.2.4 Auswirkungen von CO auf die HPV

Zur Erforschung der Effekte von CO auf die HPV wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, die teilweise ambivalente Ergebnisse ergaben. *In vivo* Untersuchungen an Hundelungen anästhesierter und endotracheal beatmeter Hunde konnten zwar eine Modulation der HPV durch CO im Sinne einer Abschwächung der HPV detektieren, dies war jedoch nur in Abwesenheit von NO möglich¹¹⁸. An *in situ*, Blut-perfundierten Lungenpräparationen von Ratten wurde der pulmonalarterielle Druck unter hypoxischer Beatmung in Anwesenheit von 8 oder 15% CO und mit oder ohne Inhibierung der cGMP-Produktions-Kaskade (Gabe von N-Methyl-L-Arginin oder Methylenblau zur Hemmung der NO-Synthase) gemessen. Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass CO die HPV über einen cGMP-unabhängigen Mechanismus inhibierte, denn trotz Inhibierung der cGMP-Produktion und konsekutivem Anstieg des PAP wurde die Effektivität der Abschwächung der HPV durch CO nicht beeinflusst¹¹⁹. An isolierten Rattenlungen wiederum konnte keine Abschwächung der HPV durch Exposition niedriger Dosen von CO (< 1000 ppm) verzeichnet werden¹²⁰.

1.5.2.5 Auswirkungen von CO auf die PH

CO wirkt möglicherweise über vasodilatierende und antiproliferative Effekte inhibierend auf die Entwicklung der durch chronische Hypoxie induzierten PH. Diesbezüglich konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass eine gezielte Überexpression von HO-1 zu einer Abschwächung der Hypoxie-induzierten Entzündungsreaktionen und verminderten Entwicklung einer PH führte. Diese Beobachtungen könnten in Richtung CO als einen Modulator der adaptiven Antwort des Körpers auf Hypoxie weisen¹²¹. An einem anderen Nagetiermodell konnte gezeigt werden, dass die inhalative Exposition gegenüber CO (250 ppm) für eine Stunde am Tag eine manifeste PH sowie eine rechtsventrikuläre Hypertrophie annähernd vollständig rückgängig machen konnte¹²².

In Versuchen an Lamas konnte die Hypothese erhärtet werden, dass eine erhöhte Konzentration an CO in der Lunge dem Schutz vor der Entwicklung einer PH in der Neugeborenenperiode auf großer Höhe dient¹²³. Orale Applikation von CORM-3 (50 mg/kg einmal täglich für drei Wochen) milderte die Entwicklung einer PH durch einen antiproliferativen Mechanismus in Mäusen ab, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren und machte eine bereits bestehende PH teilweise rückgängig (in transgenen Mäusen die durch eine Überexpression des Serotonin Transporters in glatten Muskelzellen [SM22-5-HTT+ Mäuse] eine spontane PH entwickeln)¹⁰⁷.

1.6 Zielsetzung

Die HPV ist ein physiologischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der arteriellen Oxygenierung unter lokaler akuter Hypoxie. Eine globale protrahierte HPV, wie sie z.B. bei chronischen Lungenerkrankungen auftritt, kann jedoch auch zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand und zusammen mit einem *Remodeling* der Gefäße zu einer PH führen. CO ist ein intrinsischer Botenstoff, der über eine Interaktion mit Cytochromen in den Signalweg der HPV eingreifen kann und dadurch die physiologische Ventilation-Perfusionsverteilung, sowie pulmonalvaskulären Widerstand beeinflussen könnte. Die sogenannten CORMs sind in der Lage, kleine kontrollierte Mengen von CO freizusetzen.

Ziel war es daher, am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge und mit Hilfe von Remissionspektrometrie folgenden spezifischen Fragen nachzugehen:

- Welche Wirkung hat CO auf den pulmonalen Gefäßtonus während Normoxie und akuter Hypoxie?
- Welche Interaktion besteht zwischen CO mit CYP450 und den Cytochromen der mitochondrialen Atmungskette?
- Welche Wirkung haben die sogenannten CORMs auf den pulmonalen Gefäßtonus in Normoxie und Hypoxie?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde der Effekt von CO (10%) auf den pulmonalvaskulären Tonus während Normoxie, Hypoxie und Agonisten-induzierter Vasokonstriktion in der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge erforscht. Gleichzeitig wurde die Interaktion von CO mit CYP450 und den mitochondrialen Cytochromen mittels Gewebsspektrophotometrie gemessen. Die Rolle von CYP450 in der CO vermittelten pulmonalen Vasoreagibilität sollte durch Applikation von dem CYP450-Inhibitor Sulfaphenazole bestätigt werden. Außerdem wurde der Einfluss von CORMs auf die HPV in Normoxie und Hypoxie evaluiert.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter der Referenznummer: “GI 20/10 Nr. 105/2010” mit dem Titel “Pathomechanismen der respiratorischen Insuffizienz am Mausmodell” genehmigt.

2.2 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse des Stammes C57BL/6J wurden von Charles River Laboratory (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Alle in den Experimenten verwendeten Mäuse waren männlich, zwei bis drei Monate alt und wogen zwischen 24 g und 28 g. Die Tiere wurden im Tierstall der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Leitungswasser und dem Standardfuttermittel Altromin®. Die Raumtemperatur lag bei etwa 25°C, die durchschnittliche Beleuchtungsdauer bei 12h/d. Die Tiere wurden versorgt nach den “Principles of Laboratory Animal Care” und dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, veröffentlicht von den National Institutes of Health (NIH publication 86-23, revised 1985/2011).

2.3 Materialien

2.3.1 Geräte

- Peristaltische Infusionspumpe: Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Atempumpe: Hugo Sachs Elektronik MiniVent Type 845, March-Hugstetten, Deutschland
- Wägezelle: Kent Scientific Cooperation Isometric Transducer, Litchfield, Connecticut, USA
- Verstärker: 1) World Precision Instruments, Transbridge 4M, Berlin, Deutschland
2) Transducer Amplifier Module Hans Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Druckaufnehmer: Combitrans® 1 fach Set, Model II Uni Giessen, B Braun, Melsungen, Deutschland
- Kühlung: Frigomix® U-1 B Braun, Melsungen, Deutschland

- Temperaturregulator: Thermomix® BM Braun, Melsungen, Deutschland
- pH- Meter: Radiometer ABL 500, Kopenhagen, Dänemark
- Gasdruckmesser: Aalborg 1-800-866-3837, Orangeburg, NewYork, USA
- Handelsübliche Waage für Messgrößen im Bereich bis 500g
- Zentrifuge: Adams Autocrit TM Centrifuge, Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA
- Computer mit Monitor, Siemens Nixdorf AG, Paderborn, Deutschland
- CytoSPEC II, LEA Medizintechnik, Giessen, Deutschland
- Oroboros O2k, Oroboros, Innsbruck, Österreich

2.3.2 Software

- Microsoft Office Word, Power Point und Excel, Microsoft Corp., Unterschleißheim, Deutschland
- GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA
- Reference Manager 11, Adept Scientific plc, Letchworth, UK
- CytoSpec II- Software, LEA Medizintechnik, Gießen
- Grafik- und Datenerfassungsprogramm Labtech Notebook Pro© 1994 Laboratory Technologies Corp. ,Wilmington, USA

2.3.3 Verbrauchsmaterialien

- chirurgischer Faden: 5-0 Ethibond*Excel, Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA
- Dreiwegehahn: DicoFix®, B Braun , Melsungen, Deutschland
- Einmalhandschuhe Transaflex® Ansell, Surbiton Surrey, UK
- Einmalspritzen 1ml, 2ml, Inject Luer®, Braun, Melsungen, Deutschland
- Perfusor-Leitung 150cm, Braun, Melsungen, Deutschland
- Zellulose Unterlagen, Tork, Mannheim, Deutschland
- Zellstofftupfer 5x4cm, Purzellin®, Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
- Mulltupfer, pflaumengroß, Beese, Barbüttel, Deutschland
- Combi-Stopper, Braun, Melsungen, Deutschland
- Medizinisches Klebeband, Durapore®, 3M, St. Paul, MN, USA

- Hämatokrit-Kapillaren, 77mm/60µl, D.A. 1,3-1,4mm, Na- Heparin, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
- Silikon spray, Centramed Medizintechnik, Koblenz, Deutschland
- Kanülen in verschiedenen Stärken: BD Microlance TM, Drogheda, Ireland

2.3.4 Präparationsmaterialien

- Trachealtubus aus einer Einmalkanüle 1,2x4mm, BD Microlance TM 3, Drogheda, Ireland, gekürzt auf 1,3cm und abgestumpft
- Präparationsbesteck: Pinzette gebogen, Pinzette gerade, Mikro-Schere, Schere, Firma F.S.T., Heidelberg, Deutschland
- Handelsübliche Korkplatten zur Fixierung der anästhesierten Mäuse
- Handelsübliche Stecknadeln zur Fixierung der anästhesierten Mäuse
- Befestigung und Fixierung der Katheter: Miniball with 8mm Threaded M2 Rod, T50034 und zwei Miniball Joint holder T32045, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Katheter zum Einführen in den linken Ventrikel: Eigenanfertigung, in Form eines Angelhakens gebogenes, ca. 3cm langen, hohles Metallstück mit ca. 1,2mm Durchmesser und einer Verdickung am gebogenen Ende

2.3.5 Pharmaka, Chemikalien und Gase

- Krebs–Henseleit Perfusat (120 mM NaCl; 4,3 mM KCl; 1,1 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃; 2,4 mM CaCl₂; 1,3 mM MgCl₂, 13,32 mM Glucose und 5% [Gewicht/Volumen] Hydroxyethylamylopectin [Molekulargewicht: 200,000]) der Firma Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat 1 M 8,4% Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Ketavet® 100mg/ml Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Parke-Davis, Berlin, Deutschland
- Rompun® 2% Wirkstoff Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Deutschland
- Isotonische NaCl-Lösung 0,9%, DeltaSelect, Deutschland
- Heparin-Natrium-25.000-Ratiopharm®, Ulm, Deutschland
- Proteinlöser PAL 50, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Aqua ad iniectabilia Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland
- KCl pro analysi, Merck Darmsatdt, Deutschland
- Ethanol 96 %, Fischer, Saarbrücken, Deutschland

- $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (CORM-2), freundliche Gabe von Prof. Motterlini, Paris, Frankreich
- $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ (CORM-3), freundliche Gabe von Prof. Motterlini, Paris, Frankreich
- Thromboxan A₂ Mimetikum U46619, PG-023, Paesel und Lorei GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Normoxiegas: 21% O₂, 5,3 % CO₂ abgeglichen mit N₂, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Hypoxiegas: 1% O₂, 5,3% CO₂ abgeglichen mit N₂, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland
- Kohlenmonoxid, Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland

2.4 Isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge

2.4.1 Einführung

Bereits 1912 beschrieben Knowlton und Starling das Modell der isolierten Kaninchenlunge¹²⁴, welches seit 1994 im Laborbereich des Zentrums für Innere Medizin, Medizinische Klinik II/V der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet wird¹²⁵. 2004 wurde das Modell dort auch für die isolierte Mauslunge etabliert¹¹ und wird seither erfolgreich verwendet. Es bietet die Möglichkeit direkt am intakten Organ physiologische Zustände zu untersuchen oder pathologische Zustände zu induzieren, um diese zu erforschen. Die Befähigung zum Ausschalten zentralnervöser, metabolischer und humoraler Einflüsse sowie die Elimination von Blutzellen ermöglicht es, sowohl lungenspezifische Daten unter definierten Bedingungen zu erheben und zu interpretieren als auch Proben des Perfusats oder der Expirationsluft zur chemischen Analyse zu entnehmen. Das Modell ermöglicht die Untersuchung von komplexen Fragestellungen, unter anderem durch die kontinuierliche und direkte Erfassung des pulmonalarteriellen Drucks in Kombination mit der Möglichkeit, die Zusammensetzung des Beatmungsgases, sowie die Zusammensetzung der Perfusionsflüssigkeit zu modulieren. Nur unter solch streng kontrollierten Bedingungen ist es möglich, die genauen Wirkweisen und Effekte von applizierten Substanzen, entweder als Aerosol oder als Perfusat, am isolierten Organ zu untersuchen¹²⁶.

2.4.2 Versuchsaufbau

Im Modell der isolierten Mauslunge wurde das Lungen-Herzpaket an einer Wägezelle (Kent Scientific Cooperation Isometric Transducer) frei aufgehängt und künstlich perfundiert und ventiliert.

Dabei wurde die Lunge in einem geschlossenen Perfusionssystem durch eine peristaltische Infusionspumpe, die dem Pumpverhalten des Herzens nachempfunden ist, perfundiert. Hierbei wurde das Perfusat durch einen Katheter in der Pulmonalarterie in die Lunge hineingepumpt und durch einen Ausfluss aus dem linken Ventrikel wieder abgelassen. Als Perfusat diente Krebs-Henseleit Puffer, der mit Natriumbicarbonat versetzt (2,4 ml Natriumbicarbonat/ 100 ml Perfusat) und dann durch die Begasung mit 5,3 % CO₂-haltigem Gas auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 gebracht wurde. Die Perfusionsrate betrug 2 ml/min. Ventiliert wurde die Lunge durch eine Kolbenpumpe mit einem Tidalvolumen von 300 µl, einer Atemfrequenz von 90/min und einem positiven endexpiratorischen Druck von 3 cmH₂O.

Um eine konstante Temperatur des Perfusats und des Gewebes von 37°C zu garantieren, wurden der Vorratsbehälter des Perfusats und die Kammer, die die Lunge umgab, durch ein Doppelglassystem ständig mit 37°C warmer Temperierflüssigkeit beheizt. Zusätzlich wurde das Perfusat durch eine Heizspirale geleitet, die ebenfalls von erwärmtem Wasser umgeben war.

Eine Veranschaulichung des Versuchsaufbaus findet sich in Abbildung 2-1 und 2-2.

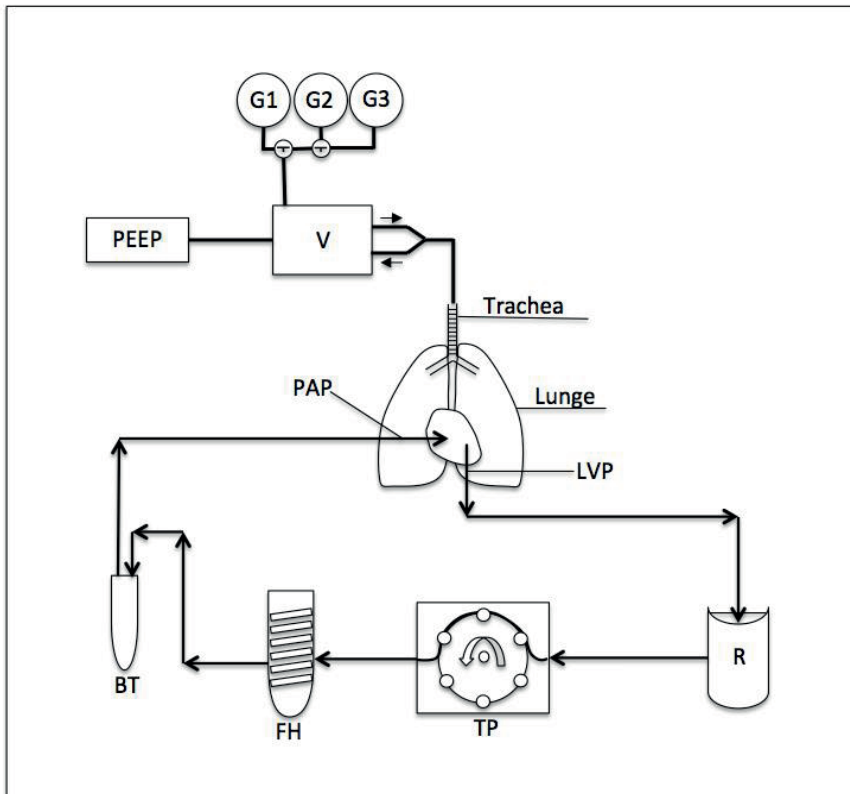


Abbildung 2-1 Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge - Ventilation und Perfusion: oberhalb der im Bild mittigen Lunge ist die Ventilationseinheit dargestellt. Die Lunge wird über eine Ventilationspumpe (V) über die Trachea beatmet. Die vorbereiteten Gasmischungen (normoxisch, hypoxisch, Raumluft, hier mit G1, G2, G3 dargestellt) werden über eine Gaszufuhrleitung zum Ventilator geführt und können über zwischengeschaltete Dreiwegehähne umgestellt werden. Am Expirationsschenkel des Ventilators ist ein Gefäß zur Einstellung des positiven endexpiratorischen Druckes (PEEP) angebracht. Die Fließrichtung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Aus dem Reservoir (R) wird das Perfusat mittels einer Rollenpumpe (TP) befördert. Über einen Wärmetauscher (FH) und einer Blasenfalle (BT) gelangt das Blut durch den in der Pulmonalarterie fixierten Katheter in die Lungenstrombahn. Durch den im linken Ventrikel eingebrachten Katheter fließt das Perfusat wieder ab. Hier wird über einen angebrachten Druckaufnehmer der linksventrikuläre Druck (LVP) gemessen.

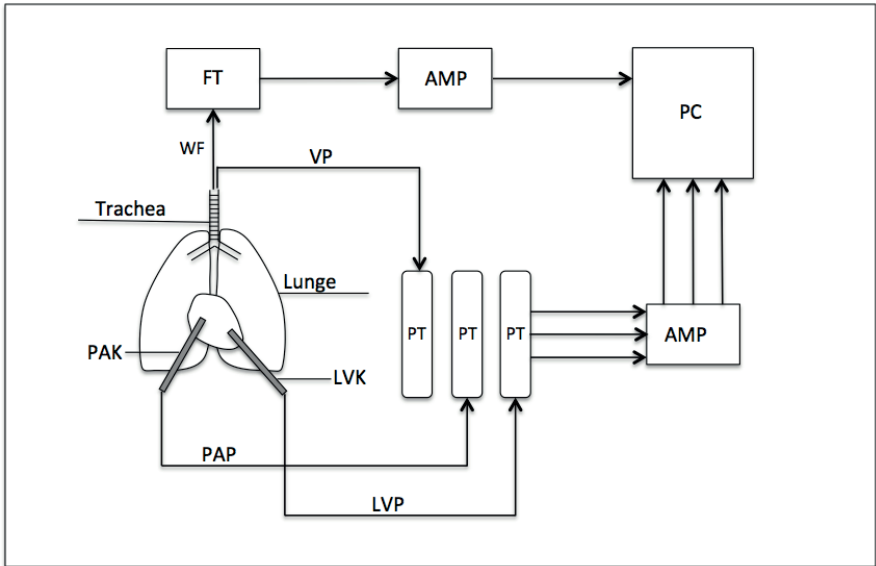


Abbildung 2-2 Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge - Druck- und Gewichtsmessung: Die Lunge wird über den Trachealtubus an einer Wägezelle (FT) frei aufgehängt. Durch Messung der isometrischen Kraft (WF) kann eine Gewichtszunahme der Lunge dokumentiert werden. Am Inspirationsschenkel wird der Beatmungsdruck (VP) über einen Druckaufnehmer (PT) aufgenommen, durch ein Verstärkermodul (AMP) amplifiziert und digitalisiert. Zwei weitere Druckaufnehmer sind über jeweils einen separaten Schenkel am Pulmonalkatheter (PAK) und am linksventrikulären Katheter (LVK) befestigt. Hier wird der pulmonalarterielle Druck (PAP) und der linksventrikuläre Druck (LVP) registriert. Die aufgenommenen elektrischen Signale werden amplifiziert und digitalisiert. Die Datenaufnahme erfolgte durch einen Computer (PC).

2.4.3 Systeminstandhaltung

Nach jedem Versuch wurde das gesamte Schlauchsystem mitsamt den Druckaufnehmern mit mindestens 50 ml des destillierten Wassers durchgespült. Anschließend wurde 0,1 ml Proteinase-lösung (PAL 50 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 20 ml destilliertes Wasser gegeben, in die Schläuche gepumpt und bis zur nächsten Verwendung im System belassen. Die Druckaufnehmer waren geschlossen, so dass sie nicht mit der Proteinase-lösung in Berührung kamen. Zur Schonung der Schläuche wurden diese nach jedem Versuch aus der Perfusionspumpe ausgespannt und mit Silikonspray eingesprüht.

Vor Beginn jedes neuen Versuchs wurde das System mit 80 ml destilliertem Wasser gespült, um die Proteinase-lösung zu entfernen. Danach wurde das gesamte Schlauchsystem, außer den Druckaufnehmern, zur Vorbereitung des Versuches mit Perfusat durchspült.

2.4.4 Narkose und Intubation

Die Mäuse wurden zunächst durch eine intraperitoneal (i.p.) applizierte Injektion anästhesiert. Dies geschah mit dem Anästhetikum Ketamin 125 mg/kg (Ketavet® 100 mg/ml Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und dem Muskelrelaxans Rompun 25 mg/kg (Rompun® 2% Wirkstoff Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Deutschland) im Verhältnis 0,25 ml: 0,25 ml: 0,5 ml Natriumchlorid (isotonische NaCl-Lösung 0,9%, DeltaSelect, Deutschland). Von dieser Mischung wurden dann 6,25 ml/kg Körpergewicht injiziert. Antikoaguliert wurden die Mäuse mit 2500 I.E./kg Heparin (Heparin-Natrium-25.000-Ratiopharm®, Ulm, Deutschland), ebenfalls durch intraperitoneale Injektion. Das Heparin wurde im Verhältnis 0,1 ml: 0,9 ml mit NaCl verdünnt.

Sobald die Mäuse nach circa 10 Minuten keine Reaktion mehr auf starke Schmerzreize (fehlender Zwischenzehenreflex) aufwiesen, wurden sie mit Nadeln an den Vorderläufen auf einer Korkplatte fixiert. Die Korkplatte selbst war vertikal auf einer Hebebühne angebracht, so dass die Höhe variiert werden konnte. Das Fell des gesamten Thorax wurde nun mit destilliertem Wasser (Aqua ad iniectiones Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland) befeuchtet, um Fellreste auf dem Isolat zu vermeiden. Daraufhin wurde mit einer Schere ein circa 4 mm großer Hautlappen oberhalb des kranialen Endes des Sternums herausgeschnitten. Von dieser Öffnung ausgehend wurde dann ein Hautschnitt bis zum Kinn vorgenommen. Anschließend wurden die Speicheldrüsen oberhalb der freigelegten Trachea mit einer Pinzette stumpf entfernt. Nun wurde die Trachea mit einer an der Spitze gebogenen Pinzette unterfahren und angehoben, um einen Faden (chirurgischer Faden: 5-0 Ethibond*Excel, Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA) um sie herumzulegen und einen Knoten an der ventralen Seite vorzulegen. Der Knoten befand sich dabei unterhalb des Kehlkopfes. Durch eine Tracheostomie wurde die Maus nun mit einem Tubus (Trachealtubus aus einer Einmalkanüle 1,2 x 4 mm, BD Microlance TM 3, Drogheda, Irland, gekürzt auf 1,3 cm und abgestumpft) intubiert und durch eine Beatmungspumpe (Hugo Sachs Elektronik MiniVent Type 845, March-Hugstetten, Deutschland) mit Raumluft beatmet. Das Tidalvolumen betrug zu diesem Zeitpunkt 150 µl/Atemzug, bei 90 Atemzügen/min, 50% Inspirationszeit und 3 cm Wassersäule positivem endexpiratorischem Druck (PEEP). Der vorgelegte Faden mit Knoten wurde nun festgezogen, um den Tubus in der Trachea zu fixieren.

2.4.5 Präparation des Herz- Lungen-Pakets

Durch sorgfältiges Entlüften des Schlauchsystems vor Beginn der Präparation sollten Luftembolien verhindert werden.

Nach Intubation wurden zwei waagerechte Schnitte unterhalb des Rippenbogens bis in beide Flanken hineingelegt. Der Processus xiphoideus wurde mit einer Pinzette angehoben, so dass man freie Sicht auf das Zwerchfell hatte. Dieses wurde mit der Pinzette stumpf beschädigt, um einen Pneumothorax zu erzeugen. Die kollabierten Lungen waren somit geschützt, während das Zwerchfell mit der Schere entlang des Rippenbogens abgetrennt wurde.

Jetzt wurde eine midsternale Thorakotomie durchgeführt, der Thorax zu beiden Seiten hin weggeklappt und mit Nadeln an der Korkplatte fixiert. Anschließend wurde der Thymus stumpf entfernt, damit die freie Sicht auf das Herz möglich war.

Mit der geschlossenen kleinen Schere wurde ein Loch in die Herzspitze des linken Ventrikels gestochen, welches später als Ausfluss fungierte. Aorta und Pulmonalarterie wurden daraufhin mit der gebogenen Pinzette unterfahren und mit chirurgischem Faden unterlegt. Auf der Ventralseite wurde anschließend ein doppelter Knoten vorgelegt. Durch einen Schnitt in den rechten Ventrikel konnte nun der Katheter in die Pulmonalarterie eingeführt werden und mit dem vorgelegten Faden fixiert werden. Zur Sicherheit wurden noch einige Knoten darübergerlegt. Jetzt wurde die Lunge mithilfe einer peristaltischen Infusionspumpe (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland, ODER ISM 597, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany) durch den Katheter mit dem Perfusat (Krebs-Henseleit Perfusat der Firma Serag-Wiessner, Naila, Deutschland, 120 mM NaCl; 4,3 mM KCl; 1,1 mM KH_2PO_4 , 24 mM NaHCO_3 ; 2,4 mM CaCl_2 ; 1,3 mM MgCl_2 , 13,32 mM Glucose und 5% [Gewicht/Volumen] Hydroxyethylamyllopectin [Molekulargewicht: 200,000]) durchspült. Bis zum Zeitpunkt des Einbringens des Abflusskatheters wurde, um eine Stauung zu vermeiden, in kurzen zeitlichen Abständen die kleine Schere in das Loch in der Herzspitze eingeführt und durch leichtes Öffnen derselben ein Abfluss des Perfusates ermöglicht. Die Perfusionsrate betrug zu diesem Zeitpunkt 0,2 ml/min bei einer Temperatur des Perfusats von 4°C (Kühlung: Frigomix® U-1 B Braun, Melsungen, Deutschland). Zeitgleich mit dem Anschließen des Perfusats wurde die Beatmung von Raumluft auf die Beatmung mit dem vorgemischten normoxischen Gasgemisch (Messer Griesheim, Herborn, Deutschland, mit 21% O_2 , 5,3% CO_2 , abgeglichen mit N_2) umgestellt.

Danach wurde die Lunge unter größter Vorsicht, ohne Unterbrechung der Ventilation oder Perfusion, herauspräpariert. Bei diesem Vorgang wurde jegliche Berührung des

Präparationsbestecks mit dem Lungengewebe vermieden. Hierfür wurden Aorta descendens und Vena cava durchtrennt und die Lunge nach und nach von der Wirbelsäule gelöst. War dies erfolgt, so war die Lunge nur noch über den Tubus fixiert und hing frei an der Wägezelle (Kent Scientific Cooperation Isometric Transducer), die zur Überwachung des Orgengewichts diente. Jetzt konnte der abführende Katheter in den linken Ventrikel eingeführt werden und der Druck im linken Ventrikel über den flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer (Combitrans® 1fach Set, Model II Uni Giessen, B Braun, Melsungen, Deutschland) registriert und auf 2,0 mmHg (pulmonalvenös) eingestellt werden. Der venöse Abfluss wurde hierfür auf einer entsprechenden Höhe fixiert. Die Abbildungen 2-1 und 2-2 sowie 2-3 zeigen beispielhaft den Versuchsaufbau.

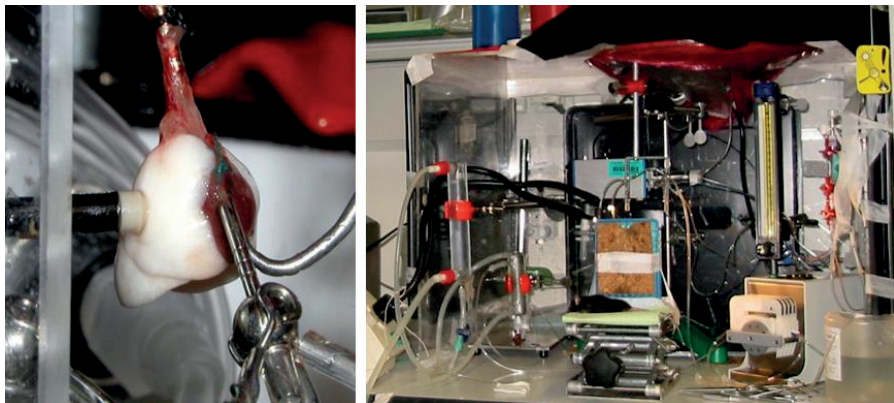


Abbildung 2-3 Links: Isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge nach Intubation und Sondierung der Pulmonalarterie (Erläuterungen im Text) Rechts: Komplettes Setup.

2.4.6 Steady-state-Phase

Nachdem die Lunge nun vollständig in den künstlichen Kreislauf integriert war, wurde sie mit circa 20 ml Perfusat durchgespült. Dabei wurde die Temperatur des Perfusats nach und nach auf 37,5°C (Temperaturregulator: Thermomix® BM Braun, Melsungen, Deutschland) erhöht und auch die Perfusionsrate wurde von 0,2 auf 2 ml/min gesteigert. Außerdem wurde das Atemzugvolumen langsam auf 300 µl/Atemzug erhöht. Waren alle diese Werte erreicht, wurde das System justiert und das Perfusat mit einem Gesamtvolumen von 15 ml konnte in einem geschlossenen Kreislauf rezirkulieren. Es folgte eine pH-Wertkontrolle, wobei der gewünschte Wert im Bereich von 7,37 bis 7,40 liegen sollte.

Vor jedem Versuch erfolgte eine 20-minütige steady-state-Phase, in der die Lunge im geschlossenen System perfundiert und normoxisch beatmet wurde. Um die benötigte Stabilität des Präparates zu gewährleisten, wurden Gewicht, pulmonararterieller Druck, linksventrikulärer Druck und Perfusionsdruck der Lungen aufgezeichnet und auf ihre Konstanz überwacht.

2.4.7 Einschlusskriterien

- 1) Die Lunge zeigte eine homogen weiße Oberfläche ohne Zeichen von Ödemen oder Atelektasen
- 2) Der normoxische pulmonalarterielle Druck, sowie der Beatmungsdruck lagen im Normbereich
- 3) Konstantes Organgewicht während der 20-minütigen steady-state-Phase

2.4.8 Druck- und Gewichtsregistrierung

Nach Ein-Punkt Kalibrierung der Druckaufnehmer gegen atmosphärischen Druck wurden die Dreivegeähne umgestellt, das von ihnen erzeugte, analoge Signal verstärkt (Verstärker: World Precision Instruments, Transbridge 4M, Transducer Amplifier Module Hans Sachs Elektronik, March- Hugstetten, Deutschland) und von der Wandlerkarte im PC in ein digitales Signal umgewandelt. Der linksventrikuläre und der pulmonalarterielle Druck wurden durch die flüssigkeitsgefüllte Druckaufnehmer aufgezeichnet, während der Beatmungsdruck durch einen luftgefüllten Druckaufnehmer registriert wurde. Die Aufzeichnung erfolgte zunächst zur Kontrolle der Druckwerte während des Aufwärmens. Nachdem *steady-state* Bedingungen für den Versuch erreicht waren, wurde das System neu gestartet und danach wurde mit der Aufzeichnung des Versuches begonnen.

2.4.9 Applikation von CO

Die Applikation von CO erfolgte als Gasgemisch mit Hilfe einer großen, luftundurchlässigen Glasspritze, die über einen Schlauch mit der Ventilationspumpe verbunden war. Darin wurde das für die Versuche jeweils benötigte Verhältnis von Kohlenmonoxid zu Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid gemischt. Diese Gase wurden jeweils aus 150 l Gasflaschen über einen Schlauch in die Spritze gefüllt.

2.4.10 Sicherheitsvorkehrungen

Um vor einer möglichen CO-Exposition zu schützen, wurden die Versuche in einer abgedichteten Plexiglasbox durchgeführt. Die vordere Scheibe war herausnehmbar, so dass die Mäuselungen innerhalb der Box präpariert und manipuliert werden konnten. Während der CO-Applikation wurde die Scheibe wieder eingesetzt. Zusätzlich befand sich das gesamte Setup unter einem Abzug, der ebenfalls während der Versuche eingeschaltet wurde.

Zur sicherheitsmäßigen Überwachung und Kontrolle wurde mit einem CO-Messgerät mit Prüfröhrchen der CO-Gehalt im System sowie in der Außenluft gemessen.

2.5 Remissionsspektrometrie

2.5.1 Grundlagen der Remissionsspektrometrie

Mit Hilfe der Remissionsspektrometrie können die Redox-Zustände von mitochondrialen Cytochromen *in situ* an der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge beobachtet werden, so dass Auswirkungen auf diese am intakten Organ direkt beobachtet werden können. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass Cytochrome, je nachdem in welchem Redox-Zustand sie sich befinden, Licht spezifischer Wellenlänge absorbieren. Die Absorption verschiedener Wellenlängen kann als Wellenlängen-Intensitäts-Diagramm dargestellt werden (Spektrum). Das Eisenatom der Hämgruppe der Cytochrome kann dabei reduziert sein (Fe^{2+}) oder nach Abgabe eines Elektrons oxidiert (Fe^{3+}), und die Cytochrome ein entsprechendes reduziertes oder oxidiertes Absorptionsspektrum aufweisen (s.o.). Durch den Vergleich der beiden Spektren, was durch Subtraktion des oxidierten Spektrums vom reduzierten Spektrum (Differenzspektrum) geschieht, kann die Veränderung des Redox-Zustandes evaluiert werden. Um die Absorptionseigenschaften der Cytochrome erfassen und analysieren zu können, wird die wellenlängenabhängige Intensität von in das Gewebe gesendetem Weißlicht („Weißlichtspektrum“) mit der Intensität des remittierten Licht aus dem Gewebe verglichen („Remissionsspektrum“). Dies geschieht durch eine senkrecht zur Lungenoberfläche aufgebrachten optischen Mikrosonde (bestehend aus Glasfasern, die das Licht in das Gewebe leiten, und das detektierte Licht vom Gewebe zu der Messeinheit.). Aus mit dem Weißlichtspektrum korrigierten Remissionsspektren vor und nach einem bestimmten Stimulus (z.B. Inhalation von Hypoxie oder CO) können Differenzspektren berechnet werden. Die Tiefe der Messung hängt ab von der Distanz

zwischen Beleuchtungs- und Detektionsbereich der optischen Fasern der Sonde und beträgt bei dem Aufbau dieses Versuches wenige Millimeter.

2.5.2 Messung der Redox-Zustände

Die Messungen der Remissionsdifferenzspektren wurden mittels eines spektrophotometrischen Systems unter Benutzung eines CytoSPEC II (LEA Medizintechnik, Gießen, Deutschland) durchgeführt. Dieses System besteht aus einer Weißlichtquelle (395-670 nm) zur Illumination und einem Spektrometer (Detektionsbereich von 390-650 nm; optische Auflösung von 1,5 nm) für die Detektion und Messung der wellenlängenabhängigen Intensität des Lichtes. Die Spektren wurden mit einer Rate von 3-800 ms akquiriert und über einen Zeitraum von 1 min gemittelt, um Bewegungsartefakte durch die Ventilation zu minimieren (durch die In- und Expiration entstehen unterschiedliche Gewebedichten mit unterschiedlicher Absorption).

Die Berechnung der Differenzspektren erfolgte mit Hilfe der CytoSPEC II Software (LEA Medizintechnik, Gießen, Deutschland) durch Subtraktion der normoxischen Spektren von den hypoxischen Spektren, sowie durch Subtraktion von Spektren, die während normoxischer Ventilation ohne CO (21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) aufgenommen wurden, von solchen Spektren, die während der Ventilation von CO in normoxischen (10% CO, 21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) oder hypoxischen (10% CO, 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) Gasgemischen aufgezeichnet wurden. Die resultierenden Differenzspektren reflektieren somit die durch HOX oder CO ausgelösten spektrometrischen Veränderungen und sind ein Ergebnis der Interaktion von CO mit verschiedenen Chromophoren. Folgende mitochondriale Cytochrome können mit dieser Methode gemessen werden: Cytochrom aa₃ (Absorptionsmaximum des Differenzspektrums: 445/603/605 nm), Cytochrom b_{lh} (430/563 nm) und Cytochrom c (420/550 nm). Zu weiteren Chromophoren, die neben mitochondrialen Cytochromen charakteristische spektrometrische Veränderungen in dem gemessenen Wellenlängenbereich durch CO-Bindung zeigen, gehören CYP450 (Absorptionsmaximum des reduzierten Komplexes bei Bindung von CO: 450 nm) und Hämoglobin. Die Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über die Absorptionsmaxima der verschiedenen Cytochrome.

Bei der Messung von Cytochromen im Gewebe wird die Summe aller messbaren Cytochrome in einem Spektrum dargestellt („Summationsspektrum“). Um Veränderungen der einzelnen Cytochrome voneinander zu unterscheiden, wurden die gemessenen Differenzspektren mit bekannten Differenzspektren („Referenzspektren“) der einzelnen Cytochrome verglichen. Des Weiteren wurden Standardspektren durch die Zugabe von Zyanid ins Perfusat erzeugt (selektive

Reduktion der mitochondrialen Cytochrome) oder durch Applikation hoher Konzentrationen von CO oder Hämoglobin, um Referenzspektren für CYP450 oder Hämoglobin zu erzeugen. Um allerdings den Einfluss von Hämoglobin während der Experimente zu minimieren, welches eine überlappendes Absorptionsspektrum mit dem mitochondrialen Cytochrom b_{1/h} aufweist, wurde die Lunge mit Perfusat durchspült, bis das Hämoglobinspektrum nicht mehr detektierbar war. Jedoch konnte eine völlige Elimination von Hämoglobin nicht immer erreicht werden.

Zur semiquantitativen Analyse der Redox-Zustände der einzelnen Cytochrome wurde die „Methode der kleinsten Quadrate“ angewendet (*method of least square fitting*). Dabei wird durch Multiplikation der Funktionen der Einzelspektren eine Funktion erzeugt, die jeweils den kleinstmöglichen Abstand zu den einzelnen Datenpunkten des gemessenen Spektrums hat. Die bekannten Absorptionsspektren (= Referenzspektren) der jeweiligen Cytochrome konnten hiermit den gemessenen Differenzspektren zugeordnet („gefitter“) werden (TechPlot, Sftek, Braunschweig, Germany).

Mit dieser Technik konnten für diese Arbeit relative Redox-Veränderungen der mitochondrialen Cytochrome während alveolärer Hypoxie, und die CO-Bindung an CYP450 bestimmt werden.

Cytochrom	Absorptionmaxima
Cytochrom aa3	445/603/605 nm
Cytochrom b _{1/h}	430/563 nm
Cytochrom c	420/550 nm
CYP450	450 nm
HbCO	423/525/565 nm
MbCO	421/540/580 nm
sGC-CO	423/541/567 nm

Tabelle 2-1: Verschiedene Cytochrome und ihre Absorptionsmaxima

2.5.3 Experimentelle Vorgehensweise

Die Differenzspektren wurden folgendermaßen ermittelt: Weißlicht-korrigierte Remissionspektren wurden zunächst über eine Minute vor dem Umschalten auf hypoxische Beatmung gemittelt (Spektrum 1), dann gemittelt über die fünfte Minute nach dem Umschalten auf

Hypoxie (Spektrum 2), dann gemittelt über die Minute vor dem Umschalten auf Normoxie (Spektrum 3) und schließlich gemittelt über die fünfte Minute nach Umschalten auf Normoxie (Spektrum 4). Die Differenzspektren wurden berechnet, indem Spektrum 1 von Spektrum 2 und Spektrum 4 von Spektrum 3 subtrahiert wurden. Beide resultierenden Differenzspektren wurden wiederum gemittelt, woraus sich das endgültige Differenzspektrum des spezifischen hypoxischen Zustandes ergab. Diese Prozedur erlaubte Korrekturen von möglichen zeitabhängigen Einflüssen auf spektrale Veränderungen, da das normoxische Spektrum vor der Hypoxie (Spektrum 1) als auch das nach der Hypoxie (Spektrum 4) vom hypoxischen Spektrum subtrahiert wurde.

2.5.4 Störfaktoren

Bei der Remissionsspektrometrie im Gewebe wird das gemessene Spektrum nicht nur durch Absorption des Lichts beeinflusst, sondern auch durch wellenlängenabhängige Streuung und durch Reflektion an Grenzflächen, z.B. zwischen Kompartimenten mit hohem vs. niedrigem Wasseranteil. In der Lunge ändert sich die Dichte von Streupartikeln und Absorptionspartikeln mit den Atemexkursionen und durch Ödembildung. Wenn sich die Streueigenschaften, Reflektion und Gewebedichte nicht ändern, dann sind sie während Normoxie und Hypoxie konstant und können so durch Berechnung des Differenzspektrum aus dem gemessenen Spektrum eliminiert werden. Das Differenzspektrum spiegelt dann nur die Absorption des Gewebes wieder. Wie oben beschrieben wurden, um den Einfluss der Ventilation zu eliminieren, die Spektren über eine Minute gemittelt, sowie Differenzspektren jeweils vor und nach Umschalten auf Hypoxie gemittelt. Veränderungen durch starke Wassereinlagerungen (Ödembildung der Lunge) können allerdings trotzdem zu Artefakten im den Verlauf der Messung führen, die sich durch eine charakteristische Änderung des Remissionsspektrums auszeichnet und bei der Auswertung berücksichtigt wurde (Messungen mit starken Streuveränderungen durch Wassereinlagerungen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, bzw. in dem Ergebnisteil entsprechend bewertet).

2.6 Verwendete Substanzen und Applikationsmodi

2.6.1 Substanzen

2.6.1.1 CO

CO ist eine Verbindung aus Kohlenstoff und Sauerstoff mit der Summenformel CO. Es ist ein farb-, geruch- und geschmackloses sowie toxisches Gas.

2.6.1.2 Sulfaphenazole

Molekulargewicht: 314,36

Formel: C₁₅H₁₄N₄O₂S

Sulfaphenazole ist ein Sulfonamid-Bakteriostatikum und bekannt als CYP450-Inhibitor¹²⁷.

2.6.1.3 U-46619

Die Substanz U-46619 (9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F2 α) ist als Standardverfahren zur Induktion einer Vasokonstriktion bekannt¹²⁸⁻¹³¹. Es handelt sich um ein Thromboxan-A2-Mimetikum. Thromboxan-A2 bewirkt an seinem G-Protein gekoppelten membranständigen Rezeptor im Zusammenspiel mit Inositol (1,4,5)-triphosphat eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration^{132, 133}. In glatten Muskelzellen führt dies zu einer Vasokonstriktion. Es wurde als Kontrolle für das allgemeine vasokonstriktive Potential der Lungengefäße verwendet.

2.6.1.4 KCl

Kaliumchlorid bewirkt eine Kontraktion glatter Muskelzellen. Eine extrazelluläre K⁺-Erhöhung durch KCl-Gabe depolarisiert die Zellmembranen der PSMC, wodurch es zu einem Ca²⁺-Einstrom und konsekutiver Kontraktion kommt. Es wurde, genau wie U- 46619, benutzt, um eine pulmonale Vasokonstriktion zu induzieren und diente als Kontrolle für die Versuche der HPV.

2.6.1.5 [RU(CO)₃Cl₂]₂ (CORM-2)

Tricarbonyldichlororuthenium ist eine Metallkomplexbindung mit Ruthenium als zentralem Atom. Das Molekül ist in der Lage, CO abzugeben und gehört somit zu der Gruppe der CO releasing molecules (CORM-2). Es ist in organischen Lösungsmitteln löslich und wird für die Versuche in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, bevor es dann zu wässrigen biologischen

Lösungen oder Puffer gegeben wird. Unter physiologischen Bedingungen besitzt es eine recht kurze Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der CO-Freisetzung von circa 1 min. Aufgrund der schlechten Löslichkeit und der kurzen Halbwertszeit wurde die Substanz optimiert, und CORM-3 entwickelt.

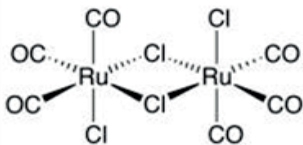


Abbildung 2-4 $[Ru(CO)_3Cl]_2$ (CORM-2)

2.6.1.6 $Ru(CO)_3Cl(\text{glycinate})$ (CORM-3)

Tricarbonylchloro(glycinate)ruthenium(II) ist ein CORM neuerer Generation, welches durch Inkorporation von kovalent gebundenem Glycin an den $Ru(CO)_3$ -Kern chemisch modifiziert wurde, um eine bessere Wasserlöslichkeit zu gewähren¹⁰¹. Clark et al. nahmen eine genauere Charakterisierung von CORM-3 vor. Demnach bleibt es über 24 h stabil in 37 °C temperierten Wasser (CORM-3, welches in Wasser gelöst wurde und über 24 h bei Raumtemperatur gelagert wurde, behielt seine Fähigkeit CO freizusetzen. Dies wurde spektrometrisch über die Konversion von Deoxymyoglobin zu Carboxymyoglobin (MbCO) gemessen, wie bereits von Motterlini beschrieben⁹⁹). In physiologischen Lösungen und biologischen Flüssigkeiten wie Phosphatpufferlösung (PBS), Krebs-Henseleit, Zellkulturmedien und humanem Blutplasma dagegen setzt CORM-3 CO frei. In allen getesteten Lösungen mit einem pH von 7,4 wurde ein Mol Äquivalent CO freigesetzt ($t_{1/2} = 4$ bis 18 Minuten)^{100, 134}.

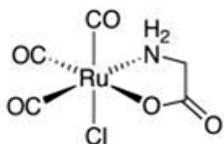


Abbildung 2-5 $Ru(CO)_3Cl(\text{glycinate})$ (CORM-3)

2.6.2 Versuchsgruppen

Für einen Überblick über die in den Versuchen verwendeten Gasgemischen siehe Tabelle 2-6.

- Kontrollgruppe: Normoxische/hypoxische Beatmung im Wechsel
- CO-Gruppe: Normoxische/hypoxische Beatmung im Wechsel mit Applikation von CO

- U-46619-Kontrollen: Durch U-46619 ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO-Manipulation
- KCl-Kontrollen: Durch KCl ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO-Manipulation
- Sulfaphenazole-Gruppe: Normoxische/hypoxische Beatmung im Wechsel mit Applikation von Sulfaphenazole in steigenden Konzentrationen
- $[\text{RU}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ /RUCO-Gruppe: Normoxische/hypoxische Beatmung im Wechsel mit Applikation von CORM-2 und dessen inaktiver Form
- $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ -Gruppe: Normoxische/hypoxische Beatmung im Wechsel mit Applikation von CORM-3 und dessen inaktiver Form

Beatmung	Anteil O ₂ (%)	Anteil CO ₂ (%)	Anteil N ₂ (%)	Anteil CO (%)
Normoxisch	21	5,3	Rest	0
Hypoxisch	1	5,3	Rest	0
10% CO normoxisch	21	5,3	Rest	10
10% CO hypoxisch	1	5,3	Rest	10

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der in den Versuchen verwendeten Gasgemische

2.6.3 Versuchsablauf

Die Lungen wurden entweder blutfrei mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert oder mit Perfusat, welches 1% bovine Erythrozyten enthielt.

Zu jedem Zeitpunkt während der Versuche wurde der PAP, der pulmonalvenöse Druck, der Ventilationsdruck, das Gewicht der Lunge und die Cytochromspektren aufgezeichnet.

Die Lunge wurde abwechselnd normoxisch und hypoxisch (alternativ anoxisch) beatmet, wobei die normoxischen Perioden jeweils 15 Minuten betragen und die hypoxischen (anoxischen) jeweils 10 Minuten.

Bei allen Versuchen erfolgte die kontinuierliche spektrometrische Messung der Absorptionsspektren der verschiedenen Cytochrome, für welche die Sonde auf der Oberfläche der Lunge aufgelegt und fixiert wurde.

2.6.3.1 Kontrollversuche mit hypoxischer Beatmung

Bei diesen Versuchen wurde die Lunge nach oben beschriebenen Schema über einen Zeitraum von 125 min abwechselnd jeweils 15 min normoxisch und 10 min hypoxisch beatmet. Mittels eines Dreiwegehahnes wurde jeweils übergangslos zwischen normoxischer und hypoxischer Beatmung umgestellt (Abb. 2-6).

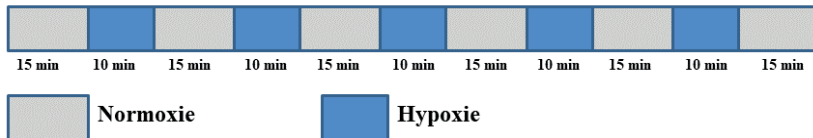


Abbildung 2-6: Kontrollgruppe: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.2 Versuche mit CO

Nach zwei hypoxischen Beatmungsphasen folgte in der dritten und vierten hypoxischen Phase die Manipulation der CO-Konzentration oder alternativ Gabe der anderen verwendeten Substanzen. Die Beatmung mit CO erfolgte dabei bereits in der normoxischen Phase für 5 Minuten und während der gesamten 10 Minuten der hypoxischen Phase. Am Ende erfolgte noch eine letzte, allein hypoxische, 10-minütige Beatmung zur Kontrolle (Abb. 2-7).

Die Applikation des Kohlenmonoxidgasgemisches erfolgte wie unter 2.4.9 beschrieben.

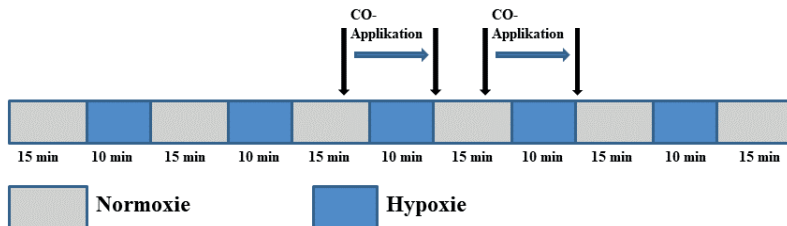


Abbildung 2-7 Applikation von CO während normoxischer und hypoxischer Ventilation (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.3 Kontrollversuche mit U-46619

Als weitere Kontrollversuche wurden Versuche durchgeführt, in denen statt einer hypoxischen Beatmung die Gabe der Substanz U-46619 erfolgte, um eine Vasokonstriktion zu erzeugen. Diese Kontrollversuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob CO selektiv auf die HPV wirkte und einen unspezifischen Einfluss auf die Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße ausübte.

Zunächst wurde U-46619 in einem Verhältnis von 2:1 in DMSO gelöst und anschließend mit Perfusat auf eine Konzentration von 1,5 nM verdünnt (entsprechend einer Konzentration von 0,06 µg/ml im Perfusat). Von dieser Lösung wurde 1 ml als Bolus über einen Bypass mit einer 1 ml Spritze in den pulmonalarteriellen Schenkel des Perfusionsystems gespritzt. Für den Zeitraum unmittelbar nach der Applikation wurde das Perfusat aus dem venösen Schenkel des Systems ablaufen gelassen, so dass das U-46619 nicht in die Rezirkulation aufgenommen wurde. Dieses Manöver wurde alle 25 min wiederholt.

Es erfolgten gemäß dem oben beschriebenen Schema jeweils zwei Bolusgaben von U-46619 zur Induktion einer Vasokonstriktion ohne CO-Gabe. Für die 3. und 4. Gabe von U-46619 unter Anwesenheit von CO galt das gleiche Applikationsschema wie oben beschrieben. Allerdings erfolgten 5 Minuten vor der Bolusgabe von U46619 eine Ventilation mit CO, die im Anschluss nach der Bolusgabe noch für 10 Minuten weitergeführt wurde (Abb. 2-8).

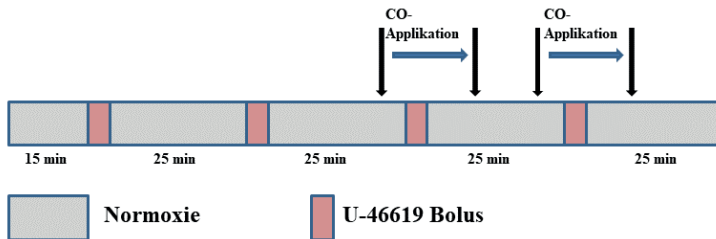


Abbildung 2-8: Durch U-46619 ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO-Applikation (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.4 Kontrollversuche mit KCl

Auch die KCl-Bolusgabe zur Stimulation einer Hypoxie-unabhängigen Vasokonstriktion erfolgte zur Kontrolle der Wirkung von CO auf die HPV. Die KCl-Bolusgabe erfolgte analog zu der des Bolus mit U-46619 über den Bypass unter Verwendung einer 1 ml Spritze. Das Volumen von 0,75 ml einer 0,15 M KCl-Lösung als Bolus wurde alle 25 min über den pulmonalen Schenkel verabreicht und führte zu einer Vasokonstriktion, die der Stärke der HPV zu Beginn eines jeweiligen Experiments glich (Abb. 2-9).

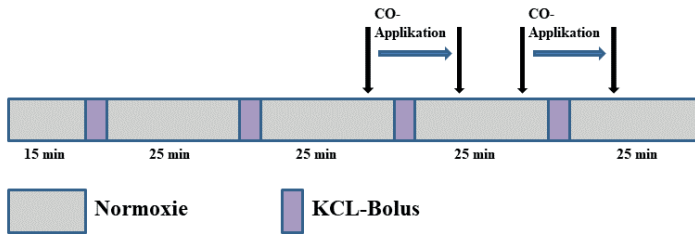


Abbildung 2-9: Durch KCl ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO-Applikation (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.5 Versuche mit Sulfaphenazole

Nach den beiden initialen Hypoxiephasen, wurde jeweils 5 min vor der hypoxischen Beatmung Sulfaphenazole, gelöst in DMSO, in das Reservoirgefäß zum Perfusat gegeben. Insgesamt wurden drei Sulfaphenazolegaben in steigender Konzentration vorgenommen. Die Menge wurde so gewählt, dass bei der ersten Gabe eine Konzentration von 1 mM im Perfusat erreicht wurde, bei der zweiten Gabe 2 mM und bei der dritten Gabe 4 mM (Abb. 2-10).

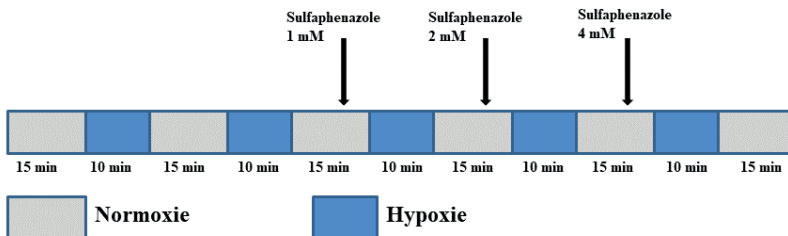


Abbildung 2-10: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit Applikation von Sulfaphenazole in steigenden Konzentrationen (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.6 Versuche mit CORMs

Für diese Versuchsreihe wurde frisch zubereitetes $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (CORM-2) und $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ (CORM-3) oder deren jeweilige inaktive Form (inaktiviertes CORM-2: CORM-2 und inaktiviertes CORM-3: iCORM-3) anstatt der Ventilation mit CO in das Perfusat pipettiert. Dies geschah nach einer initialen reinen hypoxischen Phase entweder jeweils 5 Minuten vor der Hypoxiephase in steigenden Konzentrationen oder einmalig 5 Minuten vor repetitiven hypoxischen Ventilationen. Letztere Versuche wurden durchgeführt, um eine mögliche intrazelluläre Akkumulation der CORMs zu untersuchen. Hierfür wurden nach einer

einmaligen Gabe von 50 und 500 μM CORM-3 oder iCORM-3 mehrere alternierende Perioden normoxischer und hypoxischer Ventilation vorgenommen (Abb. 2-11 und 2-12).

Die inaktiven Formen von CORM-2 und CORM-3 wurden durch 24-stündige Begasung der jeweiligen CORMs mit N_2 generiert (von Motterlini etabliert und in vorherigen Untersuchungen mehrfach so durchgeführt)¹³⁵⁻¹³⁸.

CORM-2 wurde in DMSO aufgelöst und CORM-3 in Wasser.

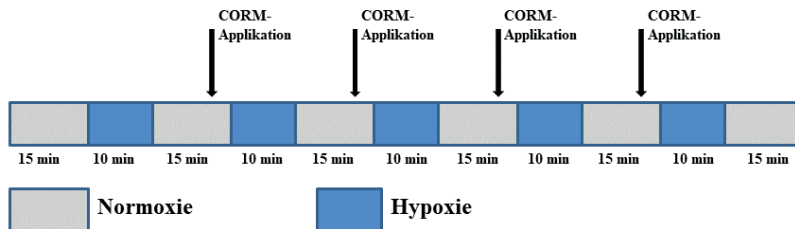


Abbildung 2-11: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit Applikation von CORM-2 oder CORM-3 oder deren inaktiver Form (s.o. für genaue Beschreibung)

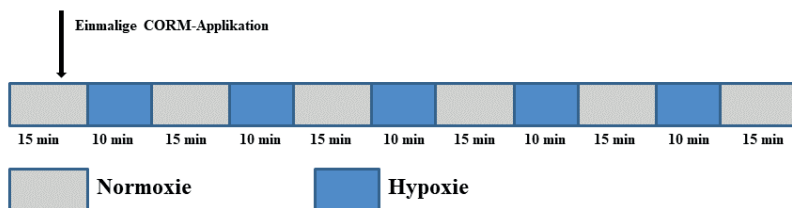


Abbildung 2-12: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit einmaliger Applikation von CORM-2 oder CORM-3 oder deren inaktiver Form (s.o. für genaue Beschreibung)

2.6.3.7 Versuche zur Analyse der CO-Freisetzung durch die CORMs

Zur Erfassung der Kinetik der CO-Freisetzung durch die CORMs wurden Referenzspektren von hämoglobingebundenem CO zu Hilfe genommen. Hierzu wurde Perfusat, welches 1% Erythrozyten enthält, in einem luftgeschlossenen Kammer-System spektrometrisch untersucht. Dieses System bestand aus dem oben beschriebenen CytoSpec II, das über eine Spezialsonde in der luft- und lichtdichten Kammer eines Oroboros O2k Respirometers (Oroboros, Innsbruck,

Österreich) die Spektren der Perfusat/Erythrozytenmischung bestimmte. Dieses Setup wurde bereits zur Messung von spektrometrischen Veränderungen in Zellsuspensionen verwendet⁶⁶.

Von dem erythrozytenhaltigem Perfusat wurden Differenzspektren der Spektren vor und nach Gabe der jeweiligen CORMs bestimmt. Somit reflektieren die spektrometrischen Veränderungen nach der Gabe der CORMs die CO-induzierten Veränderungen, die durch die veränderte Absorption von CO-gebundenem Hämoglobin im Vergleich zu CO-freiem Hämoglobin entstanden sind. Daraus konnten Rückschlüsse über die Freisetzung von CO aus den CORMs gezogen werden. Die semiquantitative Analyse erfolgte durch die Darstellung der von der CytoSpec II- Software errechneten Differenzspektren. Als Kontrolle dienten iCORMs, um unspezifische Absorptionsänderungen der CORM-Trägersubstanz zu untersuchen.

2.7 Auswertung der Parameter

Delta PAP (Δ PAP): Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes in mmHg während der hypoxischen Ventilation bezogen auf den Druck während der normoxischen Ventilation (gemittelt in der Minute 3-4 vor Beginn der hypoxischen Ventilation) als Maß für die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV).

In den Versuchen mit zwei vorangehenden Kontroll-Hypoxien wurde immer die 2. HOX als Referenz-HOX für die HOX unter Substanzgabe herangezogen.

2.8 Statistische Auswertung

Die in der Arbeit gezeigten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, kurz: sem) dargestellt.

Zur Auswertung aller Daten wurde ein two-way-ANOVA mit Bonferoni's *post hoc* Test durchgeführt, lediglich für den Vergleich des Effekts von CO auf die U-46619- und die KCl-induzierte Vasokonstriktion wurde der *Student's paired t-test* angewendet. Für die Analyse wurde die Software Graph Pad Prism 5 benutzt.

Als Signifikanzniveaus wurden definiert:

$p \leq 0,05 \rightarrow *$

$p \leq 0,01 \rightarrow **$

$p \leq 0,001 \rightarrow ***$

Die Anzahl der Versuche wird mit „n“ angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CO auf den pulmonalen Gefäßtonus

3.1.1 Einfluss von CO auf den pulmonalvaskulären Gefäßtonus während normoxischer und hypoxischer Ventilation

Ventilation mit 10% CO während normoxischer Beatmung (10% CO, 21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) bewirkte eine Verringerung des PAP und führte während hypoxischer Beatmung (10% CO, 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) zu einer signifikanten Einschränkung der HPV (Abb. 3-2).

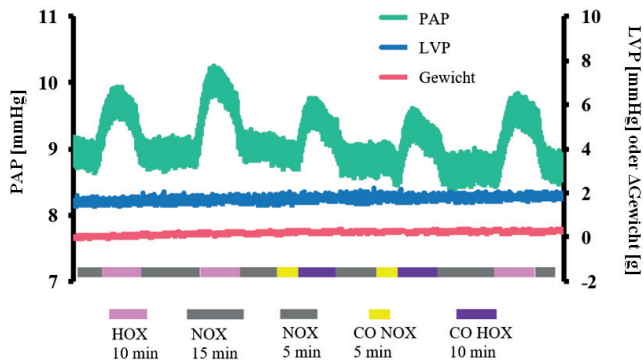


Abbildung 3-1: Repräsentatives Experiment mit Inhalation von 10 % CO während normoxischer und hypoxischer Ventilation in der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge. Der pulmonalarterielle Druck (PAP), der linksventrikuläre Druck (LVP) in mmHg und Veränderungen im Gewicht der Lunge (ΔGewicht) in gramm wurden kontinuierlich gemessen. NOX: 21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂; HOX: 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂

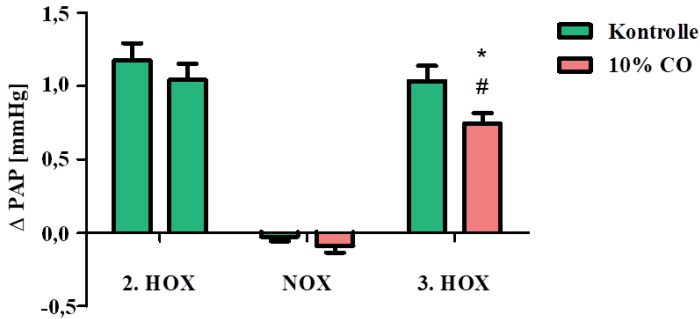


Abbildung 3-2: Effekt von 10% CO auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) während normoxischer (NOX) und hypoxischer Ventilation (HOX), verglichen mit dem PAP ohne CO Inhalation (Kontrolle). Das erste abgebildete HOX Manöver erfolgte in beiden Gruppen ohne CO. n=13-15 Lungen in jeder Gruppe, *p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, # p < 0,05 im Vergleich zur ersten HOX ohne CO. NOX: 21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂; HOX: 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂

3.1.2 Wirkung von CO auf die durch U-46619- und KCl-induzierten Vasokonstriktion

Ventilation mit 10% CO in der isolierten ventiliert-perfundierten Mauslunge verminderte auch die durch U-46619 ausgelöste Vasokonstriktion, nicht aber jene, welche durch KCl verursacht wurde (Abb. 3-3).

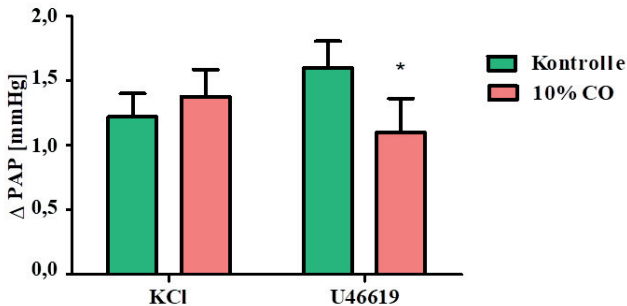


Abbildung 3-3: Effekt von inhaliertem CO auf die durch KCl und U-46619 ausgelöste Vasokonstriktion. Das erste durchgeführte Manöver wurde in beiden Gruppen ohne CO durchgeführt; n=5 Lungen in jeder Gruppe. *p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle. CO HOX: hypoxische Ventilation mit 10% CO (10% CO, 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂), CO NOX: normoxische Ventilation mit 10% CO (10% CO, 21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂).

3.1.3 Vergleich zu der Wirkung von Sulfaphenazole auf den pulmonalen Gefäßtonus

Die Inhibierung von CYP450 durch Sulfaphenazole führte zu einer pulmonalen Vasorelaxation während Normoxie. Auch eine Abschwächung der HPV konnte detektiert werden. Es konnte zudem auch eine Abschwächung der durch das Thromboxanalogon U-46619 ausgelösten Vasokonstriktion ermittelt werden.

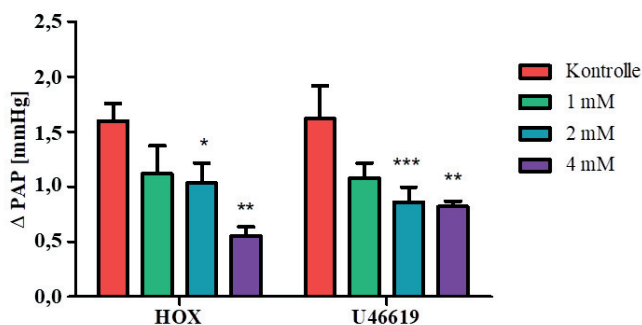


Abbildung 3-4: Applikation von Sulfaphenazole: Effekt verschiedener Konzentrationen von Sulfaphenazole auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) während hypoxischer Beatmung und während der Gabe von U-46619. n= 5-6 Lungen in jeder Gruppe

3.2 Wirkung von CORMs auf den pulmonalvaskulären Tonus

3.2.1 Freisetzung von CO durch die CORMs in hämoglobinhaltigem Perfusat

Die Applikation von CORM-2 und CORM-3 in Konzentrationen von 500 μ M bis 1 mM resultierte in signifikanten spektrometrischen Veränderungen wie sie typischerweise bei CO-gebundenem Hämoglobin vorliegen, zu erkennen an einer zunehmenden Absorption im Bereich von 580 nm bei steigenden Konzentrationen von sowohl CORM-2 als auch CORM-3 (Abb. 3-5 A und B für CORM-2 und Abb. 3-6 A und B für CORM-3). Das deutete daraufhin, dass es bei diesen Konzentrationen zu einer signifikanten CO-Freisetzung gekommen ist. Auch iCORMs zeigten leichte Absorptionsänderungen, die sich in der Intensität allerdings deutlich von den CORMs unterschieden.

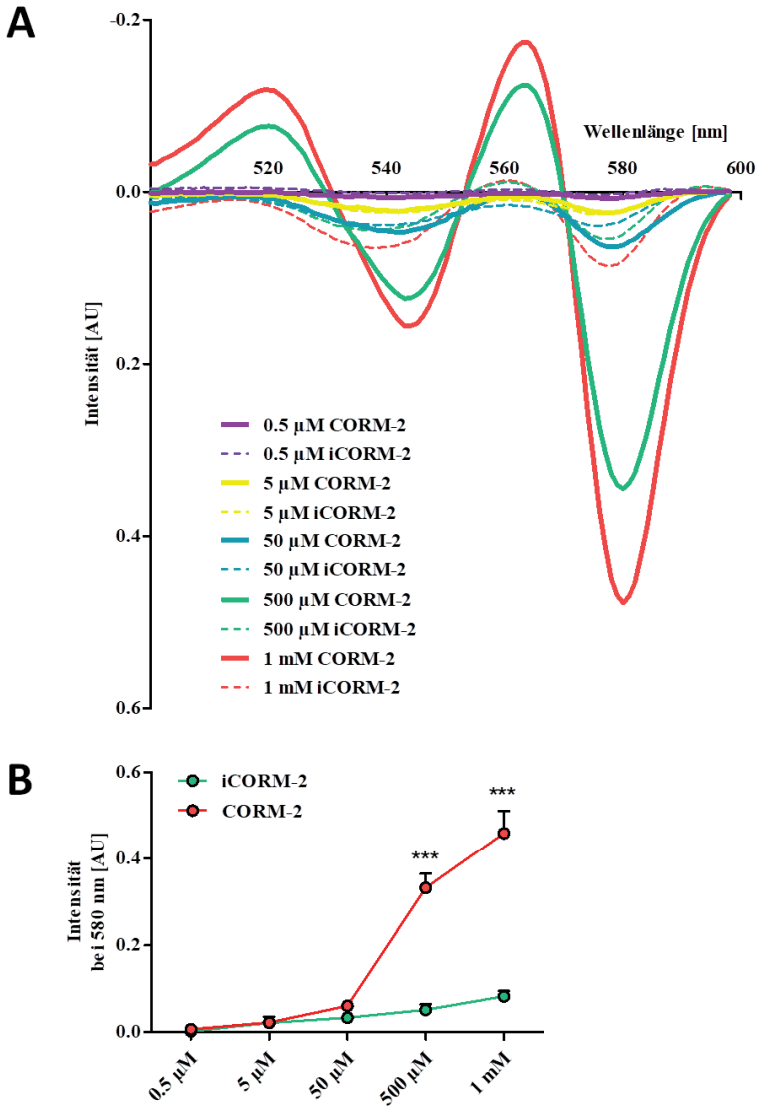


Abbildung 3-5: Freisetzung von CO durch CORMs im Perfusat/Erythrozytengemisch *in vitro*. **A:** Spektrometrische Veränderungen nach Applikation verschiedener Konzentrationen von CORM-2 und dessen inaktive Form iCORM-2 in das Perfusat mit Erythrozyten; n= 5-6 wiederholte Messungen in jeder Gruppe. **B:** spektrometrische Veränderungen, quantifiziert als Intensität bei 580 nm während der Applikation von CORM-2 und dessen inaktiver Form iCORM-2; n=5-6 wiederholte Messungen in jeder Gruppe, ***p < 0,001

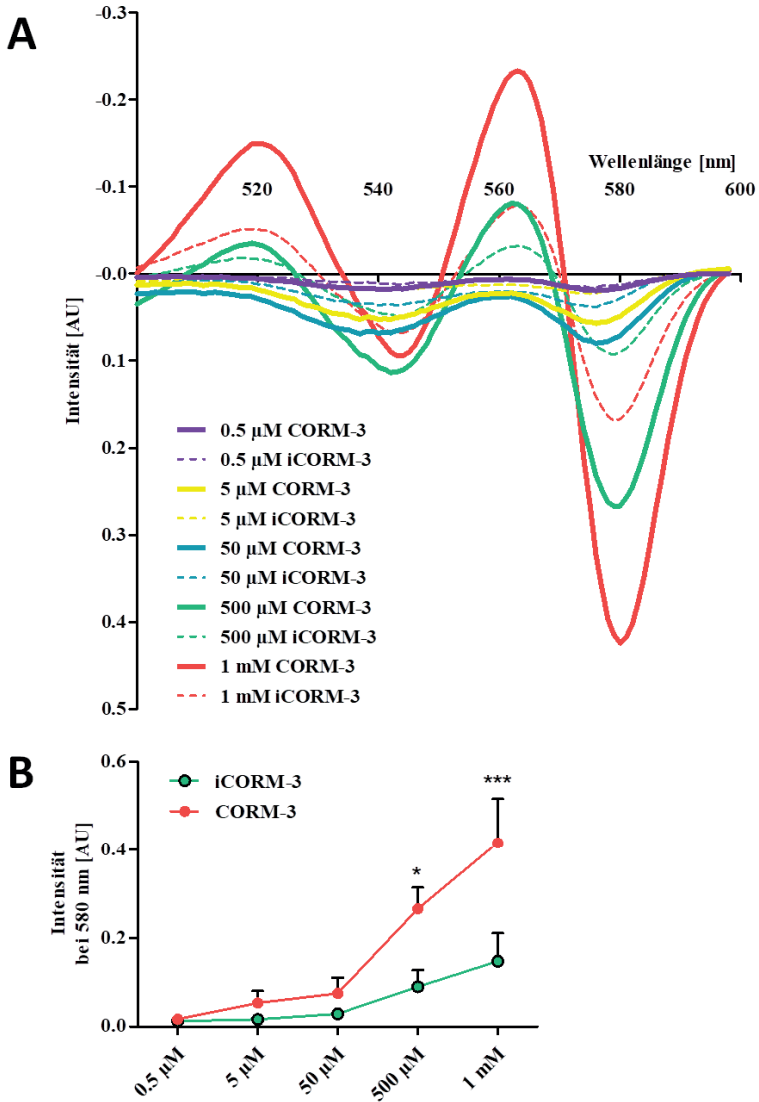


Abbildung 3-6: Freisetzung von CO durch CORMs im Perfusat/ Erythrozytengemisch *in vitro*. **A:** spektrometrische Veränderungen nach Applikation verschiedener Konzentrationen von CORM-3 und dessen inaktive Form iCORM-3 in das Perfusat; n= 5 wiederholte Messungen in jeder Gruppe. **B:** spektrometrische Veränderungen quantifiziert als Intensität bei 580 nm während der Applikation von CORM-2 und dessen inaktiver Form iCORM-2 n= 5 wiederholte Messungen in jeder Gruppe, *p < 0,05 und ***p < 0,001

3.2.2 Einfluss von CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus in erythrozytenfreier Pufferlösung

Perfusion mit steigenden Dosen bis zu maximal 500 μM von sowohl CORM-2 und CORM-3 als auch deren inaktive Formen (iCORM-2 und iCORM-3) resultierten in einem dauerhaften Anstieg des PAP während normoxischer Ventilation (21% O_2 , 5% CO_2 , Rest N_2 ; Abbildungen 3-7 A und 3-8 A). Dieser Anstieg war in den CORM-3 behandelten Lungen stärker ausgeprägt als in den iCORM-3 behandelten Lungen (Abbildung 3-8 A). Weder die Gabe von CORM-2, CORM-3 oder derer inaktiven Formen hatten einen Einfluss auf den pulmonalvaskulären Tonus während Hypoxie (1% O_2 , 5% CO_2 , Rest N_2). Jedoch bestand eine Tendenz zu einer erhöhten HPV während der Applikation von 500 μM CORM-2 und CORM-3 im Vergleich zu deren inaktiver Form (Abbildungen 3-7 B und 3-8 B).

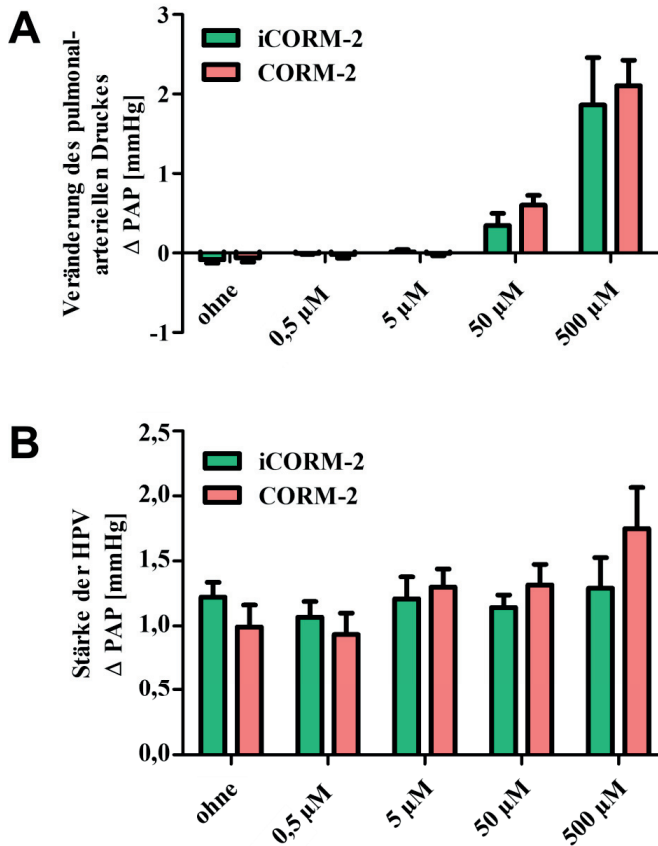


Abbildung 3-7: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus **A:** Effekt von CORM-2 und der inaktiven Form iCORM-2 auf den pulmonalvaskulären Tonus während normoxischer Ventilation; n = 7-10 Lungen in jeder Gruppe. **B:** Effekt von CORM-2 und der inaktiven Form iCORM-2 auf den pulmonalvaskulären Tonus während hypoxischer Ventilation. n = 7-10 Lungen in jeder Gruppe. Die Versuche in A und B sind identisch, es wurde allerdings jeweils der normoxische oder hypoxische Druck dargestellt HPV: Hypoxische pulmonale Vaskonstriktion; PAP: pulmonalarterieller Druck

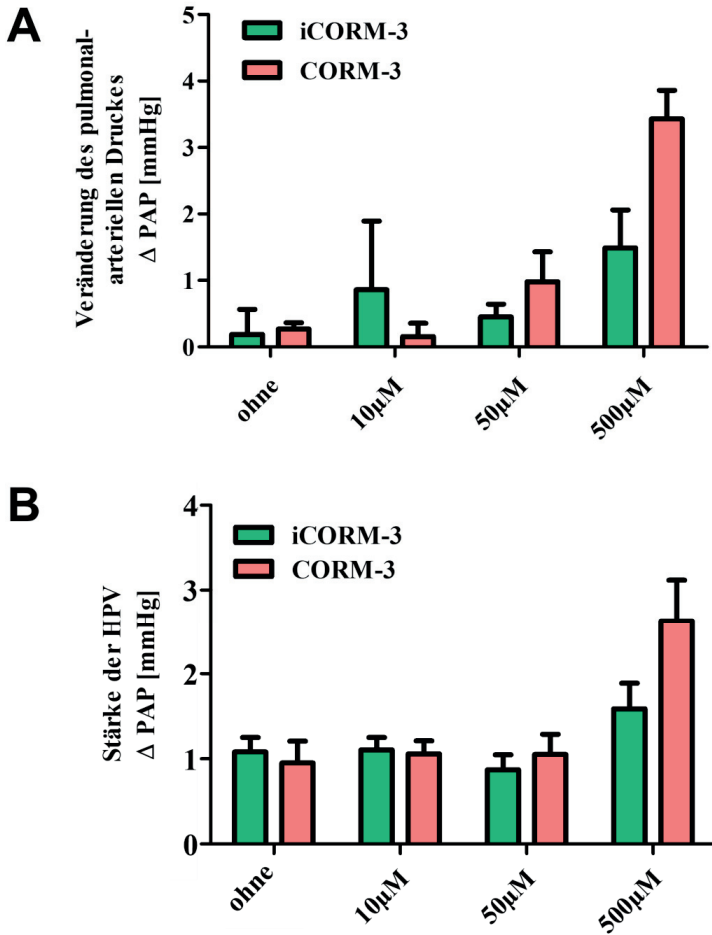


Abbildung 3-8: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus **A**: Effekt von CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während normoxischer Ventilation; n = 3 Lungen in jeder Gruppe. *p < 0,05 verglichen mit iCORM **B**: Effekt von CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während hypoxischer Ventilation. n = 3 Lungen in jeder Gruppe. Die Versuche in A und B sind identisch, es wurde allerdings jeweils der normoxische oder hypoxische Druck dargestellt

Um eine mögliche intrazelluläre Akkumulation der CORMs zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen nach einer einmaligen Gabe von 50 oder 500 μM CORM-3 bzw. iCORM-3 mehrere alternierende Perioden normoxischer und hypoxischer Ventilation durchgeführt wurden. In der niedrigeren Konzentration konnte kein Unterschied des PAP zwischen der aktiven und der inaktiven Form der CORM-3 identifiziert werden, obwohl CORM-3 die Tendenz hatte, einen höheren Anstieg des basalen Druckes hervorzurufen (Abb. 3-9 A). In hohen Konzentrationen (500 μM) führte CORM-3 zu einem kontinuierlichen signifikanten Anstieg des normoxischen Druckes und verminderte die nachfolgende HPV. Die inaktive Form iCORM-3 bewirkte auch einen Anstieg des normoxischen Druckes, aber zu einem geringeren Ausmaß (Abb. 3-9 B).

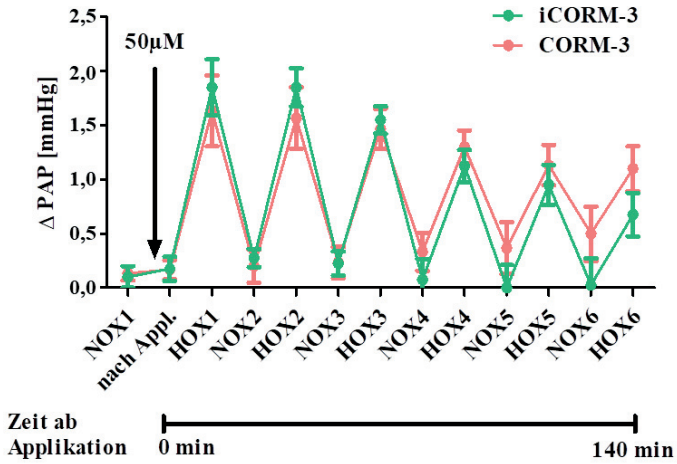
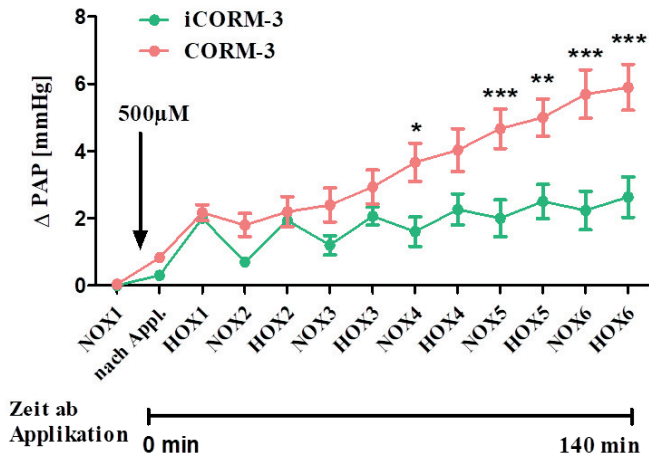
A**B**

Abbildung 3-9 Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus A: Effekt von 50 µM CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während repetitiver hypoxischer Ventilationen bis zu 140 min; n = 3-4 Lungen in jeder Gruppe. B: Effekt von 500 µM CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während repetitiver hypoxischer Ventilationen bis zu 140 min; n = 3 Lungen in jeder Gruppe.*p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 verglichen mit iCORM.

3.2.3 Einfluss von CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus in erythrozytenhaltiger Pufferlösung

Da die Freisetzung von CO aus den CORMs durch Interaktion mit Häm-Proteinen beeinflusst wird¹⁰², wurde in weiteren Versuchen der Effekt von CORMs in isolierten Lungen untersucht, die mit einem Perfusat, welches 1% Erythrozyten enthielt, durchspült wurden. Es zeigte sich, dass genau wie bei den blutfrei perfundierten Lungen, die HPV nicht signifikant durch die CORMs beeinflusst wurde (Abbildung 3-10 B und 3-11 B). Allerdings erhöhte sich der normoxische Druck nach der Gabe von hohen Konzentrationen von den CORMs und iCORM-2. (Abb. 3-10 A und 3-11 A).

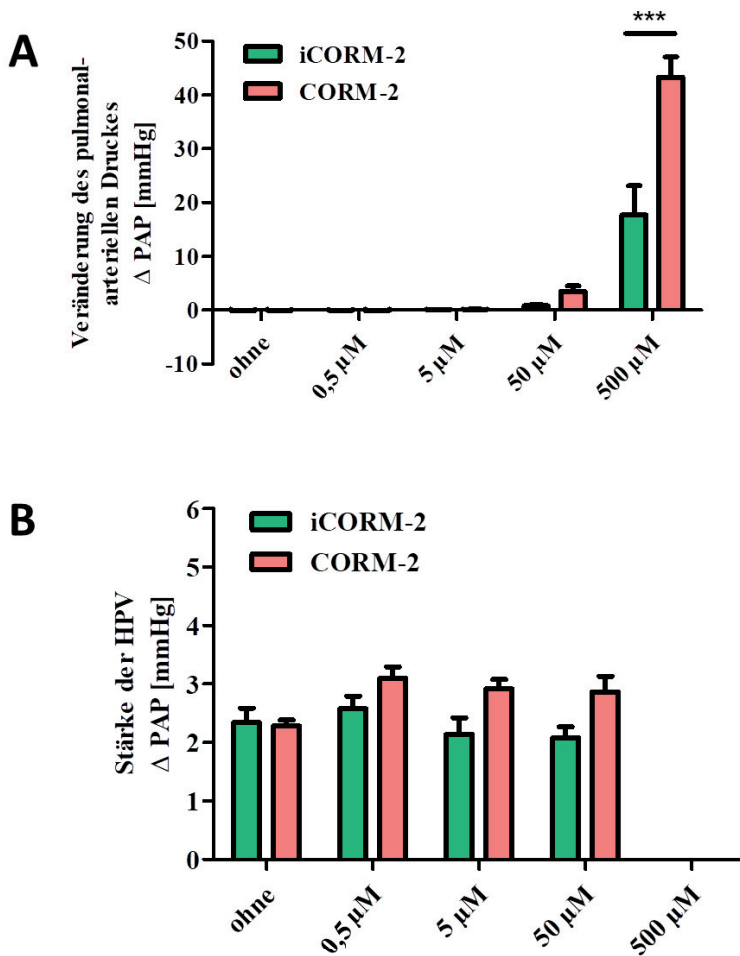


Abbildung 3-10 Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung) **A:** Effekt von CORM-2 und der inaktiven Form iCORM-2 auf den pulmonalvaskulären Tonus während normoxischer Ventilation; n = 5 Lungen in jeder Gruppe. ***p < 0,001 verglichen mit iCORM-2 **B:** Effekt von CORM-2 und der inaktiven Form iCORM-2 auf den pulmonalvaskulären Tonus während hypoxischer Ventilation. Die Versuche sind die gleichen wie in A, aber Δ PAP ist während hypoxischer Ventilation dargestellt; n = 5 Lungen in jeder Gruppe

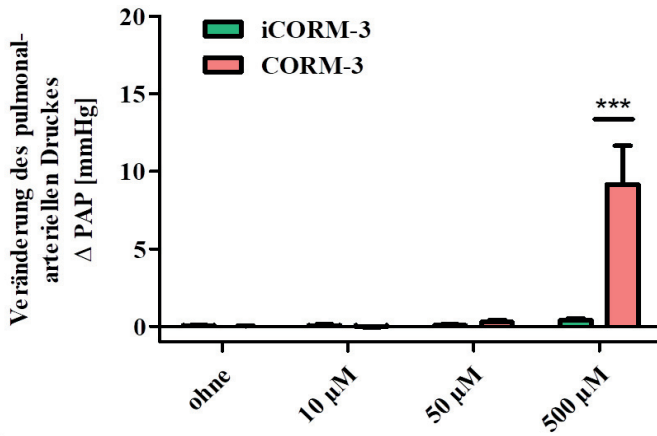
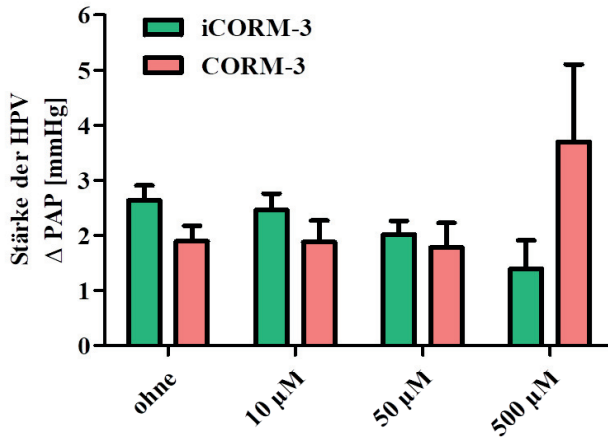
A**B**

Abbildung 3-11 Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung) **A**: Effekt von CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während normoxischer Ventilation; n = 3-6 Lungen in jeder Gruppe. ***p < 0,001 verglichen mit iCORM-2 **B**: Effekt von CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während hypoxischer Ventilation. Die Versuche sind die gleichen wie in A, aber ΔPAP ist während hypoxischer Ventilation dargestellt; n = 3-6 Lungen in jeder Gruppe

Eine einzelne Gabe von 500 μM CORM-3 in erythrozytenhaltigem Perfusat bewirkte ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg des PAP (Abb. 3-12). Jedoch war die Antwort deutlich höher als in den Lungen, die ohne Erythrozyten perfundiert wurden. Aufgrund des kontinuierlichen Anstieges des PAP nach der Applikation von CORM-3 in Anwesenheit von Erythrozyten konnte die HPV nicht eindeutig interpretiert werden (Abbildungen 3-12).

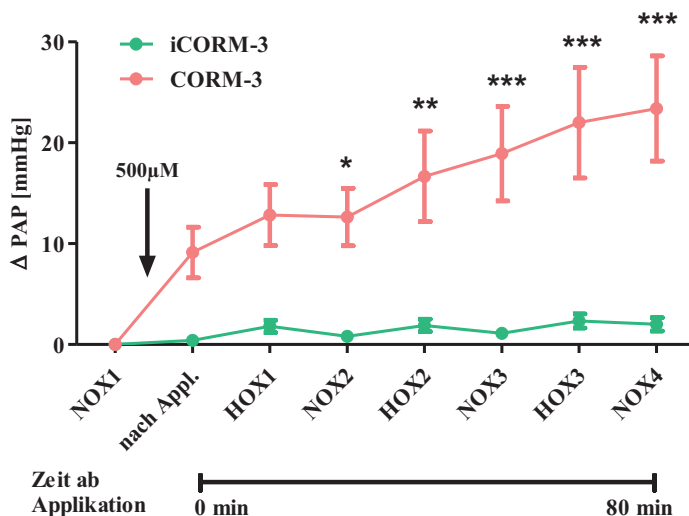


Abbildung 3-12 Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung): Effekt von 500 μM CORM-3 und der inaktiven Form iCORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus während repetitiver hypoxischer Ventilationen bis zu 80 min; n = 3 Lungen in jeder Gruppe. *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 verglichen mit iCORM

3.3 Einfluss von CO und CORMs auf die Remissionsspektren des CYP450 und der mitochondrialen Cytochrome

3.3.1 Einfluss des inhalativen CO

Bei der Messung von Cytochromen im Gewebe, wird die Summe aller vorhandenen Cytochrome in einem Spektrum dargestellt, das die mitochondrialen Cytochrome und CYP450,

aber auch z.B. Hämoglobin beinhaltet. Um die Cytochrome voneinander zu unterscheiden, wurden die gemessenen Spektren mit Referenzspektren (siehe Methoden) verglichen. Zur Vermeidung von Artefakten von Hämoglobin, welches sich im Auftreten eines b-Typ Cytochromes äußert, wurde die Lunge so lange mit Perfusat durchspült, bis das Hämoglobinspektrum nicht mehr sichtbar war. Mitochondriale Cytochrome wurden zusätzlich mit Hilfe von Zyanid identifiziert, nach dessen Gabe es zur kompletten Reduktion aller mitochondrialen Cytochrome kommt.

Zur Identifikation der Interaktion von CO mit CYP450 und den mitochondrialen Cytochromen wurden parallel zur Messung der HPV Differenzspektren mittels Remissionsspektrometrie von der Oberfläche der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslungen aufgenommen (Abb. 3-13, 3-14 und 3-15). Zur Identifikation charakteristischer Spektren wurden verschiedene Provokationen durchgeführt: 1) Die Applikation von Zyanid (80 μ M) in das Perfusat blutfrei-perfundierter Lungen hatte eine Reduktion des mitochondrialen Cytochrom c (420/550 nm), b_{1/h} (430/563 nm) und aa3 (445/603/605 nm) zur Folge (Abb. 3-13, *oben*, rosa Linie). Diese Daten korrelieren mit vorherigen Resultaten in isolierten Kaninchenlungen⁶⁶. 2) Inhalation mit 10 % CO in einem normoxischen Gasgemisch (21% O₂, 5% CO₂, Rest N₂) in blut-perfundierten Lungen verursachte charakteristische spektrometrische Veränderungen von CO-gebundenem Hämoglobin (Abb. 3-13, *oben*, rote Linie)¹³⁹. 3) Inhalation mit einer hohen Konzentration CO in einem normoxischen Gasgemisch (21 % O₂, 5% CO₂; Rest CO) in blutfrei perfundierten Lungen bewirkte charakteristische Veränderungen von an CYP450 gebundenem CO (Abb 3-13, *oben*, blaue Linie)⁶⁷. Diese Referenzspektren dienen dem Vergleich mit den spektrometrischen Veränderungen (= Summationsspektren) der experimentellen Gruppen (Abb. 3-13, *Mitte und unten*).

Applikation von CO in einem normoxischen Gasgemisch (10% CO, 21% O₂; Abb 3-13, *Mitte*) verursachte spektrometrische Veränderungen, ähnlich derer von an Hämoglobin gebundenem CO. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Anwesenheit von residuellem Hämoglobin in der blutfrei perfundierten Lunge nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Die spektrometrischen Veränderungen werden hier als CO-Hämoglobin Spektrum (rote Linie) dargestellt, welches in das CO-Summationsspektrum *gefitet* wurde. Es zeigten sich hier außerdem geringe Veränderungen bei 450 nm, die dem CYP450-CO Spektrum (blaue Linie) zugeordnet werden konnten, und eine Interaktion von CO mit reduziertem CYP450 indizieren. Veränderungen der mitochondrialen Cytochrome, insbesondere bei 550 nm (mitochondriales Cytochrom c) oder 603/605 nm (mitochondriales Cytochrom aa3) konnten nicht detektiert werden.

Inhalation von 10 % CO in einem hypoxischen Gasgemisch (10% CO, 1% O₂; 3-13, *unten*) rief eine deutliche spektrometrische Veränderung von CYP450 in der blutfrei perfundierten Lunge hervor. Jedoch zeigte sich ebenfalls keine Veränderung der mitochondrialen Cytochrome, insbesondere keine Veränderung von Cytochrom aa3 bei 603/605 nm, wobei eine Reduktion von

Cytochrom c bei 550 nm nicht ausgeschlossen werden kann (rosa Linie). Erneut zeigte sich auch ein CO-Hämoglobin-Spektrum (565 nm), das wiederum am ehesten auf residuelles Hämoglobin zurückzuführen ist, aber auch einer Bindung an Myoglobin entsprechen könnte.

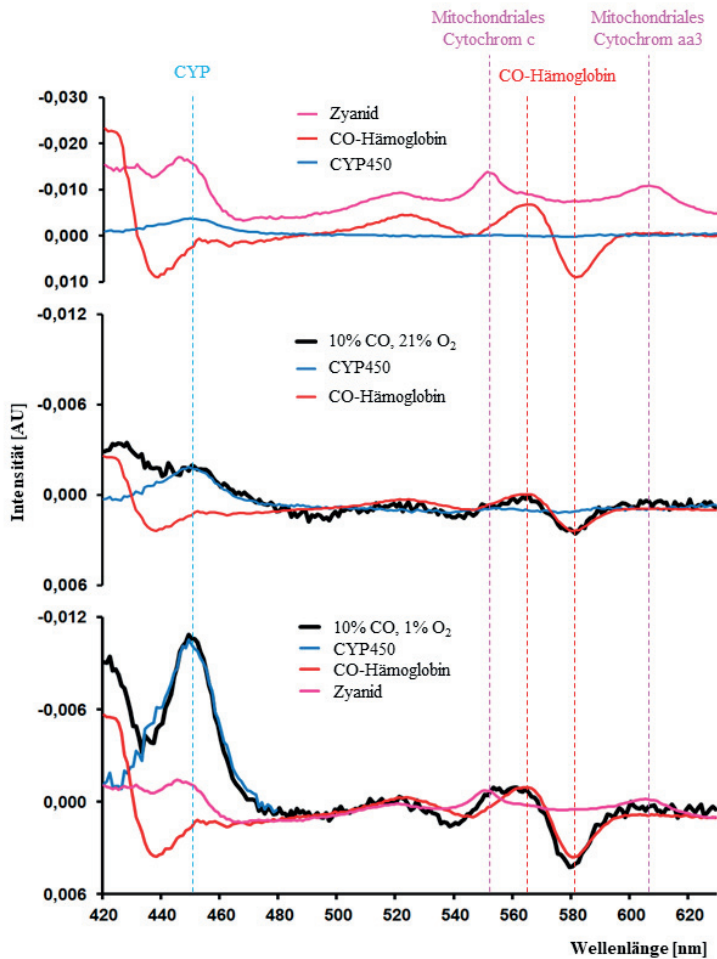


Abbildung 3-13: Spektrale Veränderungen nach Applikation von inhalativem CO (10% CO). *Oben:* Spektrale Veränderungen nach der Applikation von Zyanid in eine mit Puffer perfundierte Mauslunge, welche eine Reduktion von mitochondrialen Cytochromen (rosa Linie) zeigten, sowie nach Applikation von CO in einer mit Blut perfundierten Mauslunge, welche CO-Hämoglobin zeigten (rote Linie). Das Spektrum von an CYP450 gebundenem CO ist mit der blauen Linie dargestellt. Details zur Erstellung der Referenzspektren finden sich im Methodenteil. *Mitte und Unten:* Spektrale Veränderungen nach Applikation von 10 % CO während normoxischer (21% O₂, *Mitte*) und hypoxischer (1% O₂, *Unten*) Ventilation in isolierten, blutfrei perfundierten Mauslungen. Um die normoxischen und hypoxischen CO-Spektren besser mit dem jeweiligen Referenzspektrum der Mitochondrien, CO-Hämoglobin und CYP450 vergleichen zu können, wurden die Absorptionsmaxima des mitochondrialen Cytochrom c sowie aa3, CO-Hämoglobin und CYP450 in gestrichelten Linien in der jeweiligen Farbe markiert. Zusätzlich wurden die Referenzspektren in das gemessene CO Spektrum „gefittet“; n = 6-7 Lungen je Gruppe der CO-Spektren während Normoxie und Hypoxie; n = 3 Lungen je Gruppe für die Zyanid- bzw. die CO-Hämoglobin-Spektren.

Die Ergebnisse des mathematischen *Least-square fittings* sind im Säulendiagramm der Abb. 3-14 zusammengefasst dargestellt. Einzelspektren von CYP450, CO-Hämoglobin und Mitochondrien wurden in das während normoxischer oder hypoxischer Beatmung erzeugte CO-Summattonsspektrum *gefittet*. Die y-Achse stellt den Multiplikationsfaktor in Prozent dar, der nötig ist, um das Referenzspektrum der jeweiligen Chromophoren in das CO-Summattonsspektrum zu *fitten*. Es zeigte sich ein kleiner Teil von CO-Hämoglobin im normoxischen und hypoxischen CO-Spektrum, was auf residuelles Hämoglobin in den blutfrei-perfundierten Lungen hindeutet. CYP450 wurde während CO-Inhalation in dem normoxischen Gasmisch zu einem geringen Ausmaß inhibiert, aber zu einem deutlich höheren Ausmaß während CO-Inhalation in dem hypoxischen Gasmisch. Eine Erklärung dafür wäre, dass unter Hypoxie wahrscheinlich mehr CYP450 in reduzierter Form vorliegt und CO vornehmlich an diese bindet¹⁴⁰. Das mitochondriale Spektrum (rosa Linie) konnte nicht in das Summattonsspektrum *gefittet* werden.

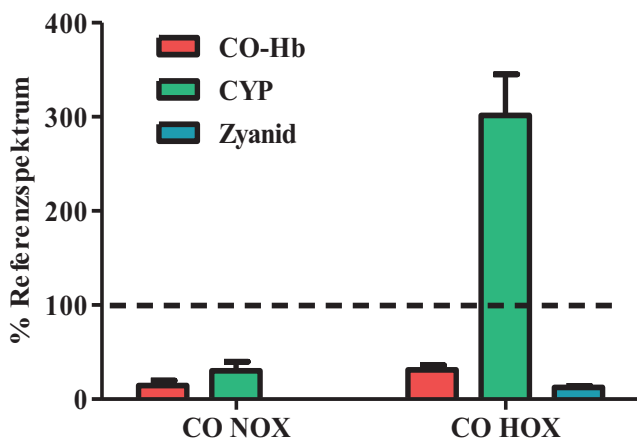


Abbildung 3-14: Balkendiagramm, welches den Multiplikationsfaktor in Prozent darstellt, der nötig ist, um das Referenzspektrum des jeweiligen Chromophoren in das Summattonsspektrum von CO während Normoxie und Hypoxie zu „fitten“, n = 6-7 Lungen in jeder Gruppe.

3.3.2 Einfluss von CORMs auf CYP450 und mitochondriale Cytochrome

Weder die Perfusion mit CORM-2 noch die mit iCORM-2 veränderte in steigenden Dosen von 0,5 bis 500 μM die spektrometrischen Charakteristika von CYP450 oder Cytochrom c und aa3 während normoxischer und hypoxischer Ventilation (Abb. 3-15 A-D). Insbesondere bei einer Wellenlänge von 450 nm, welche eine gesteigerte Absorption zeigen sollte, falls CO an CYP450 gebunden wäre, konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Dieser Wellenlängenbereich wurde vergrößert, um eine bessere Darstellung in diesem wichtigen Bereich zu erreichen. Es konnten zwar einige spektrometrische Veränderungen detektiert werden, jedoch konnten sie keinem der genannten Chromophoren, die von CO beeinflusst werden, zugeordnet werden. Diese Veränderungen, die bei Applikation hoher Dosen von CORM-2 und iCORM-2 aufgezeigt werden konnten, sind daher mit größter Wahrscheinlichkeit unspezifische Veränderungen, vermutlich durch Streueffekte, die durch Wassereinlagerung verursacht werden können¹⁴¹.

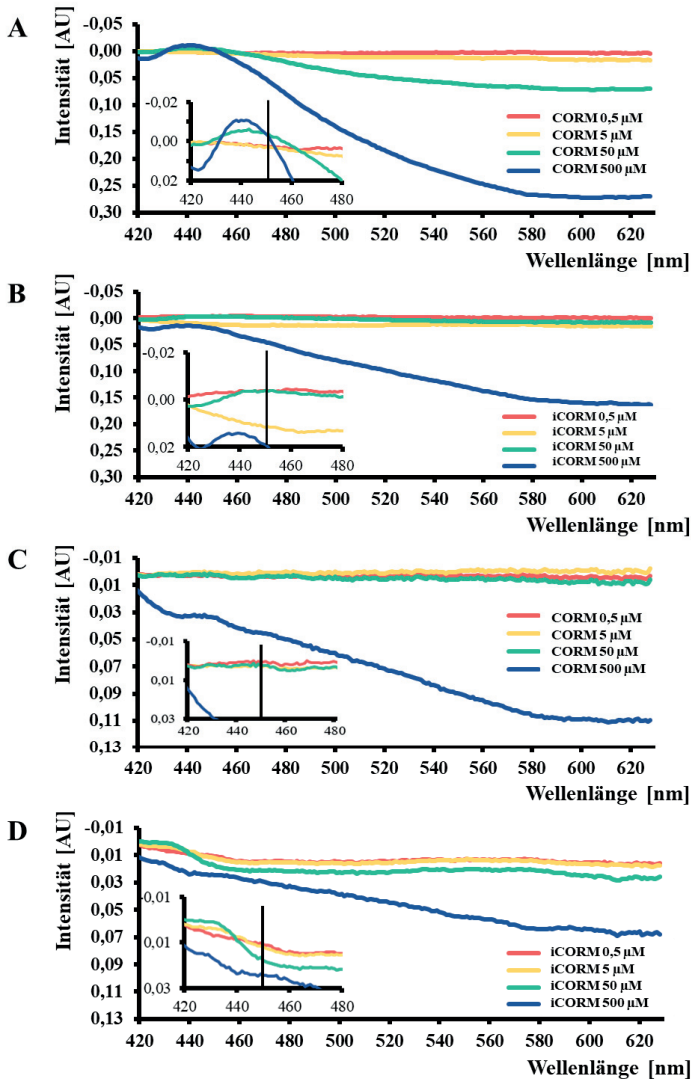


Abbildung 3-15: Spektrometrische Veränderungen während der Applikation von CORM-2 und iCORM-2. Die jeweiligen kleinen Einfügungen zeigen eine Vergrößerung des Wellenlängenbereiches von 420 nm bis 480 nm, in dem CO-gebundenes CYP450 einen Peak bei 450 nm zeigen sollte (Schwarze vertikale Linie in den Einfügungen markiert 450 nm). **A:** Spektrometrische Veränderungen bei der Applikation von CORM-2 während normoxischer Ventilation; n = 4 Lungen. **B:** Spektrometrische Veränderungen bei der Applikation von iCORM-2 während normoxischer Ventilation; n = 4 Lungen. **C:** Spektrometrische Veränderungen bei der Applikation von CORM-2 während hypoxischer Ventilation; n = 4 Lungen. **D:** Spektrometrische Veränderungen bei der Applikation von iCORM-2 während hypoxischer Ventilation; n = 4 Lungen.

4 Diskussion

Untersucht wurde die Wirkung von Inhalation von CO und Perfusion mit CORMs auf den basalen Vasotonus und die HPV in der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge mit gleichzeitiger gewebespektrometrischer Bestimmung der Bindung von CO an CYP450 und pulmonale Cytochrome. Ventilation mit 10 % CO während Hypoxie bewirkte eine signifikante Inhibierung der HPV, sowie der Vasokonstriktion, die durch ein Thromboxan-Analogon induziert wurde. CO interagiert in diesem Dosisbereich mit CYP450, während eine Inhibierung mitochondrialer Cytochrome nicht detektiert werden konnte.

Die Applikation von CORM-2 und CORM-3 in Konzentrationen, die zu einer spektrometrisch nachweisbaren Freisetzung von CO in erythrozytenhaltigem Perfusat führte, bewirkte einen kontinuierlichen Anstieg des normoxischen Gefäßtonus, wobei dieser Anstieg besonders ausgeprägt in mit erythrozytenhaltigem Puffer perfundierten Lungen war. Spektrometrisch konnte keine Interaktion von CO mit CYP450 oder mitochondrialen Cytochromen nach CORM-Gabe nachgewiesen werden.

4.1 Wirkung von CO

Es konnte bereits in vorausgehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass CO einen Einfluss auf die Signaltransduktion der HPV ausübt und auch eine wichtige Rolle in der Kontrolle des pulmonalvaskulären Tonus spielt^{120, 142}. Abhängig von der Dosis des ventilerten CO zeigten bisherige Untersuchungen eine inhibierende Wirkung^{118, 119, 143} oder nicht detektierbare Effekte¹⁴² des CO auf die HPV. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden, sind somit im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen, die einen vasodilatatorischen Einfluss von CO auf den pulmonalen Gefäßtonus zeigten. Dabei wurden in diesen Untersuchungen die Auswirkungen von 10% CO Inhalation und der Applikation der Substanzen CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus unter Normoxie und akuter Hypoxie (1% O₂ für 10 min) in isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslungen untersucht, dies sowohl in Lungen mit hämoglobinhaltigem Perfusat als auch in blutfrei gespülten Lungen. Parallel dazu wurde mittels Remissionsspektrophotometrie die Interaktion von CO sowie von CORM-2 mit den pulmonalen Cytochromen erfasst, um Rückschlüsse auf mögliche Bindungspartner von CO zu ziehen, die im Zusammenhang mit der Regulation des pulmonalen Vasotonus stehen könnten.

Obwohl der zu Grunde liegende Mechanismus der HPV noch nicht vollständig geklärt werden konnte, konnten bisher mehrere, die HPV modulierende Signalwege, identifiziert werden, die als potentieller Angriffspunkt für CO fungieren könnten. Diese beinhalten die Interaktion von CO mit CYP450, sGC und den Mitochondrien. Im Folgenden wird der Effekt von CO auf den normoxischen Gefäßtonus und die HPV im Detail diskutiert.

4.1.1 Einfluss von CO auf den pulmonalen Gefäßtonus

Durch die Inhalation mit 10 % CO zeigte sich eine signifikante Einschränkung der HPV. Die Tatsache, dass auch die durch das Thromboxanalogon U-46619 induzierte Vasokonstriktion durch CO-Ventilation eingeschränkt werden konnte, lässt vermuten, dass CO sowohl im Signalweg der HPV als auch den Signalweg der Vasokonstriktion, die durch U-46619 ausgelöst wird, beeinflusst.

Der Thromboxan A_2 -Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei deren Bindung es zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kommt. Die Aktivierung der PLC bewirkt in der Folge eine Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die beide als *Second Messenger* fungieren und letztlich eine Kontraktion auslösen¹⁴⁴. Es könnte daher auch sein, dass CO an irgendeiner Stelle in diesen Ablauf eingreift.

Dagegen hatte CO keinen Einfluss auf die durch KCl ausgelöste Vasokonstriktion. Eine extrazelluläre K^+ -Erhöhung durch KCl-Gabe depolarisiert die Zellmembranen der PASMC unspezifisch und nicht wie U-46619 über einen G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor^{132, 133}. Daher ist anzunehmen, dass die KCl-Gabe direkt zu einer Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle (*voltage-operated Ca^{2+} -channels = VOCC*) führt und so eine Vasokonstriktion verursacht, die nicht durch CO verhindert oder abgeschwächt werden kann. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass CO spezifisch in die Signaltransduktion der HPV und U-46619-induzierten Vasokonstriktion eingreift z.B. über Bindung an die sGC, welche vasodilatorisch wirkt¹⁴⁵. Auch schließt diese Tatsache einen Effekt von CO auf die generelle Kontraktilität der PASMC, z. B. durch eine Reduktion des zellulären ATP-Gehaltes aus.

Diese Ergebnisse werden durch andere Untersuchungen gestützt. In anderen Arbeiten in bovinen Pulmonalarterien führte eine Steigerung der CO-Produktion durch eine Induktion der HO-1 Expression zu einer Einschränkung der HPV. Die KCl-induzierten Vasokonstriktion war allerdings nicht beeinflusst¹⁴⁶. Außerdem zeigte eine CO-Inhalation in isolierten, blutfreien Mauslungen wiederum eine Abschwächung der HPV, nicht aber eine Änderung der

Angiotensin-II verursachten Vasokonstriktion¹¹⁹. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass dagegen die HO-2 nicht an der Signaltransduktion der HPV beteiligt ist, da eine Deletion von HO-2 in Mäusen während alveolärer Hypoxie in der Lunge keinen Einfluss auf die vaskuläre Antwort hatte⁵⁴. In diesem Zusammenhang wurde aufgrund von Untersuchungen am Karotiskörperchen eine wichtige Rolle für die HO-2 und CO bei der hypoxie-abhängigen Signaltransduktion postuliert^{50, 51}. In Glomuszellen des Karotiskörperchen wurde gezeigt, dass eine hypoxie-induzierte Inhibierung der CO-Freisetzung durch die HO-2 zu einer Inhibierung des B_K-Kanal führte und damit zu einer Depolarisation der Glomuszellen mit darauffolgenden physiologischen Hypoxie-Antworten.

Stützt man sich auf diese Annahme und überträgt diesen Mechanismus auf die PASMC, so könnte man erwarten, dass das exogen verabreichte CO an den B_K-Kanal bindet und diesen trotz der Hypoxie-induzierten verminderten endogenen Produktion stimuliert, so dass die HPV inhibiert wird. Dieser Mechanismus der CO-Inhibierung der HPV ist nicht vollständig auszuschließen, allerdings aufgrund der nur leichten Inhibierung der HPV bei im Vergleich zu den endogen freigesetzten Konzentrationen sehr hohen CO-Konzentration eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht außerdem die Tatsache, dass, wie oben bereits beschrieben, in einer Untersuchung mit HO-2-defizienten und B_K-Kanal-defizienten Mäusen bereits gezeigt werden konnte, dass weder die HO-2 noch der B_K-Kanal als Sauerstoffsensoren in den Pulmonalgefäßen nachgewiesen werden konnten⁵⁴.

Allerdings kann CO mit weiteren Signalmechanismen, die bei der Auslösung oder Modulation der HPV beteiligt sind, interagieren. In diesen Untersuchungen wurde im speziellen die Beteiligung von CYP450 und Mitochondrien untersucht (s.u. 4.1.2).

Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit konnte an isolierten Rattenlungen keine Abschwächung der HPV durch Exposition niedriger Dosen von CO (< 1000 ppm) verzeichnet werden¹²⁰. Möglicherweise waren hier die verwendeten Dosen nicht hoch genug.

4.1.2 Auswirkung von CO auf CYP450 und mitochondriale Cytochrome

Die exogene Verabreichung niedrigerer Dosen CO (10%) führte zu einer eingeschränkten HPV. Spektrometrisch konnte eine Bindung von CO an CYP450 nachgewiesen werden, wobei diese Bindung unter hypoxischer Beatmung stärker war, als unter normoxischer. Dies ist zu erwarten, da CO an die reduzierte Form des CYP450 bindet¹⁴⁰. Somit lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass unter hypoxischer Beatmung mit 1% O₂ CYP450 reduziert wird und 10% CO CYP450 inhibiert.

Es könnte daraus geschlussfolgert werden, dass es über die CO-abhängige Inhibierung von CYP450 zu einer Inhibierung der HPV bzw. U-46619-induzierten Vasokonstriktion kommt. Diese Ergebnisse unterstützen die Studien von Miller und Hales, die durch CO-Beatmung in anästhesierten Hunden eine Einschränkung der HPV dokumentierten und CYP450 als Mediator bei der HPV postulierten⁷¹.

Im Einklang dazu stehen auch die Ergebnisse von Sylvester et al., die zeigten, dass CO-Applikation (11,5% CO) während normoxischer Beatmung in isolierten, ventilierten und mit eigenem Blut perfundierten Schweinelungen zu einer Vasodilatation führte und die HPV einschränkte, dies, wie geschlussfolgert werden konnte, in einem CYP450-abhängigen Mechanismus¹⁴⁷. Übereinstimmend hierzu konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Deletion des CYP2J Lokus von CYP450 in Mäusen zu einer Einschränkung führte¹⁴⁸. Dazu passend zeigte die vorliegende Arbeit, dass der CYP450-Inhibitor Sulfaphenazole ebenfalls zu einer Einschränkung der HPV führte.

Die hier erzielten Resultate decken sich außerdem mit Ergebnissen zur Rolle der CYP-Epoxygenase als wichtigem Modulator der HPV. In Mauslungen wurde eine Milderung der akuten HPV um 52% durch selektive Inhibierung der Epoxygenase festgestellt. Dies impliziert, dass die durch die Epoxygenase entstandenen Metaboliten, die Epoxyeicosatriensäuren (EETs), eine pulmonale Vasokonstriktion auslösen¹²⁷. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EETs zu einer Konstriktion von isolierten Pulmonalarterien aus Kaninchen führten⁶³. Mit diesen Überlegungen könnte ein Erklärungsansatz für die hier durch Blockierung von CYP450 erzielte Abschwächung der HPV gegeben werden. So liegt es nahe, dass sowohl CO als auch der CYP450-Inhibitor Sulfaphenazole über eine Blockierung der Konversion von AA in die Metaboliten EETs wirkten und somit deren Wirkung auf den pulmonalvaskulären Tonus unterbunden wurde. Im Widerspruch hierzu stehen allerdings Ergebnisse, die zeigten, dass EETs den Gefäßtonus von isolierten Kaninchen⁶¹ und Hundelungen⁶² verminderten und 20-HETEs isolierte Pulmonalarterien aus menschlichen Lungen⁵⁸ und Kaninchenlungen⁵⁹ dilatierten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Gefäßtonus vor EET-Gabe deren Wirkung beeinflusst und ggf. für die unterschiedlichen Reaktionen verantwortlich sein könnte¹⁴⁹.

Spektrometrische Veränderungen, die auf eine Reduktion anderer Cytochrome hinweisen, traten nicht auf, können aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, so dass CO auch über andere Mechanismen wirken könnte. Dazu gehört insbesondere die Aktivierung der sGC und somit einem Anstieg der Konzentration an cGMP, das vasodilatatorisch wirkt. Remissionsspektrometrisch konnte während Normoxie und CO-Applikation ein Peak bei 423 nm und 570 nm

detektiert werden, der einem Cytochrom der Gruppe b entsprechend zu werten ist, wie exemplarisch für CO-Hb gezeigt. Es kann dabei nicht differenziert werden, ob es sich um eine Bindung von CO an Hämoglobin, die sGC oder evtl. auch Myoglobin handelt. Obwohl die Lunge sorgfältig blutfrei gespült wurde, kann eine Persistenz von Hb (z.B. nach Übertritt in das Gefäß bei Hämolyse) nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da CO die sGC allerdings im Vergleich zu NO nur sehr schwach stimuliert (4-fach für CO im Vgl. zu 200-fach für NO) wäre eher ein kleiner Effekt von CO auf die sGC im Vergleich zu NO zu erwarten^{145, 150}. Insgesamt liegen jedoch widersprüchliche Daten bzgl. der Rolle des NO-sGC-Signalweges in der CO-vermittelten Inhibierung der HPV vor, was wahrscheinlich auf Differenzen in der Anwesenheit von NO zurückzuführen ist^{118, 119}.

Ein Effekt von CO auf die Mitochondrien innerhalb dieser Versuchsreihen kann ebenfalls nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die spektrometrischen Veränderungen während CO-Applikation unter Hypoxie mit einer Reduktion von Cytochrom c vereinbar sind (Absorptionspeak bei 550 nm). Jedoch konnte keine Veränderung im Wellenlängenbereich des terminalen mitochondrialen Cytochrom aa₃ detektiert werden, so dass die Interaktion von CO mit Cytochrom aa₃ nicht nachgewiesen werden konnte. Die Effekte von CO auf Mitochondrien wurden bisher meistens an isolierten Mitochondrien oder Zellen getestet, in welchen niedrige Dosen von CO ausreichen, um die Cytochrom c Oxidase oder die Respiration zu inhibieren¹⁵¹. In der isolierten perfundierten Rattenlunge induzierten jedoch nur hohe Dosen von inhaliertem CO, entsprechend einem CO:O₂-Verhältnis von mindestens 15:1 (bei den Untersuchungen dieser Arbeit CO:O₂ Verhältnis von 10:1), metabolische Veränderungen, die auf eine Inhibierung der mitochondrialen Cytochrome schließen lassen könnten¹⁵². Somit ist es unklar, ob CO in der hier verwendeten Konzentration zu einer Inhibierung der Mitochondrien geführt hat.

Insgesamt stehen die hier beobachteten Effekte von inhaliertem CO bezüglich der Einschränkung der HPV und der Interaktion mit CYP450, sowie der Mitochondrien mit publizierten Resultaten im Einklang und bekräftigen vorherige Studien, die CO als einen vielversprechenden Modulator des pulmonalvaskulären Tonus identifiziert hatten.

4.2 Wirkung von CORM-2 und CORM-3

CO hat in höheren Dosen starke toxische Effekte auf den biologischen Organismus, was eine Applikation *in vivo* sehr anspruchsvoll gestaltet. Um dieses Problem zu umgehen und die vorteilhaften Eigenschaften und therapeutischen Möglichkeiten von CO auszuschöpfen, hat die Entwicklung von CORMs in den letzten Jahren stark an Aufmerksamkeit gewonnen. Diese

Moleküle sind Metallcarbonyle und können unter bestimmten Bedingungen oder durch bestimmte Auslöser CO in kleinen kontrollierten Mengen freisetzen. Dies geschieht z.B. durch Anregung mit Licht (CORM-1) oder nach Interaktion mit Myoglobin oder anderen Häm-haltigen Proteinen (CORM-2 und CORM-3)¹⁰². CORM-1 und CORM-2 sind in organischen Lösungen löslich, wohingegen CORM-3 in Wasser löslich ist¹⁰⁵. CORMs zeigten in verschiedenen pathologischen Zuständen positive Effekt, inklusive des Ischämie-Reperfusionsschaden des Herzens¹³⁴ oder bei hypertensiven Erkrankungen¹⁰⁷. Jedoch wurde ihre Sicherheit im Hinblick auf ihre Effekte auf den pulmonalvaskulären Tonus und eine mögliche Inhibierung der HPV bisher noch nicht geprüft.

4.2.1 *In vitro* Messungen zur CO-Freisetzung durch CORM-2 und CORM-3

In früheren Untersuchungen wurde die Menge des durch die CORMs freigesetzten CO mittels spektrophotometrischer Messung der Konversion von Deoxymyoglobin in CO-gebundenes Myoglobin (MbCO) bestimmt⁹⁹. Dies stellt die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der CO-Freisetzung dar¹⁰⁴.

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis des freigesetzten CO durch die CORMs spektrometrische Messungen in erythrozytenhaltigem Perfusat durchgeführt. Dabei wurde die Intensität der charakteristischen Absorptionsmaxima von CO-gebundenem Hämoglobin als Indikator herangezogen. Es zeigte sich, dass es nur bei Konzentrationen von über 50 μM der CORMs zu einer signifikanten CO-Freisetzung kam. Die hier applizierten geringeren Konzentrationen von 50 μM zeigten in anderen Veröffentlichungen *in vitro* oder *in vivo* jedoch den vorteilhaften Effekt von CO, auch in Abwesenheit von Hämoglobin^{102, 153, 154}. In isolierten PSMCs im blutfreien Medium z.B. inhibierten 50 μM CORM-3 die *Platelet-Derived-Growth-Factor*-induzierte Zellproliferation¹⁰⁷.

4.2.2 Wirkung von CORM-2 und CORM-3 in der blutfrei gespülten, isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge

Zur Untersuchung der Wirkung der CORMs auf den pulmonalvaskulären Tonus und die HPV wurden CORM-2 und CORM-3 in der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge angewendet.

Im Gegensatz zu Studien in der systemischen Zirkulation¹⁵⁵ und den hier durchgeführten Versuchen mit CO, zeigten weder CORM-2 noch CORM-3 einen vasodilatatorischen Effekt auf den

pulmonalvaskulären Tonus oder die HPV in der isolierten, blutfrei perfundierten Mauslunge. Die Verwendung von Konzentrationen, die höher waren als die, die in anderen Investigationen üblicherweise verwendet wurden, führte jedoch zu einer dauerhaften Vasokonstriktion. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt bei längerdauernder Beobachtung nach einmaliger Gabe von 500 μ M CORM-3, die unter Umständen zu einer intrazellulären Akkumulation von CORMs führte. Im Gegensatz dazu zeigte die Applikation von CORM-2 und CORM-3 in Konzentrationen von 50 μ M bis 1 mM vasodilatatorische Effekte in isolierten, mit U-46619 präkontrahierten aortalen Gefäßen der Maus¹⁵⁶. Außerdem konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass CORMs in der Lage sind, eine bestehende PH zu verbessern und deren Entwicklung abzumildern. In einer *in vivo* Studie mit chronisch hypoxischen Mäusen konnte CORM-3 die Schwere der PH senken. Dies wurde sowohl durch einen antiproliferativen Mechanismus (über Aktivierung des p53/p21 Signalweges und damit Suppression der Zellproliferation und Verhinderung des pulmonalvaskulären *Remodeling*), als auch durch einen inhibitorischen Effekt auf die Vasokonstriktion bewirkt, gemessen an der Veränderung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSD) über einen Katheter an anästhesierten Mäusen. Der inhibitorische Effekt ist eine Antwort auf die akute Hypoxie und erfolgt über einen Anstieg des pulmonalen cGMP Levels, gemessen über einen Immunassay an inkubierten PASMC. Das CORM-3 wurde dafür in der Studie oral (50 mg/kg täglich über 3 Wochen) und intraperitoneal appliziert¹⁰⁷.

Die diskrepanten Ergebnisse zwischen diesen Untersuchungen und der oben genannten *in vivo* Studie könnten über systemische Wirkungen der CORMs in der lebenden Maus erklärt werden, welche bei der selektiven pulmonalen Applikation in der isolierten Lunge nicht gegeben sind. In Frage käme aber auch ein Unterschied aufgrund der höheren Konzentration an Erythrozyten im zirkulierenden Blut *in vivo*. Daher wurden weitere Versuche mit erythrozytenhaltigem Perfusat durchgeführt (s.u. 4.2.3 Wirkung von CORM-2 und CORM-3 in der isolierten mit erythrozytenhaltigem Perfusat perfundierten Mauslunge).

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen mit inhaliertem CO und CORMs-Applikation in dieser Arbeit könnte an einer höheren tatsächlichen Konzentration von inhaliertem CO liegen, gegebenenfalls in Kombination mit einer anderen Lokalisation der Wirkungsentfaltung. Inhaliertes CO gelangt direkt in das alveoläre Kompartiment und von dort zu den glatten Gefäßmuskelnzellen und Endothelzellen. Dagegen setzen CORMs das meiste CO an der endothelialen Seite der Blutgefäße frei.

Da auch bei einigen Versuchen ein Anstieg des PAP bei den inaktivierten CORMs zu beobachten war, muss auch an einen unspezifischen Effekt der Trägersubstanz gedacht werden. So bleibt nach Abgabe von CO durch die CORMs ein Metallresiduum (iCORM) zurück, welches schädliche Prozesse im Organismus in Gang setzen könnte, denn sowohl das Übergangsmetall-carbonyl als auch dessen Abbauprodukte sind biologisch toxisch¹⁵⁷.

4.2.3 Wirkung von CORM-2 und CORM-3 in der isolierten, mit erythrozytenhaltigem Perfusat perfundierten Mauslunge

Da die Freisetzung von CO aus CORMs von Häm-Proteinen abhängt, wurde der Effekt von Pufferlösung, die 1% Erythrozyten enthielt, auf CORMs-induzierte pulmonalvaskuläre Effekte in der isolierten Lunge getestet. Es zeigte sich unter hohen Konzentrationen von CORM-2 und CORM-3 eine ausgeprägte Vasokonstriktion unter normoxischer Beatmung. Dieser Effekt war auch ausgeprägter als in blutfrei-perfundierten Lungen, so dass von einer verstärkten Freisetzung von CO durch eine 1%-ige Erythrozytenlösung ausgegangen werden kann. Jedoch führte eine höhere Konzentration an Erythrozyten in den hier durchgeführten Versuchen zu einer Schädigung des Gewebes mit Ödembildung der isolierten Lungen.

Aufgrund des hohen und dauerhaften Anstieges des normoxischen Vasotonus, war es schwierig, den Effekt von CORM-3 auf die HPV in Anwesenheit von Erythrozyten zu evaluieren. Obwohl *in vivo* Anwendungen von CORMs in niedrigen Konzentrationen sicher erscheinen¹⁵⁸, ergab sich in den Untersuchungen dieser Arbeit ein Hinweis auf unspezifische vasokonstriktive Effekte der CORMs in hohen Konzentrationen, die in Anwesenheit von Hämoglobin verstärkt aufgetreten sind. Die Ursachen dafür sind unklar, könnten aber mit einer anderen *in vivo* Stoffwechslung der CORMs zusammenhängen oder höherer effektiver Konzentrationen von CO in den *in vivo* Versuchen. Hierbei wäre die Überlegung, dass die CORMs *in vivo* leichter CO abgeben, z.B. aufgrund des Kontaktes mit Hämoglobin oder anderen plasmatischen Triggern und somit auch bei niedrigeren CORM-Konzentrationen höhere Plasmakonzentrationen von CO erreicht werden als in den *ex vivo* Versuchen, in denen dann vor allem schädliche Effekte zum Tragen kommen. Dies würde jedoch nicht den Unterschied zwischen CORMs und iCORMs erklären, es sollte dann hier nicht zu Unterschieden in der Toxizität kommen. In den Versuchen dieser Arbeit wurden höhere Konzentrationen an CORMs verwendet als in anderen Untersuchungen in der systemischen Zirkulation, was eine Erklärung für die schädlichen Effekte darstellen könnte. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es erst ab

Konzentrationen von 50 μM zu einer nennenswerten CO-Freisetzung kommt, zumindest *ex vivo*.

4.2.4 Einfluss von CORMs auf die Cytochrome

Die hier erzielten spektrometrischen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass durch die CORMs freigesetztes CO entweder in einem geringeren Ausmaß oder in ein anderes Kompartiment abgegeben wird als inhaliertes CO. Im Unterschied zu inhaliertem CO konnte nach CORM-2 Applikation keine Inhibierung von CYP450 detektiert werden. Dies impliziert eine im Vergleich zu inhaliertem CO relativ geringe Freisetzung von CO, denn nur supraphysiologische Level von CO inhibieren CYP450¹⁵⁹. Im Hinblick auf die mitochondrialen Cytochrome konnte außerdem keine spektrometrische Inhibierung durch CORM-2 festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorherigen Studien, die keine relevante Inhibierung der Atmungskette in den untersuchten CORM-Konzentrationen (CORM-2, CORM-3, and CORM-A1) bis 100 μM in isolierten Mitochondrien der Niere zeigten¹⁵¹. Allerdings ist bei diesen spektrometrischen Untersuchungen zu bedenken, dass die Differenzspektren in blutfrei-perfundierten Lungen gemessen wurden, um den starken Einfluss des Hämoglobins abzumildern. Dies könnte aber dazu geführt haben, dass die CO-Freisetzung durch die CORMs im Gegensatz zu Puffern, die Erythrozyten enthalten, reduziert war.

Die gemessenen unspezifischen spektrometrische Veränderungen nach Gabe hoher Dosen von CORM-2 und iCORM-2, waren keinem der genannten, von CO beeinflussten Chromophoren, zuordenbar. Diese Veränderungen sind daher mit größter Wahrscheinlichkeit auf Streuungseffekte, die durch Wassereinlagerung verursacht werden, zurückzuführen¹⁴¹. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um versteckte Absorptionsveränderungen handelt, die nicht nachweisbar sind.

4.3 Diskussion zur Methodik

Das Modell der isolierten ventilierten und perfundierten Lunge ist schon seit 1912 bekannt und wird zur Untersuchung von Lungenphysiologie und -pathologie in verschiedenen Spezies angewendet. Es gibt jedoch verschiedene methodeninhärente Einflussfaktoren, die die Aussagekraft der Versuche beeinträchtigen können. Mögliche Einflussfaktoren sind z.B. die notwendige Medikation der Tiere durch ein Anästhetikum, Muskelrelaxans und Heparin, die auch Auswirkungen auf die Lungenphysiologie der isolierten Lunge haben können, oder nicht vollständige

Elimination zirkulierender Substanzen oder adhäsionsstarken Zellen wie Thrombozyten. Außerdem muss im Hinblick auf die physiologische Bedeutung des Modells in Betracht gezogen werden, dass das Gewebe mit Perfusionsflüssigkeit anstelle von Blut perfundiert wurde. Dabei hat sich hier Krebs-Henseleit-Puffer als zuverlässiges Medium für diese Versuchskonstellation bewährt¹¹. Eine Übertragung von der isolierten Lunge auf *in vivo* Fragestellungen ist aber somit immer nur begrenzt möglich.

In Bezug auf die angewendete Remissionsspektrometrie zum Nachweis der Bindung von CO an Cytochrome gibt es ebenfalls verschiedene Limitationen. CO ist bekannt dafür, photodissoziierbare Bindungen einzugehen. Gerade die CO-Häm-Bindung, wie sie bei einer Bindung von CO an CYP450 vorliegt, ist besonders photolabil, eine Eigenschaft, die bereits in früheren Studien zur Bindungskinetik ausgenutzt wurde¹⁶⁰. Daher könnte es sein, dass das in der Methode der Remissionsspektrometrie emittierte Licht in den durchgeführten Untersuchungen beim Messen mögliche Bindungen von CO an Cytochrome wieder gelöst hat, bevor diese Bindungen detektiert werden konnten. Allerdings wurde die Weißlichtspektrometrie in vielfachen Messungen zur Evaluation der CO-Häm-Interaktion eingesetzt^{141, 161}, so dass nicht von einem wesentlichen Einfluss der Messmethodik ausgegangen wurde. des Weiteren muss die Sensitivität der Methode kritisch hinterfragt werden, da insbesondere Streuveränderungen, z.B. durch Ödembildung, das Remissionsspektrum stark beeinflussen können und Absorptionsänderungen überlagern. Daher wurde in den Untersuchungen das Ödem über die Gewichtszunahme der Lunge beobachtet und nur Lungen verwendet, die in der Stabilisierungsphase keinen Anstieg des Gewichtes zeigten. Charakteristische Streuveränderungen wurden während den Versuchen bei hohen CORMs-Konzentrationen beobachtet und entsprechend in die Überlegungen einbezogen.

5 Ausblick

Der mögliche Einsatz von CO als Therapeutikum hat in den letzten Jahren immer mehr an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit gewonnen. Die Entdeckung der physiologischen Wirkungen von CO und die Entwicklung von Verbindungen, die CO in kontrollierbaren Mengen freisetzen, bieten in dieser Hinsicht vielversprechende Ansatzpunkte zur Erprobung neuer therapeutischer Ansätze. Aufgrund der toxischen Eigenschaften und der deutlich höheren Affinität zu Hämoglobin im Vergleich zu O₂ gestaltet sich die Anwendung *in vivo* jedoch schwierig.

Erste Untersuchungen ergaben zwar einen positiven Effekt von CORMs auf die Entwicklung der PH im Tiermodell, in den hier vorliegenden Untersuchungen an der isolierten Lunge zeigten sich allerdings widersprüchliche Effekte. Weitere *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen sollten diese Diskrepanz adressieren.

Aktuell erfolgt der Versuch, die Eigenschaften der CORMs als Prodrug für CO zu verbessern, um eine sicherere und kontrollierbarere Freisetzung in einem spezifischen Gewebe zu erzielen und die Nebenwirkungen durch die gewebsschädigenden Metalle und anderen toxischen Residuen zu minimieren. Hierzu werden die CORMs beispielsweise an biokompatible Systeme angefügt, wie z.B. an Peptide, Polymere, Nanopartikel etc. Diese sogenannten CORM-Konjugate zeigen bereits deutlich weniger Toxizität sowie erhöhte Halbwertszeiten und bieten neue Möglichkeiten der Applikation^{157, 162}.

Auch die Substitution oder Koordination von passenden biologischen Liganden kann die bioaktiven Merkmale des Metallzentrums drastisch verändern und somit vor den intrinsischen toxischen Eigenschaften schützen oder diese gar eliminieren, was mehrfach berichtet werden konnte^{134, 163}. So konnte beispielsweise schon gezeigt werden, dass allein der Ru(CO)₃Cl-Ersatz durch Glycin von CORM-2, um CORM-3 zu erhalten, nicht nur eine verbesserte Wasserlöslichkeit zur Folge hatte, sondern auch in einer Reduktion des zytotoxischen Effektes an glatten Muskelzellen in Kultur resultierte¹⁶³.

Es wäre z.B. auch denkbar, dass Eisen-basierte CORMs als am Menschen angewandte Therapeutika eher in Betracht zu ziehen wären, da Eisen sowieso häufig im Körper vorkommt. Es ist in vielen Struktur- und auch Funktionsproteinen enthalten und kann einfach beseitigt und im Blut transportiert werden, z.B. durch Transferrin, wohingegen Ruthenium nur in äußerst kleinen Spuren im Körper vorzufinden ist¹⁶⁴.

Auch ist es wohl durchaus machbar, durch Veränderung der Art der Liganden, die am Übergangsmetall binden, die Rate der CO-Freisetzung zu modulieren und die Labilität der Carbonylgruppe strikt zu kontrollieren. Z.B. erwiesen sich Chlorid und Glycin Liganden als labil

und durch ihre Substitution durch Liganden höherer Affinität, wie z.B. Gluthation oder Cystein, konnte die CO-Dissoziation vom Metallzentrum beschleunigt werden.

Die weitere Erforschung und Erprobung der CORMs ist interessant, vielversprechend und unabdingbar. Dies stellt einen aussichtsreichen Ansatz zur Entwicklung neuer medikamentöser Therapiestrategien nicht nur im Hinblick auf die PH dar.

6 Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion ist ein Mechanismus zur pulmonalen Blutflussregulation, der zu einer Umverteilung der Perfusion aus hypoxischen alveolären Bereichen in besser ventilerte Alveolen der Lunge führt und so eine Optimierung der Oxygenierung des zirkulierenden Blutes garantiert. Trotz intensiver Forschung ist der genaue Sauerstoffsensor und der grundlegende Signaltransduktionsweg noch nicht vollständig identifiziert, aber es ist bereits bekannt, dass der pulmonalvaskuläre Tonus und die HPV durch NO/cGMP-abhängige Mechanismen, Cytochrom P450 (CYP450)-abhängige Metaboliten oder mitochondriale Signale reguliert werden kann, die alle Angriffspunkte von Kohlenmonoxid (CO) sind.

CO hat in den letzten Jahren trotz seiner bekannten toxischen Eigenschaften immer mehr an Bedeutung als mögliches Therapeutikum gewonnen. Endogen wird CO durch die Hämoxxygenase während des Abbaus von Hämproteinen produziert und es können ihm antioxidative, antiinflammatorische, antiproliferative, antiapoptotische und vasoregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. So kam es in den letzten zwei Dekaden zur Entwicklung sogenannter *Carbon Monoxide-Releasing Molecules* (CORMs), die im Stande sind, kleinere, kontrollierte Mengen an CO freizusetzen. In der Lunge scheinen CO und die CORMs der Entstehung einer pulmonalen Hypertonie (PH) entgegenzuwirken. Der direkte Effekt von CORMs auf die pulmonale Vasoreagibilität und HPV wurde bisher jedoch noch nicht in isolierten Lungen erprobt.

In dieser Arbeit wurden die Effekte von 10% CO Inhalation und der Applikation der Substanzen CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalen Gefäßtonus unter Normoxie und akuter Hypoxie (1% O₂ für 10 min) in isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslungen untersucht. Dabei wurde gleichzeitig mittels Remissionsspektrophotometrie die Interaktion von CO sowie von CORM-2 mit den pulmonalen Cytochromen erfasst. So konnten Rückschlüsse auf mögliche Bindungspartner von CO gezogen werden, die im Zusammenhang mit der Regulation des pulmonalen Vasotonus stehen könnten.

Inhaliertes CO schwächte sowohl die HPV als auch die durch das Thromboxanalogon U-46619 induzierte Vasokonstriktion ab, nicht jedoch die KCl-induzierte Vasokonstriktion. Im Gegensatz dazu induzierten CORM-2 und CORM-3 in hohen Konzentrationen, die zu einer messbaren *in vitro* Freisetzung von CO führte, einen kontinuierlichen Anstieg des pulmonalvaskulären Tonus, der durch die Anwesenheit von Erythrozyten noch verstärkt wurde. Inhaliertes CO führte zu spektrometrischen Veränderungen, die mit einer Inhibierung von CYP450

vereinbar sind. Im Unterschied dazu konnten während der Applikation von CORM-2 keine spektrometrischen Zeichen einer Blockade von CYP450 detektiert werden.

Inhalatives CO in supraphysiologischen Konzentrationen hat einen vasodilatorischen Effekt in der isolierten, ventilerten und perfundierten Lunge und ist mit einer Inhibierung von CYP450 assoziiert. Die Applikation von CORMs in hohen Konzentrationen lösen dagegen eine pulmonale Vasokonstriktion im Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Lunge aus. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen inhalativem CO bzw. *in vivo* verabreichten CORMs und den CORMs-Effekten in der isolierten Lunge zu eruieren.

7 Summary

Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction (HPV) is a mechanism for regulating pulmonary blood flow that leads to a redistribution of perfusion from hypoxic alveolar areas to better ventilated alveoli of the lung, thus ensuring an optimized oxygenation of the circulating blood. Despite intensive research, the exact oxygen sensor and the underlying signal transduction pathway have not yet been fully identified. However, it is already known that pulmonary vascular tone and HPV can be regulated by nitric oxide (NO/cGMP-dependent mechanisms), cytochrome P450 (CYP450)-dependent metabolites or mitochondrial signals, all of which are targets of carbon monoxide (CO).

In recent years, CO has gained more importance as a possible therapeutic agent despite its well known toxic effects. Endogenously produced by hemeoxygenase through degradation of heme proteins CO is accredited with antioxidative, anti-inflammatory, antiproliferative, antiapoptotic and vasoregulatory properties. In the last two decades, this has led to the development of so-called *carbon monoxide-releasing molecules* (CORMs), which are capable of releasing smaller, controlled amounts of CO. In the lung, CO and CORMs appear to counteract the development of pulmonary hypertension (PH). However, the direct effect of CORMs on the pulmonary vascular reactivity and HPV in isolated lungs has not yet been investigated.

In this study, the effects of 10% CO inhalation and the application of the substances CORM-2 and CORM-3 on pulmonary vascular tone during normoxia and acute hypoxia (1% O₂ for 10 min) in isolated ventilated and perfused mouse lungs were assessed. The interaction of CO as well as CORM-2 with pulmonary cytochromes was detected simultaneously by tissue spectrophotometry. This allowed conclusions to be drawn about possible binding partners of CO that could be related to the regulation of pulmonary vasoreactivity.

Inhaled CO decreased both HPV and the vasoconstriction induced by the thromboxane mimetic U-46619 but did not alter KCL-induced vasoconstriction. In contrast, high concentrations of CORM-2 and CORM-3, which led to a measurable release of CO *in vitro*, induced a continuous increase in normoxic tone, which was even augmented in the presence of erythrocytes. Inhaled CO caused spectral alterations that were compatible with the inhibition of CYP450. In contrast, during application of CORM-2 spectrophotometric signs of interaction with CYP450 could not be detected.

Inhaled CO at supraphysiological concentrations has a vasodilatory effect in the isolated, ventilated and perfused mouse lung and is associated with an inhibition of CYP450. Application of CORMs at high concentrations in the model of the isolated, ventilated and perfused lung

however caused a pulmonary vasoconstriction. Further investigations are necessary to elucidate the discrepancy between the results of inhaled CO or *in vivo* administered CORMs and the effects of CORMs in the isolated lung.

8 Literaturverzeichnis

1. Marshall BE, Marshall C, Benumof J, Saidman LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981; 51(6):1543-1551.
2. Orchard CH, Sanchez de LR, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983; 338:61-74.
3. Cutaia M, Rounds S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. Physiologic significance, mechanism, and clinical relevance. *Chest* 1990; 97(3):706-718.
4. Von Euler U S, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946; 12:301-320.
5. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 2012; 92(1):367-520.
6. Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995; 100(2):159-169.
7. Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2006; 71(4):620-629.
8. Ariyaratnam P, Loubani M, Morice AH. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans. *Biomed Res Int* 2013; 2013:623684.
9. Fishman AP. Respiratory gases in the regulation of the pulmonary circulation. *Physiol Rev* 1961; 41:214-280.
10. Naeije R, Hallemans R, Melot C, Boeynaems JM, Mols P, Lejeune P, Rie MA. Eicosanoids and hypoxic pulmonary vasoconstriction in normal man. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 23(6):613-617.

11. Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F. Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 139(2):191-202.
12. Seeger W, Lasch H G. Respiratorische Insuffizienz. *Internist* 36 1995; 318-326.
13. Theissen J L, Meißner A. Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. *Anaesthesist* 1996; 45:643-652.
14. Naeije R, Brimiouille S. Physiology in medicine: importance of hypoxic pulmonary vasoconstriction in maintaining arterial oxygenation during acute respiratory failure. *Crit Care* 2001; 5(2):67-71.
15. Carter EP, Hartsfield CL, Miyazono M, Jakkula M, Morris KG, Jr., McMurtry IF. Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(2):L346-L353.
16. Marshall BE. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1990; 94:37-41.
17. Strielkov I, Pak O, Sommer N, Weissmann N. Recent advances in oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* (1985) 2017; 123(6):1647-1656.
18. Olschewski H. [Dana Point: what is new in the diagnosis of pulmonary hypertension?]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133 Suppl 6:S180-S182.
19. Rosenkranz S, Diller GP, Dumitrescu D, Ewert R, Ghofrani HA, Grüning E, Halank M, Held M, Kaemmerer H, Klose H, Kovacs G, Konstantinides S, Lang IM, Lange TJ, Leuchte H, Mayer E, Olschewski A, Olsson KM, Opitz C, Schermuly RT, Seeger W, Wilkens H, Hoeper MM. [Hemodynamic Definition of Pulmonary Hypertension: Commentary on the Proposed Change by the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 2019; 144(19):1367-1372.
20. Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. *Internist* 40 1999; 696-709.

21. McGoon MD, Kane GC. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(2):191-207.
22. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019; 53(1).
23. Koudstaal T, Boomars KA, Kool M. Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: An Immunological Perspective. *J Clin Med* 2020; 9(2).
24. Hoeper MM. [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension]. *Pneumologie* 2006; 60(7):428-440.
25. Hoeper MM, Barbera JA, Channick RN, Hassoun PM, Lang IM, Manes A, Martinez FJ, Naeije R, Olschewski H, Pepke-Zaba J, Redfield MM, Robbins IM, Souza R, Torbicki A, McGoon M. Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1 Suppl):S85-S96.
26. Mandras SA, Mehta HS, Vaidya A. Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians. *Mayo Clin Proc* 2020; 95(9):1978-1988.
27. Nathan SD, Barbera JA, Gaine SP, Harari S, Martinez FJ, Olschewski H, Olsson KM, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Provencher S, Weissmann N, Seeger W. Pulmonary hypertension in chronic lung disease and hypoxia. *Eur Respir J* 2019; 53(1).
28. Dawson CA, Grimm DJ, Linehan JH. Lung inflation and longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance during hypoxia. *J Appl Physiol* 1979; 47(3):532-536.
29. Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenny RW, Wagner WW, Jr. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997; 82(4):1084-1090.
30. Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 1966; 19(2):426-440.

31. Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1985; 88(4 Suppl):240S-245S.
32. Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 263(3 Pt 1):L384-L393.
33. Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3(5):457-465.
34. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1990; 259(2 Pt 2):H281-H289.
35. Aaronson PI, Robertson TP, Ward JP. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 132(1):107-120.
36. Liu Q, Sham JS, Shimoda LA, Sylvester JT. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280(5):L856-L865.
37. Jin N, Packer CS, Rhoades RA. Pulmonary arterial hypoxic contraction: signal transduction. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt 1):L73-L78.
38. Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994; 266(3 Pt 1):L223-L231.
39. Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP. Ca^{2+} sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(6):L1121-L1126.
40. Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampf V. Molecular identification of the role of voltage-gated K^+ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 1998; 101(11):2319-2330.

41. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992; 262(4 Pt 1):C882-C890.
42. Post JM, Gelband CH, Hume JR. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res* 1995; 77(1):131-139.
43. Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI, Evans AM. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 131(1):5-9.
44. Wang Z, Lanner MC, Jin N, Swartz D, Li L, Rhoades RA. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells: role of Rho-kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(4):465-471.
45. Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer SL. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res* 2002; 90(12):1307-1315.
46. Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001; 88(12):1259-1266.
47. Weissmann N, Ebert N, Ahrens M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Hänze J, Fink L, Rose F, Conzen J, Seeger W, Grimminger F. Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(6):721-732.
48. Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 2002; 91(8):719-726.
49. Sommer N, Hüttemann M, Pak O, Scheibe S, Knoepp F, Sinkler C, Malczyk M, Gierhardt M, Esfandiary A, Kraut S, Jonas F, Veith C, Aras S, Sydykov A, Alebrahimdehkordi N, Giehl K, Hecker M, Brandes RP, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grossmann LI, Weissmann N. Mitochondrial Complex IV Subunit 4

- Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ Res* 2017; 121(4):424-438.
50. Hoshi T, Lahiri S. Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* 2004; 306(5704):2050-2051.
 51. Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 2004; 306(5704):2093-2097.
 52. Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, Snyder SH. Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(6):1994-1997.
 53. Riesco-Fagundo AM, Perez-Garcia MT, Gonzalez C, Lopez-Lopez JR. O₂ modulates large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001; 89(5):430-436.
 54. Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M, Weissmann N. Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(4):353-364.
 55. Sommer N, Alebrahimdehkordi N, Pak O, Knoepp F, Strielkov I, Schiebe S, Dufour E, Andjelkovic A, Akylbek S, Saraji A, Petrovic A, Quanz K, Hecker M, Kumar M, Wahl J, Kraut S, Seege W, Schermuly RT, Ghofrani HA, Ramser K, Braun T, Jacobs HT, Weissmann N, Szibor M. Bypassing mitochondrial complex III using alternative oxidase inhibits acute pulmonary oxygen sensing. *Sci Adv* 2020; 6(16):eba0694.
 56. Olivares-Rubio HF, Espinosa-Aguirre JJ. Role of epoxyeicosatrienoic acids in the lung. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2020; 149:106451.
 57. Jacobs ER, Zeldin DC. The lung HETEs (and EETs) up. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(1):H1-H10.

58. Birks EK, Bousamra M, Presberg K, Marsh JA, Effros RM, Jacobs ER. Human pulmonary arteries dilate to 20-HETE, an endogenous eicosanoid of lung tissue. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 1):L823-L829.
59. Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ, Jacobs ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(4):H1526-H1533.
60. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 1996; 79(1):54-61.
61. Tan JZ, Kaley G, Gurtner GH. Nitric oxide and prostaglandins mediate vasodilation to 5,6-EET in rabbit lung. *Adv Exp Med Biol* 1997; 407:561-566.
62. Stephenson AH, Sprague RS, Weintraub NL, McMurdo L, Lonigro AJ. Inhibition of cytochrome P-450 attenuates hypoxemia of acute lung injury in dogs. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 2):H1355-H1362.
63. Zhu D, Bousamra M, Zeldin DC, Falck JR, Townsley M, Harder DR, Roman RJ, Jacobs ER. Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(2):L335-L343.
64. Kandhi S, Zhang B, Froogh G, Qin J, Alruwaili N, Yicong L, Yang YM, Hwang SH, Hammock BD, Wolin MS, Huang A, Sun D. EETs promote hypoxic pulmonary vasoconstriction via constrictor prostanoids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 313(2):L350-L359.
65. Keseru B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, Hammock BD, Falck JR, Weissmann N, Busse R, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J* 2008; 22(12):4306-4315.
66. Sommer N, Pak O, Schorner S, Derfuss T, Krug A, Gnaiger E, Ghofrani RT, Schermuly RT, Huckstorf C, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. Mitochondrial cytochrome

- redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *Eur Respir J* 2010; 36(5):1056-1066.
67. Schenkman JB, Jansson I. Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods Mol Biol* 2006; 320:11-18.
 68. Fanni D, Pinna F, Gerosa C, Paribello P, Carpinello B, Faa G, Manchia M. Anatomical distribution and expression of CYP in humans: Neuropharmacological implications. *Drug Dev Res* 2021; 82(5):628-667.
 69. Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 2002; 32(5):391-411.
 70. Pelkonen O, Raunio H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 4(Suppl 4):767-774.
 71. Miller MA, Hales CA. Role of cytochrome P-450 in alveolar hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs. *J Clin Invest* 1979; 64(2):666-673.
 72. Engel RR, Rodkey FL, O'Neal JD, Collison HA. Relative affinity of human fetal hemoglobin for carbon monoxide and oxygen. *Blood* 1969; 33(1):37-45.
 73. Piantadosi CA. Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(2):259-270.
 74. Yang XX, Ke BW, Lu W, Wang BH. CO as a therapeutic agent: discovery and delivery forms. *Chin J Nat Med* 2020; 18(4):284-295.
 75. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2011; 2(1):66-70.
 76. Gong W, Xia C, He Q. Therapeutic gas delivery strategies. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2022; 14(1):e1744.
 77. Ishibashi T. Therapeutic Efficacy of Molecular Hydrogen: A New Mechanistic Insight. *Curr Pharm Des* 2019; 25(9):946-955.

78. Knuf K, Maani CV. Nitrous Oxide. *Statpearls Publishing* 2022.
79. Zafonte RD, Wang L, Arbelaez CA, Dennison R, Teng YD. Medical Gas Therapy for Tissue, Organ, and CNS Protection: A Systematic Review of Effects, Mechanisms, and Challenges. *Adv Sci (Weinh)* 2022; 9(13):e2104136.
80. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 61(2):748-755.
81. Coburn RF, Blakemore WS, Forster RE. Endogenous carbon monoxide production in man. *J Clin Invest* 1963; 42(7):1172-1178.
82. Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res* 2013; 7(1):017111.
83. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:517-554.
84. Mannaioni PF, Vannacci A, Masini E. Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity. *Inflamm Res* 2006; 55(7):261-273.
85. Ryter SW, Choi AM. Therapeutic applications of carbon monoxide in lung disease. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(3):257-262.
86. Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. *Korean J Intern Med* 2013; 28(2):123-140.
87. Tripathi R, Yang X, Ryter SW, Wang B. Carbon Monoxide as a Therapeutic for Airway Diseases: Contrast and Comparison of Various CO Delivery Modalities. *Curr Top Med Chem* 2021; 21(32):2890-2908.
88. Jia XM, Zhou ZX, Huang JJ, Chu W, Guan QH. [Protective effects of the induction of heme oxygenase-1 on ischemia reperfusion lung injury: in vivo experiment with rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87(17):1211-1213.
89. Sakihama H, Lee GR, Chin BY, Csizmadia E, Gallo D, Qi Y, Gagliani N, Hongjun W, Bach FB, Otterbein LE. Carbon Monoxide Suppresses Neointima Formation in

- Transplant Arteriosclerosis by Inhibiting Vascular Progenitor Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41(6):1915-1927.
90. Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001; 166(6):4185-4194.
 91. Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998; 4(9):1073-1077.
 92. Tsuburai T, Suzuki M, Nagashima Y, Suzuki S, Inoue S, Hasiba T, Ueda A, Ikehara K, Matsuse T, Ishigatsubo Y. Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway. *Hum Gene Ther* 2002; 13(16):1945-1960.
 93. Zhou Z, Song R, Fattman CL, Greenhill S, Alber S, Oury TD, Choi AMK, Morse D. Carbon monoxide suppresses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166(1):27-37.
 94. Dolinay T, Szilasi M, Liu M, Choi AM. Inhaled carbon monoxide confers antiinflammatory effects against ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(6):613-620.
 95. Ding XQ, Liu GM, Wang JK, Sheng ZR. Vasodilative action of carbon monoxide on rat pulmonary artery in vitro. *Sheng Li Xue Bao* 2002; 54(1):38-42.
 96. Dubuis E, Potier M, Wang R, Vandier C. Continuous inhalation of carbon monoxide attenuates hypoxic pulmonary hypertension development presumably through activation of BKCa channels. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3):751-761.
 97. Goebel U, Wollborn J. Carbon monoxide in intensive care medicine-time to start the therapeutic application?! *Intensive Care Med Exp* 2020; 8(1):2.
 98. Waza AA, Hamid Z, Ali S, Bhat SA, Bhat MA. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflamm Res* 2018; 67(7):579-588.

99. Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 2002; 90(2):E17-E24.
100. Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, Clark JE, Foresti R, Green CJ. Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des* 2003; 9(30):2525-2539.
101. Foresti R, Hammad J, Clark JE, Johnson TR, Mann BE, Friebe A, Green CJ, Motterlini R. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 2004; 142(3):453-460.
102. Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5):1142-1146.
103. Haas KL, Franz KJ. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem Rev* 2009; 109(10):4921-4960.
104. Ling K, Men F, Wang WC, Zhou YQ, Zhang HW, Ye DW. Carbon Monoxide and Its Controlled Release: Therapeutic Application, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). *J Med Chem* 2018; 61(7):2611-2635.
105. Constantin M, Choi AJ, Cloonan SM, Ryter SW. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung disease. *Int J Hypertens* 2012; 2012:859235.
106. Ryter SW. Therapeutic Potential of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Acute Organ Injury, Critical Illness, and Inflammatory Disorders. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(11).
107. Abid S, Houssaini A, Mouraret N, Marcos E, Amsellem V, Wan F, Dubois-Randé, JL, Derumeaux G, Boczkowski J, Motterlini R, Adnot S. P21-dependent protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule-3 in pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(2):304-312.

108. Yan H, Du J, Zhu S, Nie G, Zhang H, Gu Z; Zhao Y. Emerging Delivery Strategies of Carbon Monoxide for Therapeutic Applications: from CO Gas to CO Releasing Nano-materials. *Small* 2019; 15(49):e1904382.
109. Roberts GP, Youn H, Kerby RL. CO-sensing mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(3):453-473.
110. Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26(3):270-280.
111. Wilson DF, Mokashi A, Chugh D, Vinogradov S, Osanai S, Lahiri S. The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a3 of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* 1994; 351(3):370-374.
112. Lahiri S, Antosiewicz J, Pokorski M. A common oxygen sensor regulates the sensory discharge and glomus cell HIF-1alpha in the rat carotid body. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 5(Pt 1):327-333.
113. Lahiri S, Iturriaga R, Mokashi A, Ray DK, Chugh D. CO reveals dual mechanisms of O2 chemoreception in the cat carotid body. *Respir Physiol* 1993; 94(2):227-240.
114. Deinum G, Stone JR, Babcock GT, Marletta MA. Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with Resonance raman spectroscopy. *Biochemistry* 1996; 35(5):1540-1547.
115. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991; 28(1-3):52-61.
116. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(5):1475-1479.
117. Ramos KS, Lin H, McGrath JJ. Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(8):1368-1370.

118. Vassalli F, Pierre S, Julien V, Bouckaert Y, Brimiouille S, Naeije R. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by carbon monoxide in dogs. *Crit Care Med* 2001; 29(2):359-366.
119. Tamayo L, Lopez-Lopez JR, Castaneda J, Gonzalez C. Carbon monoxide inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats by a cGMP-independent mechanism. *Pflügers Arch* 1997; 434(6):698-704.
120. Cantrell JM, Tucker A. Low-dose carbon monoxide does not reduce vasoconstriction in isolated rat lungs. *Exp Lung Res* 1996; 22(1):21-32.
121. Kourembanas S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(2):291-299.
122. Zuckerbraun BS, Chin BY, Wegiel B, Billiar TR, Czesmadia E, Rao J, Shimoda L, Ifedigbo E, Kanno S, Otterbein LE. Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med* 2006; 203(9):2109-2119.
123. Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, Casanello P, Méndez N, Ebensperger R, Sepúlveda-Kattan E, Pulgar VM, Cabello G, Blanco CE, Hanson MA, Parer JT, Llanos AJ. Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc Res* 2008; 77(1):197-201.
124. Knowlton FP, Starling EH. The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *J Physiol* 1912; 44(3):206-219.
125. Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer HJ, Ermer L, Kiss L. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol* 1994; 233:549-584.
126. Uhlig S., Held H.D. Lung Metastases and Isolated Lung Perfusion. *Nova Science Publishers, Inc.*; 2007.
127. Pokreisz P, Fleming I, Kiss L, Barbosa-Sicard E, Fisslthaler B, Falck JR, Hammock BD, Kim IH, Szelid Z, Vermeersch P, Gillijns H, Pellens M, Grimminger F, van

- Zonneveld AJ, Collen D, Busse R, Janssens S. Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling. *Hypertension* 2006; 47(4):762-770.
128. Lindeborg D M, Kavanagh B P, Van Meurs K, Pearl R G. Inhaled nitric oxide does not alter the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance. *Journal of Applied Physiology* 1995; 78(1):341-348.
129. Rimar S, Gillis CN. Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation* 1993; 88(6):2884-2887.
130. Rimar S, Gillis CN. Site of pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide in the perfused lung. *J Appl Physiol* 1995; 78(5):1745-1749.
131. Walmrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1997; 10(5):1084-1092.
132. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal* 2004; 16(5):521-533.
133. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2008; 118(1):18-35.
134. Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, Foresti R, Motterlini R. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res* 2003; 93(2):e2-e8.
135. De BO, Elinck E, Blanckaert B, Leybaert L, Motterlini R, Lefebvre RA. Water-soluble CO-releasing molecules reduce the development of postoperative ileus via modulation of MAPK/HO-1 signalling and reduction of oxidative stress. *Gut* 2009; 58(3):347-356.
136. Hervera A, Leanez S, Motterlini R, Pol O. Treatment with carbon monoxide-releasing molecules and an HO-1 inducer enhances the effects and expression of micro-opioid receptors during neuropathic pain. *Anesthesiology* 2013; 118(5):1180-1197.

137. Stagni E, Privitera MG, Bucolo C, Leggio GM, Motterlini R, Drago F. A water-soluble carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) lowers intraocular pressure in rabbits. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(2):254-257.
138. Sun B, Sun Z, Jin Q, Chen X. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice. *Int J Biol Sci* 2008; 4(3):176-183.
139. Luchini PD, Leyton JF, Strombeck ML, Ponce JC, Jesus M, Leyton V. Validation of a spectrophotometric method for quantification of carboxyhemoglobin. *J Anal Toxicol* 2009; 33(8):540-544.
140. Correia M, Ortiz de Montellano P. Inhibition of Cytochrome P450. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer, Boston, MA; 2005.
141. Sommer N. Mitochondria and Cellular Cytochromes as Oxygen Sensors in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Justus-Liebig-Universität Gießen, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II*; 2011
142. Wang R, Wu L, Wang Z. The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1997; 434(3):285-291.
143. Yoo HY, Park SJ, Bahk JH, Kim SJ. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction of rats by carbon monoxide. *J Korean Med Sci* 2010; 25(10):1411-1417.
144. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000; 80(4):1291-1335.
145. Ma X, Sayed N, Beuve A, van den AF. NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J* 2007; 26(2):578-588.
146. Ahmad M, Zhao X, Kelly MR, Kandhi S, Perez O, Abraham NG, Wolin MS. Heme oxygenase-1 induction modulates hypoxic pulmonary vasoconstriction through upregulation of eSOD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(4):H1453-H1461.
147. Sylvester JT, McGowan C. The effects of agents that bind to cytochrome P-450 on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circ Res* 1978; 43(3):429-437.

148. Zhou GL, Beloiartsev A, Yu B, Baron DM, Zhou W, Niedra R, Lu N, Tainsh LT, Zapol WM, Seed B, Bloch KD. Deletion of the murine cytochrome P450 Cyp2j locus by fused BAC-mediated recombination identifies a role for Cyp2j in the pulmonary vascular response to hypoxia. *PLoS Genet* 2013; 9(11):e1003950.
149. Strielkov I, Krause NC, Knoepp F, Alebrahimdehkordi N, Pak O, Garcia C, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Sommer N, Weissmann N. Cytochrome P450 epoxygenase-derived 5,6-epoxyeicosatrienoic acid relaxes pulmonary arteries in normoxia but promotes sustained pulmonary vasoconstriction in hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2020; 230(1):e13521.
150. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33(18):5636-5640.
151. Queiroga CS, Almeida AS, Vieira HL. Carbon monoxide targeting mitochondria. *Biochem Res Int* 2012; 2012:749845.
152. Fisher AB, Dodia C. Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO. *Am J Physiol* 1981; 241(1):E47-E50.
153. Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ, Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol* 2005; 145(6):800-810.
154. Yang X, de CM, Otterbein LE, Wang B. Carbon monoxide: An emerging therapy for acute kidney injury. *Med Res Rev* 2020; 40(4):1147-1177.
155. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14(11):1305-1318.
156. Pak O, Bakr AG, Gierhardt M, Albus J, Strielkov I, Kroschel F, Hoeres T, Hecker M, Ghofrani HA, Seeger W, Weissmann N, Sommer N. Effects of carbon monoxide-releasing molecules on pulmonary vasoreactivity in isolated perfused lungs. *J Appl Physiol (1985)* 2016; 120(2):271-281.

157. Faizan M, Muhammad N, Niazi KUK, Hu Y, Wang Y, Wu Y, Sun H, Liu R, Dong W, Zhang W, Gao Z. CO-Releasing Materials: An Emphasis on Therapeutic Implications, as Release and Subsequent Cytotoxicity Are the Part of Therapy. *Materials (Basel)* 2019; 12(10).
158. Ismailova A, Kuter D, Bohle DS, Butler IS. An Overview of the Potential Therapeutic Applications of CO-Releasing Molecules. *Bioinorg Chem Appl* 2018; 2018:8547364.
159. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4):585-630.
160. Koley AP, Robinson RC, Markowitz A, Friedman FK. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and flavones with cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum: effect on CO binding kinetics. *Biochemistry* 1995; 34(6):1942-1947.
161. Boumba VA, Vougiouklakis T. Evaluation of the methods used for carboxyhemoglobin analysis in postmortem blood. *Int J Toxicol* 2005; 24(4):275-281.
162. Kautz AC, Kunz PC, Janiak C. CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems. *Dalton Trans* 2016; 45(45):18045-18063.
163. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14(11):1305-1318.
164. Finney LA, O'Halloran TV. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 2003; 300(5621):931-936.

9 Abkürzungsverzeichnis

Δ -PAP	Änderung des pulmonalarteriellen Druckes
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
AA	Arachnoidonsäure
Abb.	Abbildung
AMP	Verstärkermodul (engl. <i>amplifier</i>)
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B _K	Kaliumkanal, auch Maxi-K oder slo abgekürzt, spannungsabhängiger Ca ²⁺ -aktivierter Kaliumkanal (B _K)
BT	Blasenfalle (engl. <i>bubble trap</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cADPR	zyklische ADP-Ribose
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CO-Hb	Kohlenmonoxid-Hämoglobin
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)

CORM	CO-freisetzendes Molekül (engl. <i>carbonmonoxide releasing molecule</i>)
CTEPH	chronisch thrombo-embolische pulmonale Hypertonie
CYP450	Cytochrom P450
Cyt	Cytochrom
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäuren
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
FH	Wärmetauscher (engl. <i>flow heater</i>)
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration oder -fraktion
FT	Wägezelle (engl. <i>force transducer</i>)
g	Gramm
GSH/GSSG	reduziertes/oxidiertes Glutathion
h	Stunden (lat. <i>hora</i>)
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
He	Helium
20-HETE	20-Hydroxyeicosatriensäure
HMV	Herzminutenvolumen
HO	Hämoxygenase
HO-1	Hämoxygenase-1, Isoenzym der Hämoxygenasen
HO-2	Hämoxygenase-2, Isoenzym der Hämoxygenasen
HO-3	Hämoxygenase-3, Isoenzym der Hämoxygenasen
HOX	Hypoxie

HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
iCORM	inaktiviertes <i>Carbon monoxide releasing molecule</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IP ₃	Inositoltrihosphat
i.p.	intraoperativ
KCL	Kaliumchlorid
K _v -Kanal	voltage-dependent (spannungsabhängiger) Kaliumkanal
LVK	linksventrikulärer Katheter
LVP	linksventrikulärer Druck (engl. <i>Left ventricular pressure</i>)
MbCO	Carboxymyoglobin
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	pulmonalarterieller Mitteldruck
n	Nummer (lat. numerus, engl. <i>number</i>)
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
Nr.	Nummer(n)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADH/NAD ⁺	reduziertes/oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	Normoxie
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
O ₃	Ozon
p	Wahrscheinlichkeit (<i>Probability</i>)
PH	pulmonale Hypertonie
PAH	pulmonalerterielle Hypertonie (<i>Pulmonary Arterial Hypertension</i>)
PAK	Pulmonalkatheter
PAL	ProteinaseLösung
PAMSC	pulmonalerterielle glatte Muskelzelle (engl. <i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i>)
PAP	pulmonalerterieller Druck
PBS	Phosphatpufferlösung
PC	Personal Computer
PDE-5	Phosphodiesterase Typ 5
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
pH	Maß für den Säure- oder Basencharakter einer wässrigen Lösung
PH	pulmonale Hypertonie
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
ppm	parts per million
PT	Druckaufnehmer (engl. <i>pressure transducer</i>)
R	Reservoir
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RVSD	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
s	Sekunde(n)
sGC	lösliche Guanylatcyclase (engl. <i>soluble guanylate cyclase</i>)
s.o.	siehe oben

s.u.	siehe unten
t $\frac{1}{2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TP	Rollenpumpe (engl. <i>tubing pump</i>)
U-46619	Thromboxananalogon (9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -e poxymethanoprostaglandin F2 α)
VOCC	spannungsgesteuerter Calciumkanal (<i>voltage-operated calcium channel</i>)
VP	Beatmungsdruck (<i>ventilation pressure</i>)
WT	Wildtyp
Xe	Xenon
z.B.	zum Beispiel

10 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Abbau von Häm durch die Hämoxagenase unter Freisetzung von endogenem Kohlenmonoxid	12
Abbildung 2-1: Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge - Ventilation und Perfusion	23
Abbildung 2-2: Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge	24
Abbildung 2-3: Isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge nach Intubation und Sondierung der Pulmonalarterie	27
Abbildung 2-4: $[\text{RU}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (CORM-2)	34
Abbildung 2-5: $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$ (CORM-3)	34
Abbildung 2-6: Kontrollgruppe: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel	36
Abbildung 2-7: Applikation von CO während normoxischer und hypoxischer Ventilation	36
Abbildung 2-8: Durch U-46619 ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO- Applikation	37
Abbildung 2-9: Durch KCl ausgelöste Vasokonstriktionen unter Normoxie mit CO- Applikation	38
Abbildung 2-10: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit Applikation von Sulphaphenazole in steigenden Konzentrationen	38
Abbildung 2-11: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit Applikation von CORM-2 oder CORM-3 oder deren inaktiver Form	39
Abbildung 2-12: Normoxische und hypoxische Ventilation im Wechsel mit einmaliger Applikation von CORM-2 oder CORM-3 oder deren inaktiver Form	39

Abbildung 3-1: Repräsentatives Experiment mit Inhalation von 10 % CO während normoxischer und hypoxischer Ventilation in der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge.	41
Abbildung 3-2: Effekt von 10% CO auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) während normoxischer (NOX) und hypoxischer Ventilation (HOX), verglichen mit dem PAP ohne CO Inhalation (Kontrolle)	42
Abbildung 3-3: Effekt von inhaliertem CO auf die durch KCl und U-46619 ausgelöste Vasokonstriktion.	42
Abbildung 3-4: Applikation von Sulfaphenazole: Effekt verschiedener Konzentrationen von Sulfaphenazole auf den pulmonalarteriellen Druck (PAP) während hypoxischer Beatmung und während der Gabe von U-46619	43
Abbildung 3-5: Freisetzung von CO durch CORMs im Perfusat/Erythrozytengemisch <i>in vitro</i>	44
Abbildung 3-6: Freisetzung von CO durch CORMs im Perfusat <i>in vitro</i>	45
Abbildung 3-7: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus	47
Abbildung 3-8: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus	48
Abbildung 3-9: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus	50
Abbildung 3-10: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung)	52
Abbildung 3-11: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung)	53

- Abbildung 3-12: Effekt der Perfusion mit CORM-2 und CORM-3 auf den pulmonalvaskulären Tonus in Anwesenheit von Erythrozyten (1% in der Pufferlösung) 54
- Abbildung 3-13: Spektrale Veränderungen nach Applikation von inhalativem CO (10 % CO). 57
- Abbildung 3-14: Balkendiagramm, welches den Multiplikationsfaktor in Prozent darstellt, der nötig ist, um das Referenzspektrum des jeweiligen Chromophoren in das Summationsspektrum von CO während Normoxie und Hypoxie zu „fitten“ 58
- Abbildung 3-15: Spektrometrische Veränderungen während der Applikation von CORM-2 und iCORM-2 60

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verschiedene Cytochrome und ihr Absorptionsmaxima	31
Tabelle 2-2: Zusammensetzung der in den Versuchen verwendeten Gasgemische	35

12 Anhang

12.1 Publikationen

12.1.1 Originalarbeiten

Pak, O.; Bakr, A. G.; Gierhardt, M.; **Albus, J.**; Strielkov, I.; Kroschel, F.; Hoeres, T.; Hecker, M.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Weissmann, N.; Sommer, N. Effects of carbon monoxide-releasing molecules on pulmonary vasoreactivity in isolated perfused lungs. J Appl Physiol (1985) 2016; 120(2):271-281.

12.2 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Wettenberg, 28.05.2024

Ort, Datum

Unterschrift

12.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Natascha Sommer für die Themenstellung und hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit. Ich bewundere ihre Kompetenz und ihre Gelassenheit und bin ihr unsäglich dankbar für ihre unendliche Geduld mit mir und dieser Arbeit, ihre unaufhörliche Ermunterung, das offene Ohr zu jeder Zeit und die inzwischen entstandene Freundschaft.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. W. Seeger, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Möglichkeit zur Durchführung der wissenschaftlichen Tätigkeit und die finanzielle Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Weißmann und der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere auch bei Karin Quanz, für die freundliche Atmosphäre im Labor, die anregenden Diskussionen und den fortwährenden Beistand bedanken.

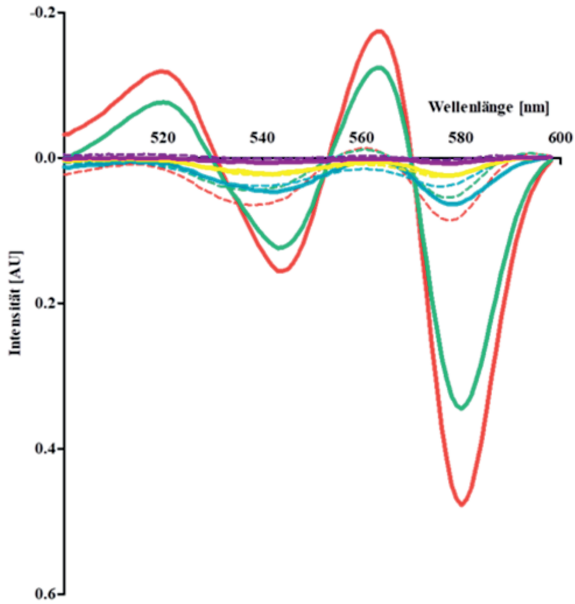
Des Weiteren möchte ich mich bei Rio bedanken, der mir mit Rat und auch Tat sowie motivierenden Worten zur Seite stand.

Außerdem danke ich Stephi, Matze, Aleksa und Bianca für die Hilfestellungen und Korrekturen.

Besonders dankbar bin ich meiner Familie, insbesondere meinem Vater Udo, der mir ein großes Vorbild als Wissenschaftler ist, für die kontinuierliche Unterstützung in allen Lebenslagen und den ständigen Ansporn. Meinem lieben David, für sein Verständnis und seine Unterstützung sowie sorgfältige Korrektur. Und zuletzt danke ich meinen drei wundervollen Kindern Joshua, Noemi und Ava für ihre Geduld während des Fertigstellens dieser Arbeit, für ihre Liebe und dafür, dass sie jeden Tag lebenswert machen.

12.4 Tabellarischer Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7194 3

