

Untersuchungen über den Einfluss eines Kalzium-Antagonisten, eines  
NADPH-Oxidase-Inhibitors und verschiedener Inhibitoren der  
mitochondrialen Atmungskette auf die akute und protrahierte Phase der  
hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion am Modell der isolierten  
Kaninchenlunge

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

vorgelegt von Stefanie Zeller  
aus Villingen

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Universitätsklinikums Gießen – Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. N. Weißmann

Gutachter: PD Dr. B. Rosengarten

Tag der Disputation: 08.03.2007

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	5
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Aufgabe und Anatomie der Lunge.....	6
1.2 Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion.....	6
1.3 Medizinische Bedeutung der HPV.....	8
1.4 Sensoren und Signaltransduktion.....	9
1.5 Die mitochondriale Atmungskette.....	10
1.6 Zielsetzung.....	12
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Perfusions- und Beatmungssystem.....	14
2.2 Lungenpräparation und Integration der Lunge in das Meßsystem.....	16
2.3 Datengewinnung.....	19
2.4 Versuchsmodus.....	20
2.5 Darstellung und Auswertung.....	23
2.6 Verwendete Substanzen und Applikationsmodi.....	26
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1 AEBSF (Pefabloc).....	32
3.2 Verapamil.....	34
3.3 Rotenon.....	36
3.4 MPP <sup>+</sup> .....	38
3.5 3-NPA.....	40
3.6 Antimycin A.....	42
3.7 Cyanid.....	44
3.8 Allgemeines.....	47
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1 Kalzium-Antagonist.....	48
4.2 NAD(P)H-Oxidase Inhibitor.....	50

4.3	Inhibition der mitochondriale Atmungskette.....	53
4.4	Posthypoxische Vasorelaxation.....	58
4.5	Schlussfolgerungen.....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>79</b>

## Abkürzungen

3-NPA	3-Nitropropionsäure (3-nitropropionic acid)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzoesulfonyl-fluorid-hydrochlorid
Abb.	Abbildung
ARDS	akutes Lungenversagen (adult respiratory distress syndrome)
AUC	Fläche unter der Kurve (area under curve)
COPD	chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DPI	Diphenyleneiodonium
FAD	Flavinadenindinukleotid
GSH	Glutathionsulfhydryl
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
Hox	Hypoxie
HPV	hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
LMNNA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium iodid
NAD(P)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)
PAP	pulmonalarterieller Druck (pulmonale artery pressure)
PC	Personalcomputer
PEEP	positiv endexpiratorischer Druck (positive endexpiratory pressure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufgabe und Anatomie der Lungen

Die Lunge ist das Gasaustauschorgan des Körpers. In ihr wird Sauerstoff aus der Umgebung aufgenommen und Kohlendioxid aus dem Blut abgegeben. Durch den Einatmungs- und Ausatmungsprozess findet die Ventilation der Lungen statt.

Der luftführende Teil der Lunge ist der sogenannte Bronchialbaum, ein Röhrensystem, das sich wiederholt aufzweigt. Je nach Lungenregion finden sich 18 bis 25 Teilungsgenerationen. Distal geht der Bronchialbaum in die Lungenbläschen (Alveolen) über, die von einem dichten Kapillarnetz umspinnen werden. Hier sind die für den Gastransport im Blut wesentlichen Erythrozyten nur durch eine kurze, zelluläre Diffusionsstrecke von der Atemluft getrennt. An dieser Stelle findet der Gasaustausch zwischen Kapillarblut und dem alveolären Gas statt. Das Blut transportiert den Sauerstoff zu den Geweben des Körpers, wo dieser verstoffwechselt wird, und sorgt gleichzeitig für den Rücktransport des anfallenden Kohlendioxids zur Lunge (8, 52).

## 1.2 Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion

Auch gesunde Lungen sind nicht in allen Arealen gleich gut belüftet. Neben optimal ventilerten Bereichen gibt es physiologischerweise auch weniger gut bis gar nicht belüftete (hypoxische) Bereiche (18).

In diesen Arealen ist die Differenz der Sauerstoffpartialdrücke zwischen gemischt-venösem Blut und alveolarer Atemluft nicht groß genug, um eine ausreichende Oxygenierung des Blutes zu gewährleisten. Es kommt zum sogenannten „Shuntfluß“, d.h. Blut durchfließt den Lungenkreislauf ohne dabei ausreichend mit Sauerstoff angereichert zu werden (6).

Um den Shuntfluß zu drosseln, und damit gleichzeitig die Lungenfunktion, d.h. die Oxygenierung des Blutes zu optimieren, ist es notwendig, die Perfusion der Ventilation anzupassen. Der Blutfluss in den hypoxischen Lungenarealen wird minimiert und der Blutstrom dadurch in besser ventilerte Areale mit höherem

Sauerstoffpartialdruck umgeleitet. Somit kann eine höhere Sauerstoffaufnahme des Blutes erreicht werden.

Dies geschieht durch eine Widerstandserhöhung in den präkapillaren, noch muskularisierten Arteriolen der schlecht ventilierten Areale, durch die sogenannte hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV).

1946 wurde dieser Mechanismus von von Euler und Liljestrand zum ersten Mal auf der Basis von Untersuchungen an Katzen beschrieben (95). Synonym wird die HPV daher auch von Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt. Der Mechanismus konnte bei allen bis heute daraufhin untersuchten Säugetieren, einschließlich des Menschen, nachgewiesen werden. Und obwohl die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion seither Gegenstand intensiver Forschung war und ist, konnten die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen bzw. die biochemische Regulation noch nicht eindeutig geklärt werden.

Allerdings konnte die HPV intensiver charakterisiert werden und man unterscheidet heute zwei Phasen: In der ersten, akuten Phase kommt es innerhalb von 5 Minuten nach einsetzen der Hypoxie zur Vasokonstriktion, die nach weiteren 5 bis 15 Minuten teilweise nachlässt. Danach folgt bei Anhalten der Hypoxie die zweite, subakute oder protrahierte Phase, die durch eine erneute Zunahme der Vasokonstriktion gekennzeichnet ist. Nicht alle Untersucher finden eine biphasische Reaktion, sie ist jedoch für Menschen, intakte Lungenmodelle und isolierte pulmonalarterielle Gefäße beschrieben (7, 25, 49, 67, 71, 72, 107, 108, 114, 116, u.a.). Es existieren nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Verlauf der HPV über mehrere Stunden beschäftigen. Dabei scheint gerade die protrahierte Phase der HPV wichtig zu sein, da es unter chronischer Hypoxie zu einer Fixierung des erhöhten Gefäßwiderstandes mit morphologischen Korrelaten kommt, wie etwa bei der pulmonalen Hypertonie (s.u.). Eine weitere Klärung des Mechanismus der HPV scheint interessant, da er ubiquitär vorkommt und für eine gute Gasaustauschfunktion essentiell ist. Weiterhin können durch Störungen der HPV große klinische Probleme entstehen. Eine therapeutische Intervention ist hierbei unabdingbar an ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen gebunden.

### 1.3 Medizinische Bedeutung der HPV

Eine Dysregulation der HPV kann in zwei Richtungen geschehen. Es kann zu einem Ausfall der HPV kommen oder aber zu einer global gesteigerten HPV.

Der erste Zustand findet sich vor allem bei Pneumonie-Patienten. In den entzündeten Lungenarealen kommt es nur noch zu einer verminderten bis fehlenden HPV. Obwohl diese Areale schlecht ventiliert werden, sind sie stets sehr gut perfundiert. Der Shuntfluß nimmt zu, und das Blut kann oft nur unzureichend oxygeniert werden. Noch drastischer ist die Situation bei Sepsis-Patienten zu beurteilen, bei denen es zum vollständigen Ausfall der HPV kommen kann (80, 89).

Im Zuge des ARDS kann es ebenfalls zu einer verminderten HPV kommen (41, 78, 79, 80, 118) und auch im Zusammenhang mit Leberzirrhose ist diese Erscheinung beschrieben (41, 93, 108).

Bei anderen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Mukoviszidose oder COPD findet man eine globale oder zumindest weite Teile der Lunge betreffende gesteigerte HPV. Der pulmonalarterielle Druck der Lunge steigt. Bleibt diese Situation über einen längeren Zeitraum bestehen kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie der Media der Gefäße (28, 50). Man spricht vom sog. „remodelling“. Diese morphologischen Veränderungen sind nun weitgehend irreversibel und bedingen eine fixierte Hypertonie. Die rechte Herzkammer ist auf Dauer damit überfordert, trotz des erhöhten Widerstandes einen ausreichenden Blutfluss durch die Lunge zu gewährleisten. Sie hypertrophiert und es entwickelt sich ein „Cor pulmonale chronicum“.

Bei in großer Höhe Lebenden findet sich auch eine globale alveolare Hypoxie mit daraus resultierender erhöhter HPV und Rechtsherzbelastung.

Dagegen zeigt das akute Höhenödem pathophysiologische Ähnlichkeit mit dem ARDS und ist möglicherweise auf eine ungleichmäßige HPV zurückzuführen (63, 76). Nicht zuletzt spielt die HPV bei der Oxygenierung beatmeter Patienten bei Operationen und auf Intensivstation eine große Rolle. Besonders die Ein-Lungen-Beatmung wird hierdurch erst ermöglicht. Beim Kollaps des zu operierenden Lungenflügels nimmt der Shuntfluß zunächst zu, die Oxygenierung sinkt. Durch die HPV erfolgt eine Umverteilung des Blutflusses in den beatmeten Lungenflügel und erlaubt dadurch eine ausreichende Oxygenierung (24, 58, 70, 89, 117).



In diesem Rahmen sei auch auf den Einfluss verschiedener klinisch eingesetzter Medikamente auf die HPV hingewiesen. So vermindern z.B. volatile Anästhetika die HPV, während hingegen intravenös verabreichte Anästhetika die HPV nicht oder nur kaum verändern (9).

#### **1.4 Sensoren und Signaltransduktion der HPV**

Die HPV ist dort zu lokalisieren, wo die Gefäße engen Kontakt zu der sich in den Alveolen der Lunge befindenden Atemluft haben: in den präkapillaren, noch muskularisierten Gefäßen. Als Ort der Sauerstoff-Registrierung gelten die glatten Gefäßmuskelzellen, da diese isoliert unter Hypoxie kontrahieren können und ein Anstieg des intrazellulären Kalziums messbar ist (38, 60, 82, 86, 107 u.a.). Es gibt unterschiedliche Vorstellungen über den genauen Sauerstoffsensor und über den Mechanismus, der in der Lunge bei Abfall des Sauerstoffpartialdruckes zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur führt. Deshalb soll hier ein kurzer Überblick über die zurzeit diskutierten Hypothesen gegeben werden.

Weitgehend akzeptiert ist, dass für die Kontraktion der glatten Gefäßmuskeln ein Anstieg des intrazellulären Kalziums  $[Ca^{2+}]_i$  notwendig ist (15, 33, 71, 72, 75, 92, 98, 99, 115 u.a.). Der Ursprung dieses Kalziums ist nicht eindeutig geklärt. Es wird sowohl ein extrazellulärer Ursprung (15, 71, 75, 92) als auch eine Freisetzung aus intrazellulären Kalzium-Speichern (wie etwa dem Sarkoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien) diskutiert (23, 40, 59, 115). Als  $Ca^{2+}$ -Kanal, durch den der Einstrom im Wesentlichen erfolgt, wurde ein spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanal vom L-Typ identifiziert (49, 75, 92). Neuere Untersuchungen weisen zusätzlich darauf hin, dass insbesondere in der subakuten Phase der HPV auch nicht selektive Kationen-Kanäle und kapazitativer Kalzium-Einstrom eine Rolle spielen (43, 71, 98).

Durch die Hemmung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle ( $K_V$ -Kanäle) unter Hypoxie kann es nachweislich zur Depolarisation der Zellen und zum Kalzium-Einstrom kommen (2, 65, 68, 69, 91, 104). Alternativ könnte der Kalzium-Einstrom auch durch die Freisetzung einer primär kleinen Menge an Kalzium aus intrazellulären Speichern getriggert werden (33, 71, 75, 92).

Als eigentlicher Sauerstoffsensoren kommen somit direkt sauerstoffsensitive  $\text{Ca}^{2+}$ - (40) oder  $\text{K}^{+}$ -Kanäle (36) in Frage. Neueste Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass Mitochondrien (100, 101) und/oder NAD(P)H-Oxidasen (13, 39, 106) die primären Sauerstoffsensoren darstellen.

Mitochondrien und NAD(P)H-Oxidase stehen in der Diskussion, über eine Änderung des Redox-Status der Zelle entsprechende spannungsabhängige Kanäle zu beeinflussen. Als mögliche Vermittler der Änderung des Redox-Status werden sowohl ein direkter Einfluss des Anstiegs oder Abfalls der Konzentration reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) als auch die (sekundäre) Änderung des Verhältnisses von Redox-Paaren (z.B.  $\text{NAD(P)}^{+}$  zu  $\text{NAD(P)H}$ , GSH zu GSSG) diskutiert (13, 37, 81, 86, 101, 107).

Es gibt starke Hinweise dafür, dass innerhalb der Mitochondrien die Enzyme der Atmungskette an der Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale beteiligt sind (10, 14, 47, 66). So zeigen Zellen ohne mitochondriale DNA ( $\rho^0$ -Zellen) weder eine HPV noch eine Sauerstoff-Radikal-Bildung unter Hypoxie (11, 102). Möglicherweise wird auch der Kalzium-Haushalt direkt durch Mitochondrien beeinflusst (42, 74, 87, 98). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass zahlreiche vasoaktive Substanzen, wenn auch nicht ursächlich, so doch modulatorisch, Einfluss auf die HPV nehmen. Zu nennen sind hier u.a. Stickstoffmonoxid, Angiotensin II, biogene Amine, Neurotransmitter, sympathisch und parasympathische Innervation, Produkte des Arachidonsäuremetabolismus und Glucose (29, 41, 47, 87, 113).

Die unterschiedlichen Interpretationsmöglichkeiten bezüglich des primären Sauerstoffsensors (Ionenkanäle, NAD(P)H-Oxidasen, Mitochondrien) sowie die z.T. paradoxen Ergebnisse im Bezug auf die gemessenen Sauerstoffradikale unter Hypoxie (Anstieg vs. Abfall) sind aktuell Bestandteil vieler Diskussionen und Untersuchungen.

## **1.5 Die mitochondriale Atmungskette**

Da in der vorliegenden Arbeit mehrere Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette verwendet wurden, soll diese hier kurz beschrieben werden.

Neben den Enzymkomplexen für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, für den Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung sind die Proteine der Atmungskette wichtiger Bestandteil der Mitochondrien.

Die Mitochondrien, die eine eigene ringförmige DNA besitzen, sind aus einer äußeren und inneren Membran aufgebaut. Die innere Membran ist stark gefaltet und umhüllt den sog. Matrixraum.

An der inneren Membran finden sich die Enzyme der Atmungskette. Ihre Aufgabe ist es, das durch die Pyruvatdehydrogenase und den Citratzyklus gebildete NADH und  $\text{FADH}_2$  zu reoxidieren. Dabei wird  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert. Gleichzeitig wird über die innere Membran ein pH-Gradient erzeugt, der letztendlich die ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung antreibt.

Insgesamt lassen sich mehrere Transmembrankomplexe (Komplex I, II, III und IV), ein kleiner, an der äußeren Membran anliegender Proteinkomplex (Cytochrom c) und das in der Membran bewegliche Coenzym Q (Ubichinol/Ubichinon) unterscheiden (s. Abb. 1).

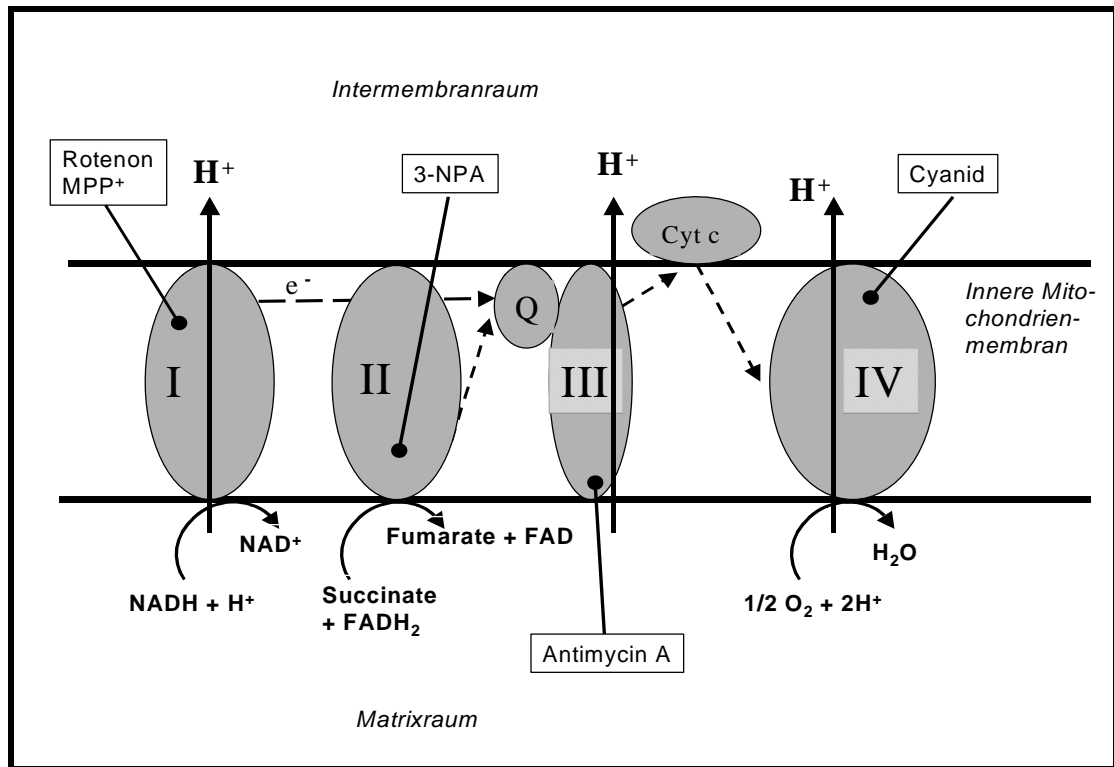
Komplex I (NADH-Coenzym Q-Reduktase) ist ein großes Protein mit bis zu 30 Untereinheiten. Es enthält ein Flavinmononukleotid und sechs bis sieben Eisen-Schwefel-Cluster. Damit ist es in der Lage, NADH zu oxidieren und zwei Elektronen einzeln über Coenzym Q an Komplex III weiter zu geben. Gleichzeitig werden dabei zwei  $\text{H}^+$  Ionen in das äußere Kompartiment transportiert.

Komplex II, welcher auch ein Enzym des Zitronensäurezyklus ist, hat eine dem Komplex I ähnliche Aufgabe. Er oxidiert  $\text{FADH}_2$  und gibt ebenfalls Elektronen über Coenzym Q an Komplex III weiter. Allerdings ist es mit nur vier Untereinheiten (drei Eisen-Schwefel-Cluster und einem Cytochrom b) wesentlich kleiner und kann keine  $\text{H}^+$  Ionen transportieren.

Komplex III (Coenzym Q-Cytochrom c-Reduktase) überträgt die Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom c und so letztendlich auf Komplex IV. Er enthält ein Eisen-Schwefel-Cluster und drei Cytochrome und transportiert je Elektron vier  $\text{H}^+$  Ionen über die Membran.

Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) überträgt die Elektronen letztendlich auf  $\text{O}_2$  und reduziert es zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Dieser Prozess geschieht unter zu Hilfenahme von zwei Cytochromen und zwei Kupfer-Ionen und transportiert noch einmal zwei  $\text{H}^+$  Ionen pro Elektron in das äußere Kompartiment. (53, 94).

Als Enzyme der ROS-Bildung werden hierbei Komplex I und III diskutiert (10, 14, 47, 57, 60). Paddenberg et al. postulieren unter hypoxischen Bedingungen auch eine Beteiligung von Komplex II an der ROS-Produktion (66).



**Abb.1:** Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Die gestrichelten Linien stellen den Elektronenfluss dar. Zusätzlich sind die Ansatzstellen der verwendeten Inhibitoren (Kästchen) eingezeichnet. I-IV: Komplex I-IV, Q: Coenzym Q, Cyt c: Cytochrom c (nach 94, modifiziert nach 85)

## 1.6 Zielsetzung

Obwohl der Mechanismus der HPV bereits lange bekannt ist, konzentriert sich die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen zumeist nur auf die akute Phase, und nur in wenigen Arbeiten wurden Versuche mit Hypoxie-Zeiten berücksichtigt, die länger als 10 bis 20 Minuten dauerten. Dabei scheint gerade auch der subakuten Phase klinische Bedeutung zu zukommen, da sie zur anschließenden chronischen Phase mit morphologischen Gefäßveränderungen der Lunge führt.

Es ist nicht geklärt und wenig untersucht, ob der subakuten und chronischen Phase der HPV die gleichen Sensor- und Regulationsmechanismen zugrunde liegen wie der akuten Phase.

In den nachfolgenden Experimenten sollte am Modell der isolierten, artifiziell perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge der Einfluss verschiedener Substanzen auf die subakute und chronische Phase der HPV untersucht werden.

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen handelte es sich um einen Kalzium-Antagonisten, einen Hemmstoff der NADPH-Oxidase und um Hemmstoffe der verschiedenen Stufen der mitochondrialen Atmungskette. Bei allen Substanzen war aus vorrausgegangenen Arbeiten bekannt, dass sie selektiv die akute Phase der HPV hemmen. Einzige Ausnahme bildet die unspezifisch hemmende Substanz 3-NPA, die verwendet wurde, da kein selektiver Komplex II Inhibitor bekannt ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Perfusions- und Beatmungssystem

#### Das Perfusionssystem

Die künstliche Perfusion der Lunge erfolgte mithilfe einer Schlauch-Peristaltikpumpe (roller pump BP 742 der Firma Fresenius, Bad Homburg), die einen pulsierenden Perfusatfluss erzeugte. Das Perfusionssystem selbst bestand aus mit Konnektionsstücken verbundenen PVC- und Silikonschläuchen.

Ausgehend von zwei Vorratsbehältern mit einem maximalen Fassungsvermögen von je 500 ml durchfloss das Perfusionsmedium zunächst die Pumpe und anschließend einen optional in den Kreislauf integrierbaren Filter (Pall Cardioplegia 0,2 µm). Danach folgte ein Wärmeaustauscher und eine Blasenfalle zur Verhinderung von Luftembolien. Schließlich gelangte das Perfusat über den pulmonalarteriellen Zufluss in die Pulmonalarterie.

Nach der Lungenpassage erreichte das Medium das „venöse“ Schlauchsystem. Durch Höhenverstellung der venösen Strombahn konnte der venöse Druck reguliert werden. Der Kreislauf endete wieder in den Vorratsbehältern.

Die beiden Vorratsgefäße ermöglichten einen Wechsel des Perfusionsmediums ohne Perfusionsunterbrechung der Lunge.

Kurz vor der Einmündung in die Pulmonalarterie befand sich ein Injektionsstopfen für die Applikation von Pharmaka. Die verwendeten Substanzen wurden entweder hier oder über die Vorratsbehälter dem System zugeführt.

Im arteriellen Zufluss befand sich ein dünner (Innendurchmesser 1 mm), hartwandiger Druckmesskatheter, dessen distale Öffnung in der Pulmonalarterie zu liegen kam und der mit einem elektromechanischen Druckwandler verbunden war. Im venösen Abfluss befand sich ebenfalls ein Druckmesskatheter, dessen Öffnung im linken Ventrikel platziert war. Des Weiteren befand sich hier ein Drei-Wege-Hahn zur Abnahme der pH-Proben.

Das Perfusionsmedium wurde in den doppelwandigen Vorratsbehältern und im Wärmeaustauscher temperiert.

Während des Versuchs befand sich die Lunge in einem abgedeckten, erwärmten Trog, um Wärme- und Feuchtigkeitsverluste an der Lungenoberfläche zu minimieren.

Als Perfusionsmedium wurde Krebs-Henseleit-Puffer (Serag-Wiessner, Naila) in folgender Zusammensetzung verwendet:

125,0	mM NaCl
4,0	mM KCl
1,1	mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,4	mM CaCl <sub>2</sub>
1,3	mM MgCl <sub>2</sub>
15,3	mM Glucose

Zur Einstellung eines pH-Wertes von 7,37-7,40 wurde Natriumhydrogenkarbonat (8,4% pfrimmer, Baxter GmbH Deutschland, Unterschleißheim) kurz vor Versuchsbeginn zugegeben.

Die pH-Kontrolle erfolgte mit einem Blutgasanalysegerät (ABL 500, Radiometer, Copenhagen, Dänemark).

### **Vorbereitung des Perfusionssystems**

Vor jedem Versuch wurde das System bei 60° C mit Detergenz und anschließend mit destilliertem Wasser maschinell gereinigt.

Nachdem das System aufgebaut war, folgte eine erneute Spülung mit 2 l Aqua dest. (Baxter S.A., Lessines, Belgien), 2 l physiologischer Kochsalzlösung (Baxter S.A., Lessines, Belgien) und einem Liter Perfusionsmedium. Anschließend wurde das System mit Perfusionsmedium gefüllt, auf 4°C gekühlt, und vollständig von Luftblasen befreit.

Direkt vor Versuchsbeginn fand eine Kalibrierung der Messverstärker statt. Die Druckaufnehmer wurden in regelmäßigen Abständen geeicht.

### **Das Beatmungssystem**

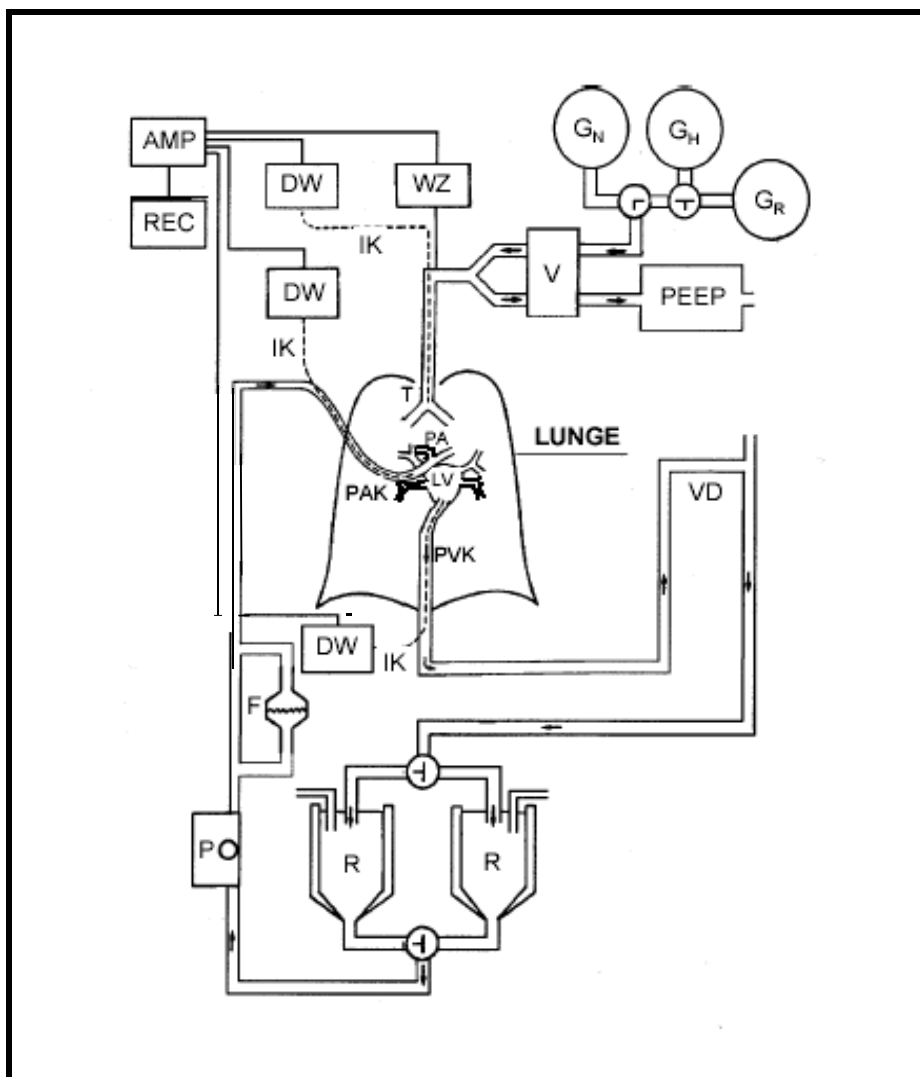
Für die Beatmung der Kaninchenlunge wurde die Beatmungspumpe „Cat/Rabbit Ventilator 6025“ (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) verwendet. Das

Atemzugvolumen betrug 30 ml, die Atemfrequenz 30/min. Außerdem wurde ein PEEP (positiv endexpiratorische Druck) von 1 cm Wassersäule (= 0,1 kPa) eingestellt.

Es kamen folgende Gasgemische zum Einsatz:

- Raumluft
- Normoxisches Atemgas : 21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, 73,3% N<sub>2</sub>
- Hypoxisches Atemgas : 3,0% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, 91,7% N<sub>2</sub>

Die Gaspartialdrücke wurden mit einem Blutgasanalysator (ABL 500, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen.



**Abb. 2:**

Schematische Darstellung des Aufbaus des Perfusions- und Beatmungssystems (nach 105).

- AMP* Messverstärker
- DW* elektromechanischer Druckwandler
- F* Filter
- GN* normoxisches Gasgemisch
- GH* hypoxisches Gasgemisch
- GR* Raumluft
- IK* Innenkatheter
- LV* linker Ventrikel
- P* Rollerpumpe
- PA* Pulmonalarterie
- PAK* Pulmonalkatheter
- PEEP* Vorrichtung zur Einstellung eines positiv endexpiratorischen Drucks
- REC* Schreiber und Personalcomputer zur Registrierung der gemessenen Werte
- T* Trachea
- V* Ventilator
- VD* Vorrichtung zur Einstellung des linksvenösen Druckniveaus
- WZ* Wägezelle



## **2.2 Lungenpräparation und Integration der Lunge in das Meßsystem**

### **Präparation der Lunge**

Für die Versuchsreihe wurden 4-5 Monate alte Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,5-3,5 kg verwendet.

Durch Punktion einer Ohrtrandvene wurden die Tiere initial mit einem Rompun-Ketavet-Gemisch (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Ketavet 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen) im Verhältnis 2:1 analgosediert. Nach Applikation von 0,5-0,7 ml dieser Lösung erfolgte die Injektion von 1000 IE Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm) je kg Körpergewicht.

Anschließend wurden die relaxierten Tiere bei erhaltener Spontanatmung in Rückenlage fixiert. Die ventrale Halsregion wurde durch Setzen einer Hautquaddel mit 5-8 ml Xylocain 2% (AstraZeneca GmbH, Wedel) in Höhe des Kehlkopfes zusätzlich anästhesiert. Daraufhin wurde die Trachea schichtweise unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus freigelegt. Die Trachea wurde durch Querinzision eröffnet. Das Einbinden einer PVC-Kanüle ermöglichte die maschinelle Beatmung mit Raumluft bei einem Hubvolumen von 30 ml und einer Frequenz von 30/min.

Bei gesicherter Beatmung wurde die Narkose durch weitere Applikation von 1-4 ml des Rompun-Ketavet-Gemisches vertieft. Dies geschah unter ständiger Herzfrequenzkontrolle mittels Palpation.

Brust und Bauch des Tiers wurden großzügig von Fell befreit. Unterhalb des Processus xiphoideus erfolgte die Inzision der Bauchdecke. Der Processus xiphoideus wurde mit einer Klemme gefasst und der Bauchschnitt parallel den Rippenbögen erweitert. Das Diaphragma konnte nun stumpf vom Processus xiphoideus getrennt werden. Dies ermöglichte die Eröffnung der Pleurahöhlen ohne Beschädigung der Lungen. Entlang der Rippen wurde das Diaphragma abpräpariert und nach kaudal fixiert. Es folgte die mediane Sternotomie und das Aufspreizen des Brustkorbes mithilfe zweier Klemmen. Danach wurde der Thymus stumpf abgetragen und das Perikard eröffnet. Das Herz wurde durch das Ankleben der Herzspitze fixiert und Aorta und Truncus pulmonalis mit einem Faden angeschlungen.

Nach Eröffnung des rechten Herzens wurde der Pulmonalkatheter in den Truncus pulmonalis vorgeschoben und durch die vorgelegte Fadenschlinge luftdicht

eingebunden. Ab nun wurde die Lunge künstlich mit 20 ml/min perfundiert. Unmittelbar nach Einbringen des Katheters wurde die Herzspitze abgeschnitten, um einen guten Abfluss des Perfusats zu ermöglichen und eine Schädigung der Lunge durch Stauung zu vermeiden. Gleichzeitig wurde die Beatmung auf das Normoxie-Gasgemisch umgeschaltet, dessen 5,3-prozentiger CO<sub>2</sub> Gehalt die pH-Stabilität des Perfusatmediums gewährleistete. Danach wurde die Aorta mit dem vorgelegten Faden legiert. Die Lunge war somit ventilations- und perfusionsseitig vollständig vom Körper getrennt.

### **Integration der Lunge in das Perfusionssystem**

Die Herz-Lungen-Einheit wurde entlang der Wirbelsäule mobilisiert und konnte nach Durchtrennung der Aorta descendens und der V. cava entnommen werden.

Für die weitere Präparation wurde es an einer Halterung fixiert und zunächst von Gewebsresten befreit. Die Beatmung wurde ab nun mit einem positiv endexpiratorischen Druck (PEEP) von 1 cm Wassersäule durchgeführt. Durch den Sinus transversus pericardii wurde ein Faden gelegt und damit die Aorta erneut abgebunden. Das linke Herzohr wurde legiert. Um ein dichtes Einbinden des venösen Abflusses zu ermöglichen, wurden die laterale Wand des rechten Ventrikels sowie die Papillarmuskeln des linken Ventrikels entfernt. Mit einer Tabaksbeutelnaht wurde zunächst ein Konnektionsstück in den linken Ventrikel eingebunden. Nun wurde auch die Hinterwand des rechten Ventrikels durchtrennt. So konnte die Lage der Pulmonalarterie und des eingebundenen Katheters besser dargestellt und gegebenenfalls korrigiert werden. Jetzt wurde die Lunge an der Wägezelle befestigt. Der abführende Teil des Schlauchsystems wurde mit dem Konnektionsstück verbunden und die Lunge in einem erwärmbaren Trog platziert.

### **Vorbereitung der isolierten Lunge**

Nachdem die Lunge nun vollständig in das künstliche Kreislaufsystem integriert war, wurde die Temperatur langsam auf 38,5 °C erhöht und dabei der Perfusatfluss auf 150 ml/min gesteigert.

Anschließend wurde die Lunge mit einem Liter steriler Perfusionslösung bei offenem Perfusionskreislauf gespült. Danach wurde das System so eingestellt, dass ein geschlossener, rezirkulierender Kreislauf mit 250 ml Füllungsvolumen entstand. Der Filter wurde aus dem Kreislauf ausgenommen.

Der höchste Punkt des venösen Abflusses wurde so gewählt, dass ein linksventrikulärer bzw. pulmonalvenöser Druck von 1,5-2,0 mmHg im Bezug zum Lungenhilus erreicht wurde.

Es folgte eine pH-Wertkontrolle und ggf. eine Feinjustierung des Wertes durch Zugabe von Natriumbikarbonat oder neutraler Pufferlösung, bis der gewünschte Wert von 7,37-7,40 erreicht war.

Vor Versuchsbeginn befanden sich die Lungen in einer 20-minütigen steady-state-Phase bei normoxischer Beatmung. Nur Lungen, deren Gewicht und deren gemessener Druckwerte über diesen Zeitraum konstant blieben, wurden in der Auswertung verwendet.

## **2.3 Datengewinnung**

### **Druck- und Gewichtsregistrierung**

Der pulmonalarterielle und pulmonalvenöse Druck wurden mit Hilfe hartwandiger, im Inneren des Schlauchsystems liegender Katheter gemessen, die mit einem elektromechanischen Druckwandler (Combitrans, Braun-Melsungen) verbunden waren. Der Beatmungsdruck wurde ebenfalls an einen Druckwandler übertragen. Von dort wurden die Signale über einen Messverstärker (Plugsy DBA 660, Hugo Sachs, March-Hugstetten) auf einen Schreiber (Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics, Freiburg) weitergeleitet und aufgezeichnet.

Während des Versuches war die Lunge an einer Wägezelle aufgehängt, so dass mit Hilfe des Messverstärkers und des Schreibers auch die Veränderung des Lungengewichts registriert werden konnten.

Eine speziell entwickelte Software erlaubte eine zeitgleiche Aufzeichnung aller gemessener Werte auf einem Personalcomputer (PC).

## **Auswertung**

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme eines Personalcomputers und der Programme Excel 97 (Microsoft) und PlotIt 3.2 (scientific programming enterprises, SPE, USA).

Die vom Rikadenki-Schreiber aufgezeichneten Druck- und Gewichtskurven wurden ausgemessen und in Excel-Tabellen eingetragen. Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler (SEM, standard error of the mean) wurden mit Hilfe von Excel 97 errechnet und mit Hilfe von PlotIt 3.2 grafisch dargestellt.

## **Statistik**

Verwendet wurde hierbei die Statistikprogramme GraphPad InStat 2.04 und SPSS 12.0G für Windows.

Bei den angegebenen Werten handelt es sich (soweit nicht anders bezeichnet) um den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Beim Vergleich zweier Gruppen kam der Student t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung, beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde zuerst eine 3-faktorielle Varianzanalyse (Substanz/Kontrolle, Hypoxie/Normoxie und Zeit) für wiederholte Messungen im Verlauf eines Faktors (Zeit) durchgeführt. Diese ergab für alle Substanzen einen Einfluss der Substanz und der durchgeführten Art der Ventilation (Hypoxie/Normoxie) auf den zeitlichen Verlauf der HPV. Für die weitere statistische Auswertung wurde anschließend eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Student-Newman-Keuls-Test angewendet.

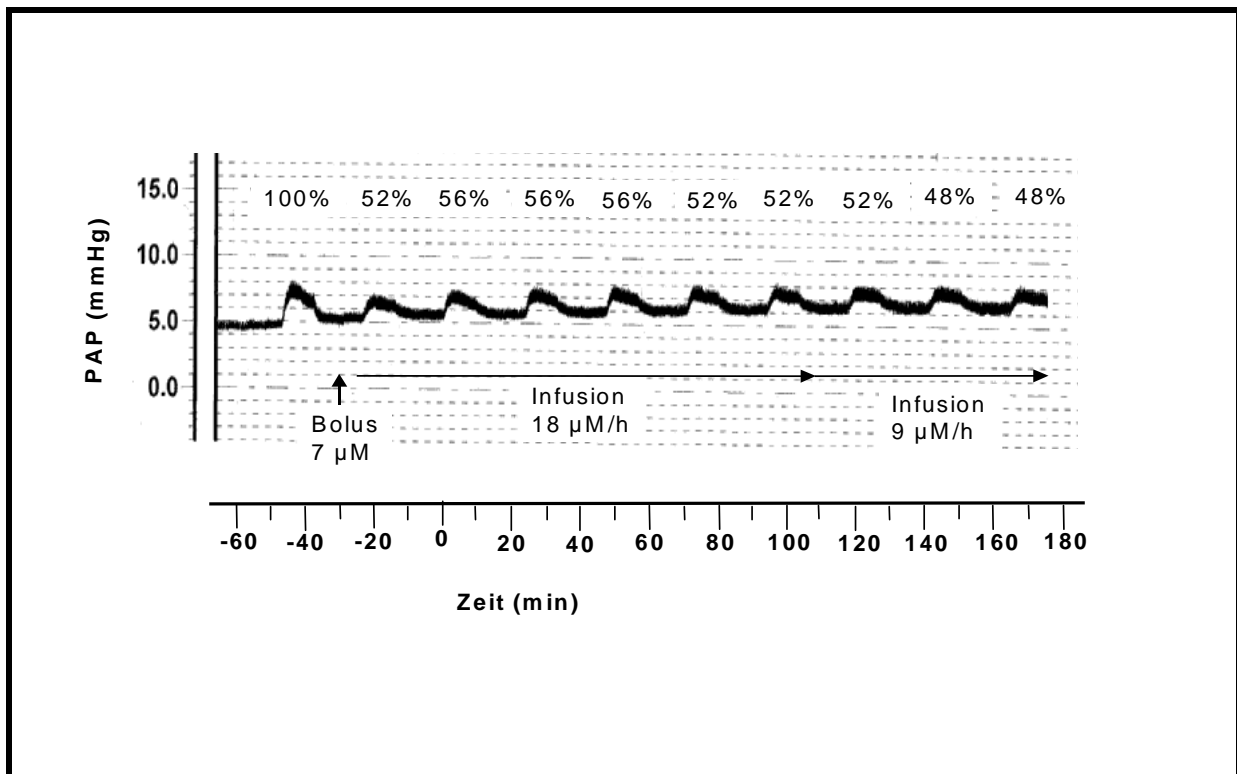
Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

### **2.4 Der Versuchsmodus**

Es wurden nur Substanzen verwendet, bei denen eine selektive Hemmung der ersten Phase der HPV aus anderen Arbeiten bereits bekannt war (Ausnahme 3-NPA, s.o.).

Zuerst wurde eine Vorversuchsreihe bei wiederholter Kurzzeithypoxie durchgeführt. Nach der (normoxischen) steady-state-Phase folgten 10-minütige Hypoxie-Phasen, die von 15-minütigen Normoxie-Phasen unterbrochen wurden.

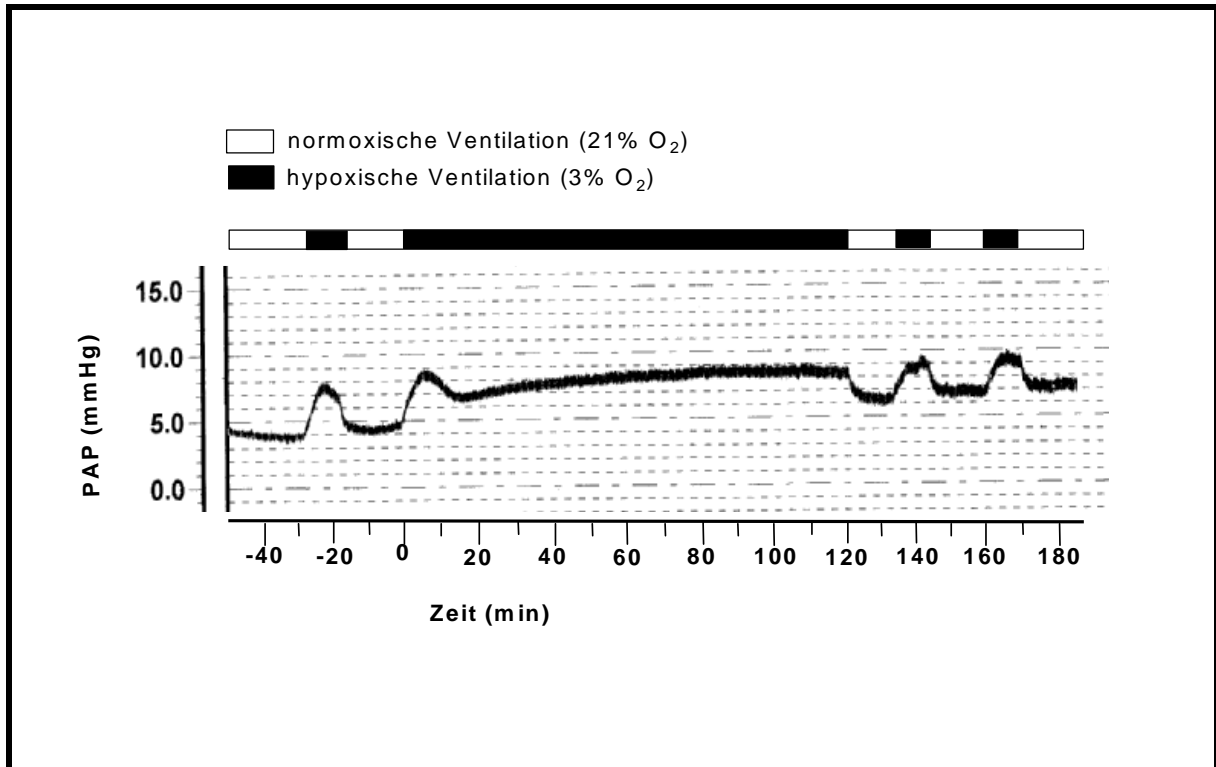
Der Druckanstieg in der ersten Hypoxie-Phase wurde gleich 100% gesetzt. Nun wurde für jede Substanz ein Applikationsmodus entwickelt, bei dem eine Serie von acht repetitiven Hypoxie-Phasen auf ca. 50% der Ausgangshypoxie gehemmt wurde. Der ermittelte Versuchsmodus wurde mit n=5 Vorversuchen verifiziert und der Beginn der ersten dieser acht konsekutiven Hypoxien wurde t=0 gesetzt (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Dargestellt ist eine Original-Registrierung des Pulmonalarteriellen Drucks (*PAP*) am Beispiel eines Versuches mit Verapamil. Zusätzlich ist jeweils die Stärke des gemessenen Druckanstieges in Prozent, sowie der Applikationsmodus für Verapamil eingezeichnet

Um den Einfluss der Substanzen auf die zweite Phase der HPV zu untersuchen, begann in den Versuchen mit anhaltender Hypoxie bei t=0 eine 120-minütige, lange Hypoxie-Phase. Anschließend folgte eine 15-minütige Normoxie-Phase und danach wieder zwei kurze Hypoxie-Phasen von je 10 Minuten, unterbrochen von 15 Minuten Normoxie-Beatmung. Zum Schluss wurde die Lunge noch einmal 15 Minuten

normoxisch beatmet. Dabei wurde der in der Vorversuchen ermittelte Applikationsmodus für die Substanz beibehalten (s. Abb. 4).



**Abb. 4:** Original-Registrierung des pulmonalarteriellen Drucks (*PAP*) eines Versuches mit 120-minütiger Hypoxie

War eine Abweichungen von diesem Versuchsprotokoll notwendig, ist dies bei der entsprechenden Substanz beschrieben.

Zur Untersuchung des Einflusses der Substanzen auf den Basis-Druck erfolgte auch eine Substanzapplikation im ermittelten Modus bei durchgehend normoxischer Beatmung.

Als Kontrolle wurden sowohl die hypoxischen als auch die normoxischen Versuchsreihen nur unter Applikation der entsprechenden Lösungsmittel bei ansonsten identischem Applikationsmodus durchgeführt.

War aus vorangehenden Arbeiten bekannt, dass die Hemmwirkung der entsprechenden Substanz durch die pulmonale NO-Synthese der Lunge beeinflusst

wird, wurde die NO-Synthese durch Zugabe von 25 mg ( $c=400\mu\text{M}$ ) LNMMA (N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin, Calbiochem, Bad Soden) zu Beginn der steady-state-Phase unterbunden. In diesem Fall erfolgten auch die Kontrollversuche unter Zugabe von LNMMA.

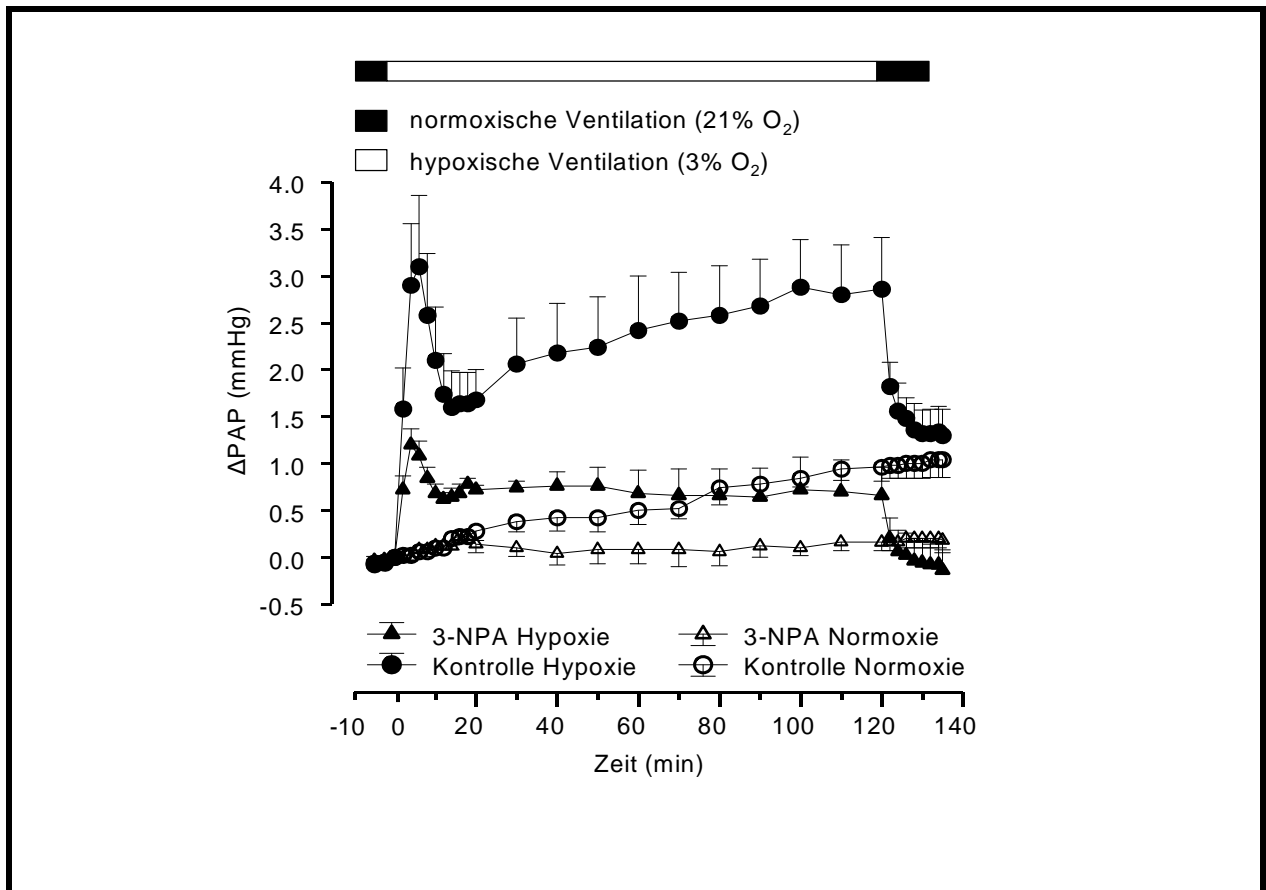
## 2.5 Darstellung und Auswertung

Um einen Vergleich der Versuche zu ermöglichen, wurde in jedem Versuch der PAP zu Beginn der 120-minütigen Hypoxie gleich 0 mmHg gesetzt und sämtliche nachfolgenden Druckwerte des Versuchs darauf bezogen. Aus den Einzelversuchen wurde dann jeweils der Mittelwert und der Standardfehler berechnet und grafisch dargestellt.

Die zusammen gehörenden Versuchsreihen

1. Hypoxie mit Zugabe der Substanz
2. Normoxie mit Zugabe der Substanz
3. Hypoxie Kontrolle nur mit Zugabe des Lösungsmittels
4. Normoxie Kontrolle nur mit Zugabe des Lösungsmittels

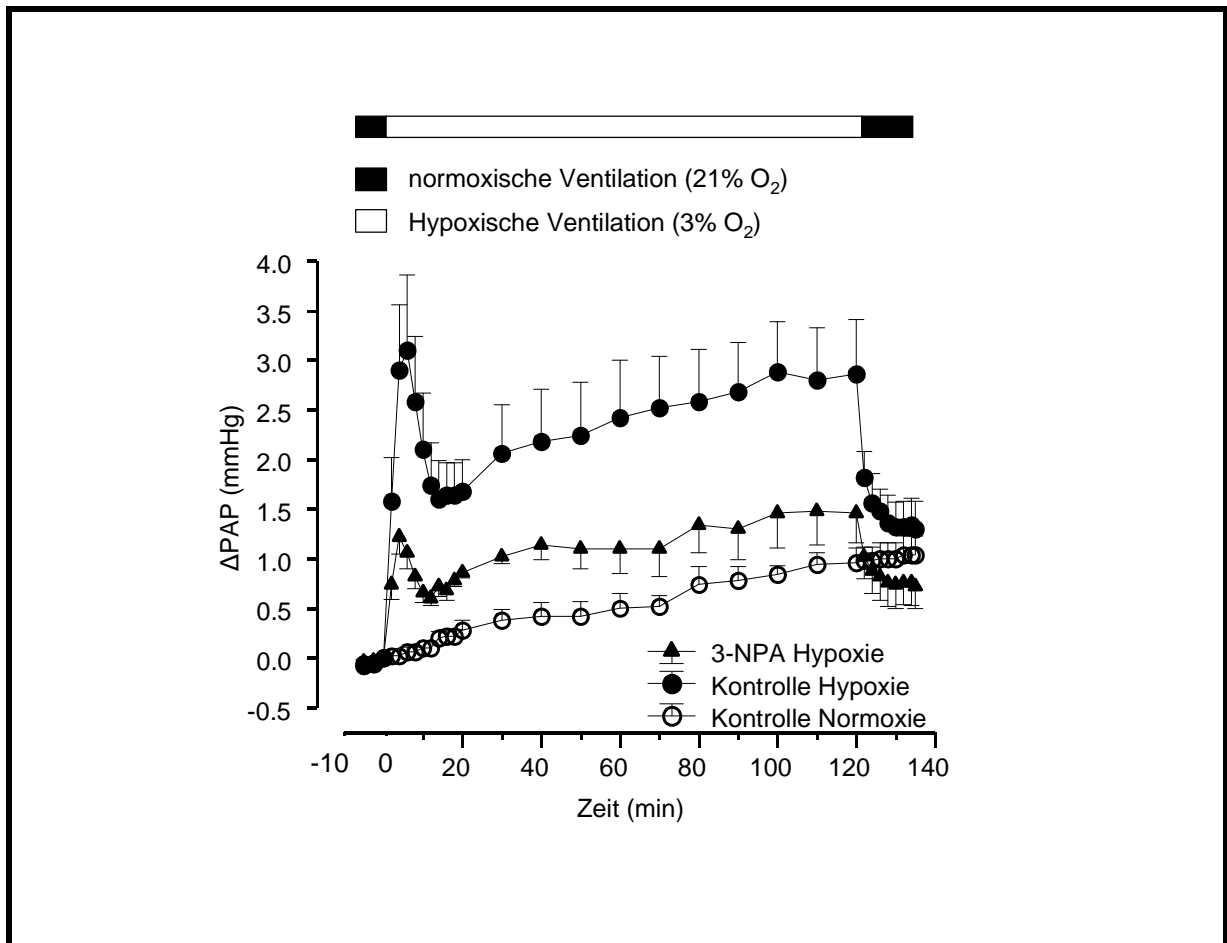
wurden jeweils in einer Grafik zusammen gefasst (s. Abb. 5a ).



**Abb. 5a:** Darstellung der Versuche am Beispiel der Versuchsreihe mit 3-NPA .

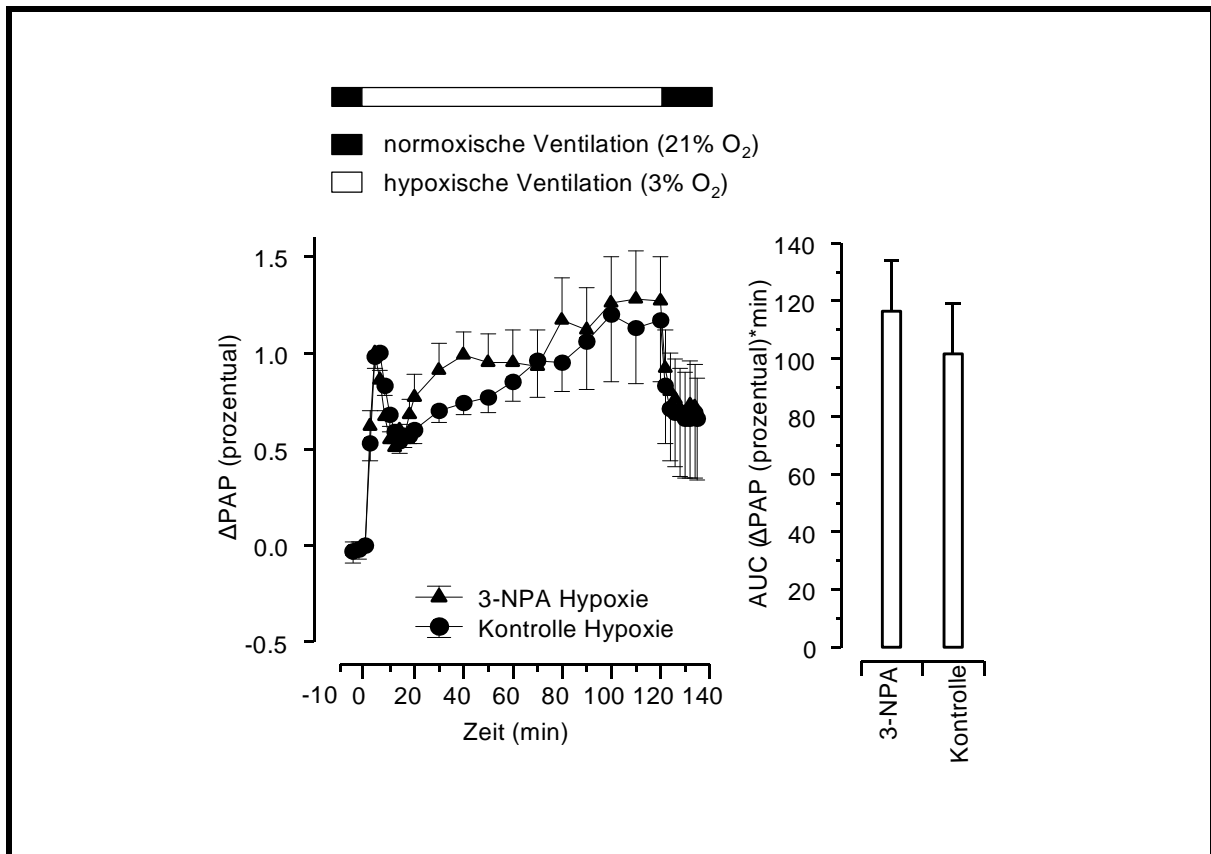
Da bei dem Vergleich der protrahierten Hypoxie der Einfluss der Substanzen auf den normoxischen Grundtonus der Gefäßmuskulatur berücksichtigt werden musste, wurde die Langzeit-Hypoxie-Kurve um die Differenz der Versuche unter Normoxie (Substanz vs. Kontrolle) korrigiert (s. Abb. 5b).





**Abb. 5b:** Darstellung der Versuche am Beispiel der Versuchsreihe mit 3-NPA.

Um die Kurvenverläufe der Hypoxie-Kontrolle mit dem der Hypoxie bei Substanzgabe besser veranschaulichen zu können, wurde zusätzlich eine prozentuale Darstellungsweise gewählt: Der maximale Druckanstieg wurde in jedem Versuch gleich 1 (100%) gesetzt und alle weiteren Druckwerte darauf bezogen. Zum Vergleich wurde daraus dann die jeweilige Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) berechnet. Anschließend wurden wieder Mittelwert und Standardfehler gebildet (s. Abb. 5c).



**Abb. 5c:** Darstellung der Versuche am Beispiel der Versuchsreihe mit 3-NPA.

## 2.6 Verwendete Substanzen und Applikationsmodi

Die nachfolgende Übersicht zeigt die in den Untersuchungen verwendeten Substanzen und ihre Dosierungen. Das gesamte Volumen des Perfusionsmediums betrug jeweils 250 ml.

In Tabelle 1 sind die mit den angegebenen Applikationsmodi erzielten maximalen Stärken der Vasokonstriktion im Verlauf der repetitiven Kurzzeit-Hypoxien, bezogen auf die Vasokonstriktion der ersten Hypoxie, dargestellt. Die grau hinterlegten Bereiche markieren den Zeitraum, in dem später die protrahierte Hypoxie durchgeführt wurde.

### 3-Nitropropionsäure (3-NPA)

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

MW: 119,1

Lösungsmittel: Perfusionsmedium

Applikation: 30 min nach Beginn der steady-state-Phase Bolus 0,6 mM  
105 min nach Beginn der steady-state-Phase Austausch von 150 ml  
Perfusionsmedium durch frisches Perfusat, welches bis dahin  
entsprechend der Lungenventilation begast worden war

t=0 : 95 min nach Beginn der steady-state-Phase

### Antimycin A

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

MW: 530

Lösungsmittel: Ethanol 99,9%

Applikation: repetitive Bolusgaben  
40 min nach Beginn der steady-state-Phase 2 nM,  
65 und 90 min nach Beginn der steady-state-Phase je 0,5 nM  
115,140,165,190, 215 und 240 nach Beginn der steady-state-Phase  
je 0,3 nM

t=0 : 70 min nach Beginn der steady-state-Phase

Besonderheit: Um eine Substanzapplikation 5 Minuten vor Beginn der kurzen  
Hypoxien auch für die zwei kurzen Hypoxien am Ende der  
Langzeithypoxieversuche beizubehalten und gleichzeitig einen  
Abstand von 25 Minuten zwischen den Bolusgaben einhalten zu

können, wurde die Normoxie-Zeit zwischen Ende der 120-minütigen Hypoxie und der nachfolgenden 10-minütigen Hypoxie ausnahmsweise von 15 auf 30 Minuten verlängert.

Bei der kumulativen Applikation von Antimycin A war bei fast allen Lungen trotz Gewichtskonstanz in der steady-state-Phase eine stetige Gewichtszunahme bis hin zu einem fulminanten Ödem zu beobachten. Da sich dieser Effekt unter Hypoxie stärker als unter Normoxie zeigte, wurde hier auf eine Verlängerung der langen Hypoxie-Zeit (wie im Falle der Rotenon-Experimente (s. dort)) verzichtet und statt dessen die Normoxie-Zeit vor Beginn der nachfolgenden kurzen Hypoxie verlängert.

#### Natriumcyanid 97% (Cyanid)

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

MW: 49,1

Lösungsmittel: isotone Kochsalzlösung

Applikation: ab 40 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von 50  $\mu\text{M}/\text{h}$   
ab 55 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von 30  $\mu\text{M}/\text{h}$

t=0 : 70 min nach Beginn der steady-state-Phase

#### 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodid (MPP<sup>+</sup>)

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

MW: 297,1

Lösungsmittel: Perfusionsmedium

Applikation: 40 min nach Beginn der steady-state-Phase Bolus 1,3  $\mu\text{M}$   
115–145 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von 1  $\mu\text{M}/\text{h}$

t=0 : 120 min nach Beginn der steady-state-Phase

4-(2-Aminoethyl)-benzosulfonyl-fluorid-hydrochloride (AEBSF)

Pefabloc© SC (Merck, Darmstadt)

+ LNMMA

MW: 239,5

Lösungsmittel: Perfusionsmedium

Applikation: 40 min nach Beginn der steady-state-Phase Bolus 500  $\mu\text{M}$   
40-255 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von  
100  $\mu\text{M}/\text{h}$   
ab 255 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von  
50  $\mu\text{M}/\text{h}$

t=0 : 120 min nach Beginn der steady-state-Phase

Rotenon

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

+ LNMMA

MW: 394,4

Lösungsmittel: Ethanol 99,9%

Applikation: 40, 65, 90, 115, 140, 165, 190, 215 und 240 min nach Beginn der steady-state-Phase je 40 nM

t=0 : 70 min nach Beginn der steady-state-Phase

Besonderheit: Um eine Substanzapplikation 5 Minuten vor Beginn der kurzen Hypoxien auch für die zwei kurzen Hypoxien am Ende der Langzeithypoxieversuche beizubehalten, gleichzeitig einen Abstand von 25 Minuten zwischen den Bolusgaben einhalten zu können, und außerdem den Abstand zwischen langer Hypoxie und darauffolgender kurzer Hypoxie konstant bei 15 Minuten zu halten, wurde die lange Hypoxie von 120 auf 135 Minuten verlängert.

### Verapamil

(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)

MW: 491,1

Lösungsmittel: Ethanol 99,9%

Applikation: 40 min nach Beginn der steady-state-Phase Bolus 7  $\mu\text{M}$   
45-180 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von  
18  $\mu\text{M}/\text{h}$   
ab 180 min nach Beginn der steady-state-Phase Infusion von  
9  $\mu\text{M}/\text{h}$

t=0 : 70 min nach Beginn der steady-state-Phase

### Maximale Stärke der Vasokonstriktion während der einzelnen Hypoxie-Phasen

Substanz	1. Hox	2. Hox	3. Hox	4. Hox	5. Hox	6. Hox	7. Hox	8. Hox	9. Hox	10. Hox	11. Hox	12. Hox
MPP <sup>+</sup>	1,00±0,00	1,12±0,12	0,78±0,1	0,47±0,09	0,37±0,05	0,34±0,02	0,32±0,03	0,34±0,05	0,40±0,09	0,33±0,06	0,28±0,04	0,25±0,06
Rotenon	1,00±0,00	0,54±0,08	0,44±0,07	0,4±0,07	0,44±0,08	0,41±0,09	0,44±0,11	0,44±0,1	0,5±0,09	0,49±0,13	/	/
3-NPA	1,00±0,00	0,92±0,08	0,75±0,05	0,5±0,03	0,34±0,02	0,32±0,03	0,33±0,02	0,36±0,03	0,38±0,05	0,41±0,06	0,35±0,06	/
Antimycin	1,00±0,00	0,32±0,05	0,52±0,08	0,51±0,08	0,44±0,08	0,44±0,09	0,45±0,05	0,46±0,15	0,31±0,04	0,35±0,15	/	/
Cyanid	1,00±0,00	0,82±0,04	0,43±0,03	0,41±0,01	0,39±0,02	0,41±0,02	0,39±0,02	0,4±0,02	0,43±0,03	0,45±0,04	/	/
AEBSF	1,00±0,00	1,50±0,25	0,43±0,05	0,36±0,05	0,43±0,06	0,44±0,05	0,45±0,06	0,40±0,06	0,39±0,05	0,35±0,04	0,34±0,05	0,34±0,05
Verapamil	1,00±0,00	0,42±0,04	0,51±0,05	0,52±0,06	0,52±0,06	0,5±0,07	0,52±0,07	0,49±0,09	0,51±0,1	0,49±0,1	/	/

**Tabelle 1:** Stärke der maximalen Vasokonstriktion im Verlauf der einzelnen Hypoxie-Phasen (*Hox*), bezogen auf die maximale Vasokonstriktion während der erste Hypoxie-Phase (je Versuchsreihe n=5). Es handelt sich hierbei um jeweils 10-minütige Hypoxie-Phasen, unterbrochen durch 15 Minuten normoxische Beatmung. Die grau hinterlegten Bereiche markieren den Zeitraum, in dem später die Langzeit-Hypoxie durchgeführt wurde.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 AEBSF

Bei Beginn der Applikation von AEBSF, einem NADPH-Oxidase Inhibitor, zeigte sich ein starker, vorübergehender Druckanstieg von  $23,8 \pm 1,0$  mmHg, der allerdings vor Beginn der untersuchten, 120-minütigen Hypoxie wieder auf den Ausgangsdruck abfiel. Der normoxischer Vasotonus unterschied sich bei AEBSF nicht von dem der Kontrolle. Obwohl das Minimum der nach Beenden der Hypoxie erreichten „Basis-PAP“-Werte über denen der Normoxie-Kontrolle lag, ist der Verlust der posthypoxischen Vasorelaxation bei AEBSF statistisch nicht signifikant (s. Abb. 6a). Der Einfluss von AEBSF betrifft die akute Phase in stärkerem Ausmaß als die subakute (s. Abb. 6b+c), so dass im prozentualen Vergleich die AUC der Versuche mit AEBSF ( $156,5 \pm 18,4$ ) deutlich größer waren als die der Kontrolle ( $92,6 \pm 17,0$ ).

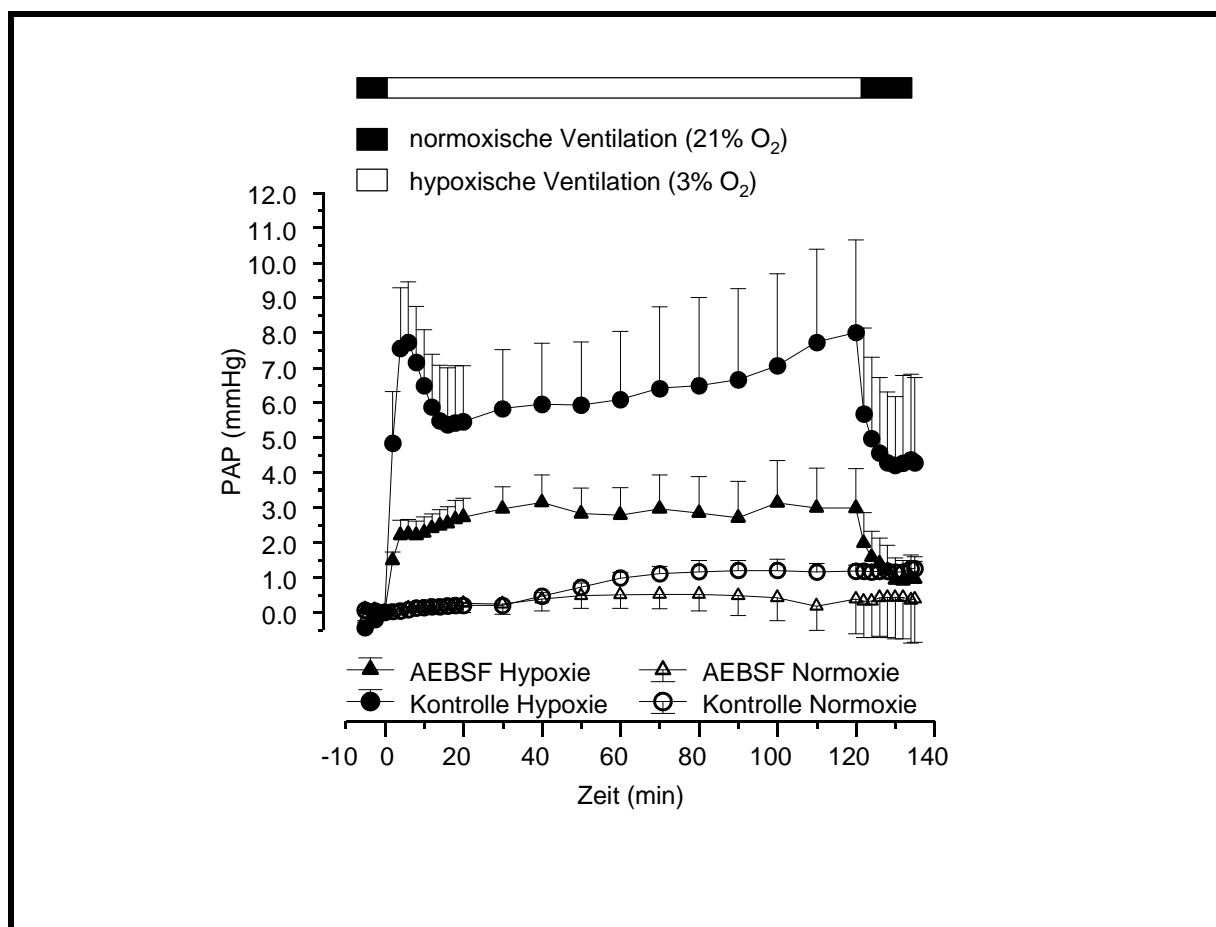
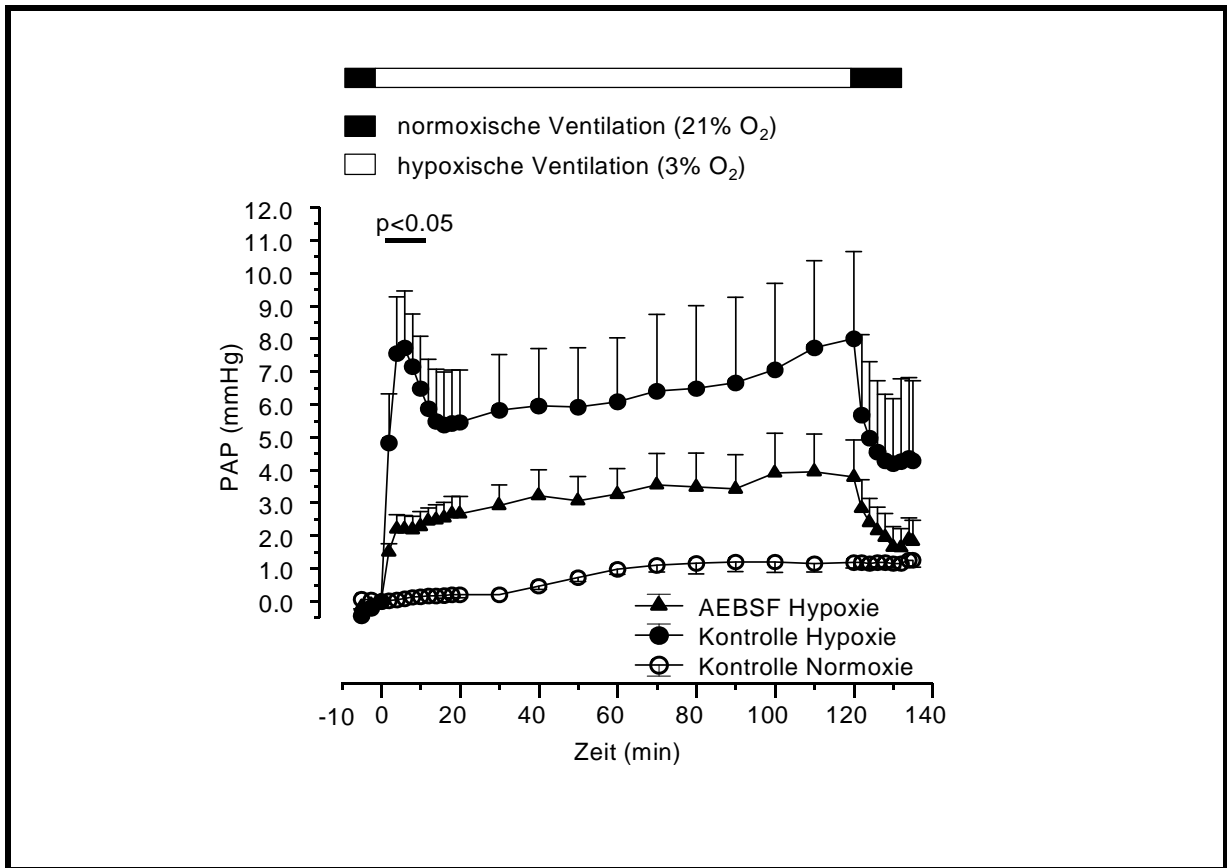
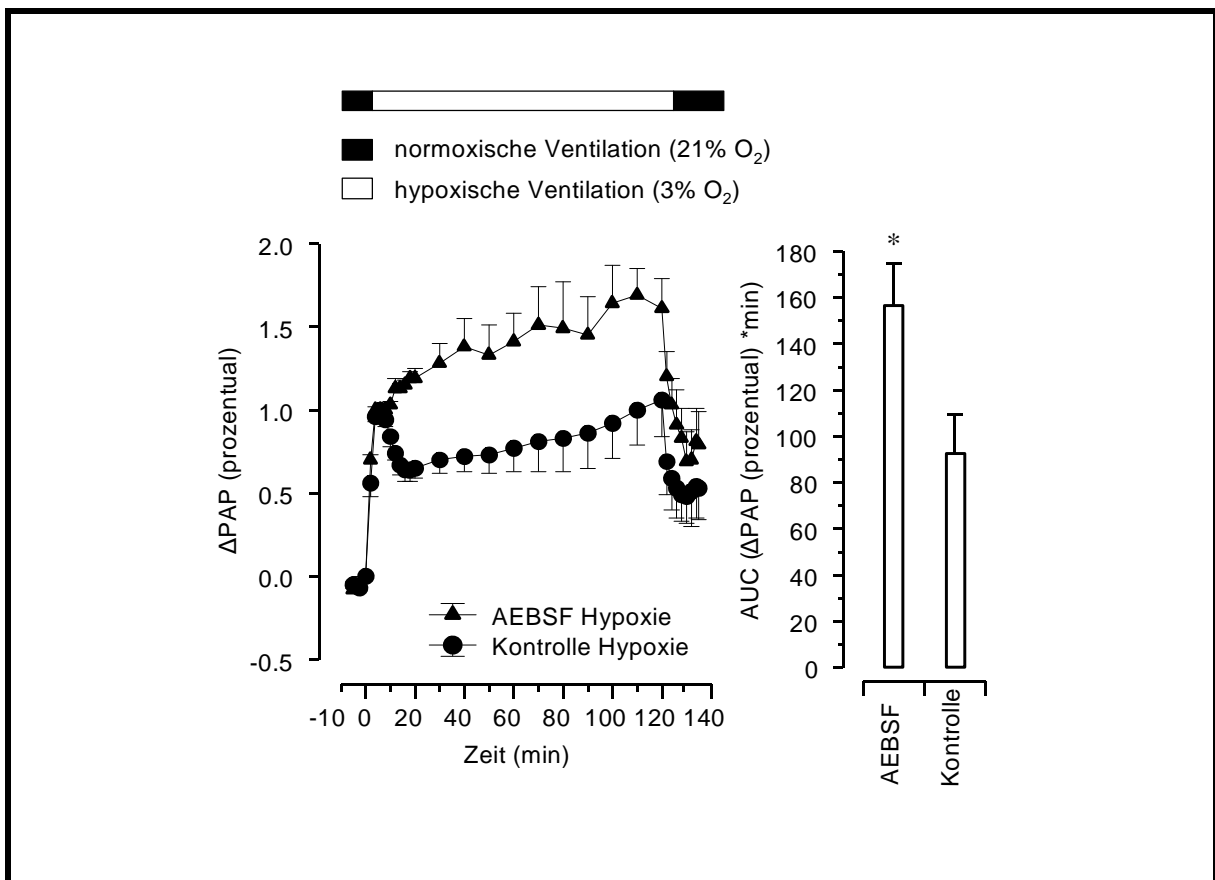


Abb. 6a: Vergleich der Kurvenverläufe von AEBSF und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils n=5.





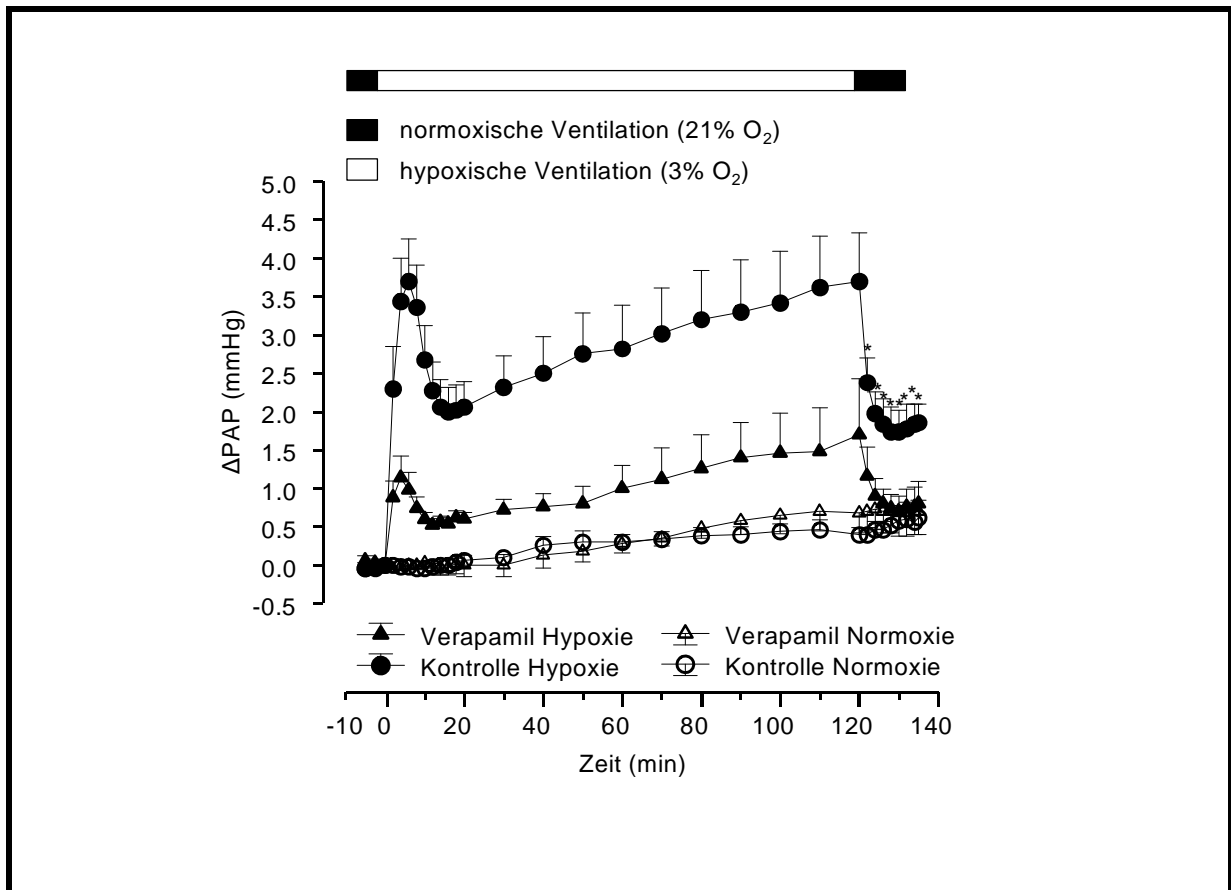
**Abb. 6b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



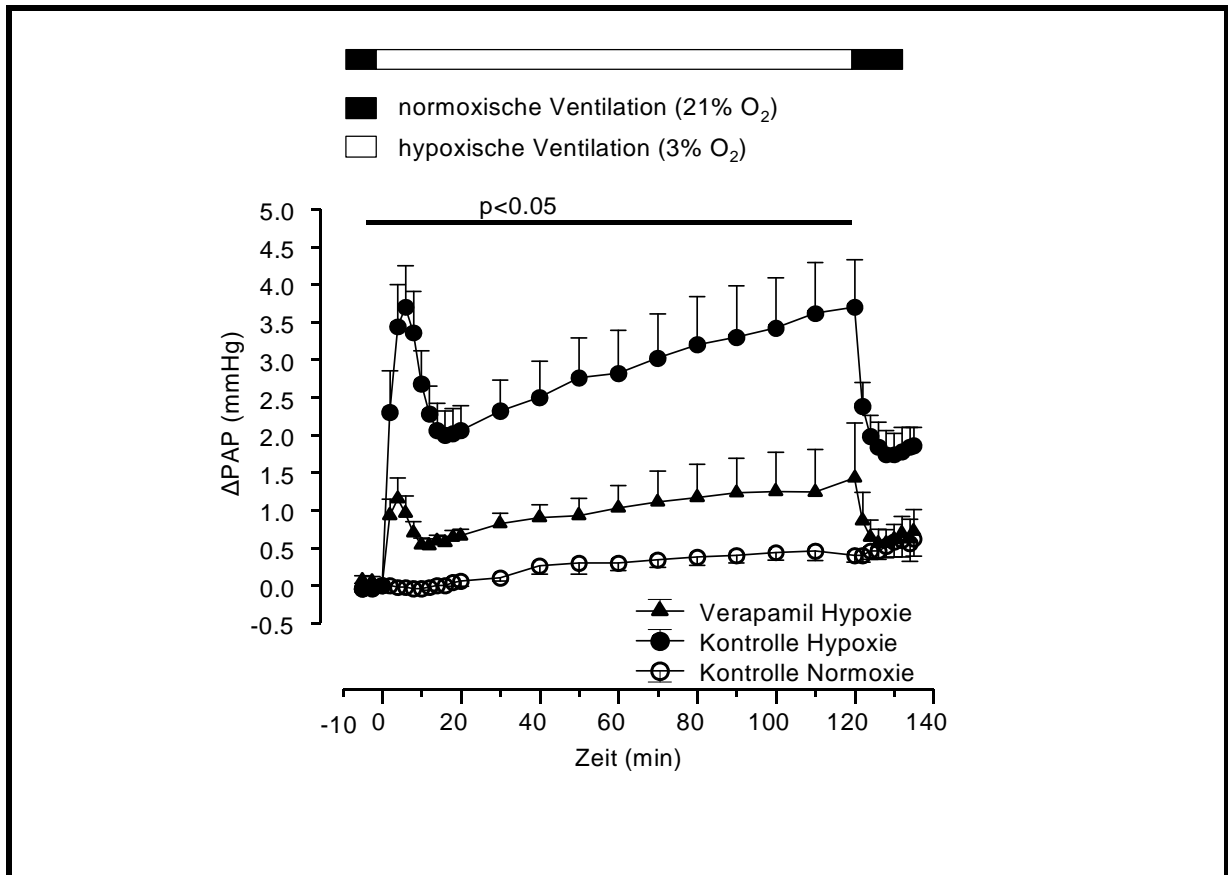
**Abb. 6c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5. Das Sternchen \* markiert einen statistisch signifikanten Unterschied beider Flächen (p < 0,05).

### 3.2 Verapamil

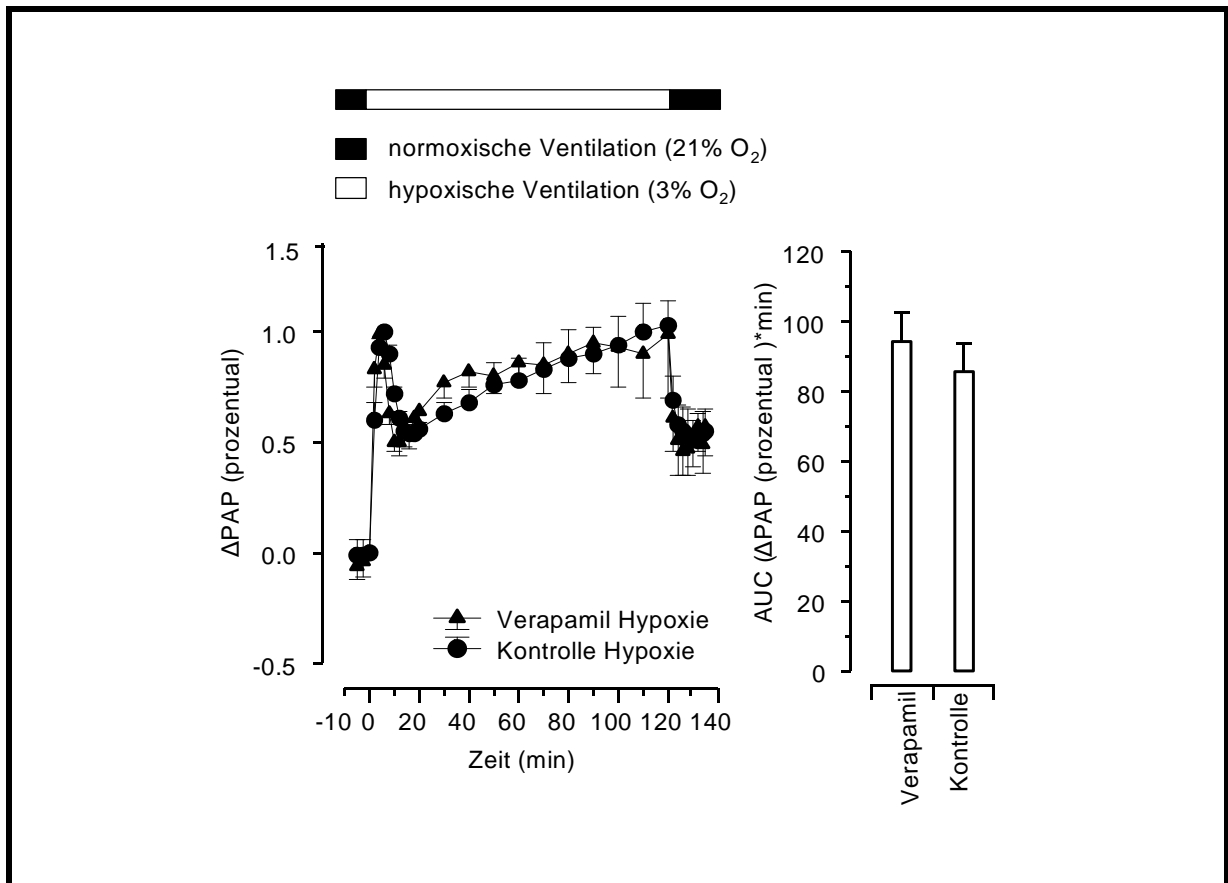
Verapamil wirkt als Kalzium-Antagonist. Unter Normoxie hatte Verapamil, sowohl direkt nach Applikation als auch über den gesamten Versuchsverlauf beobachtet, kaum einen Einfluss auf den gemessenen PAP (s. Abb. 7a). Auch unter Hypoxie verlief die Druckkurve der Verapamil-Versuche annähernd parallel zur Kontrolle (s. Abb. 7b), was zu einem fast deckungsgleichen Verlauf der Kurven in der prozentualen Darstellung führt (s. Abb. 7c). Die AUC der Verapamil- ( $94,3 \pm 8,4$ ) bzw. Kontrollversuche ( $85,6 \pm 8,0$ ) ist etwa gleich groß. Verapamil beeinflusst die akute und subakute Phase der HPV gleichermaßen.



**Abb. 7a:** Vergleich der Kurvenverläufe von Verapamil und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils  $n=5$ . Die Sternchen \* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Hypoxie- zur entsprechenden Normoxie-Kurve.



**Abb. 7b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



**Abb. 7c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5.

### 3.3 Rotenon

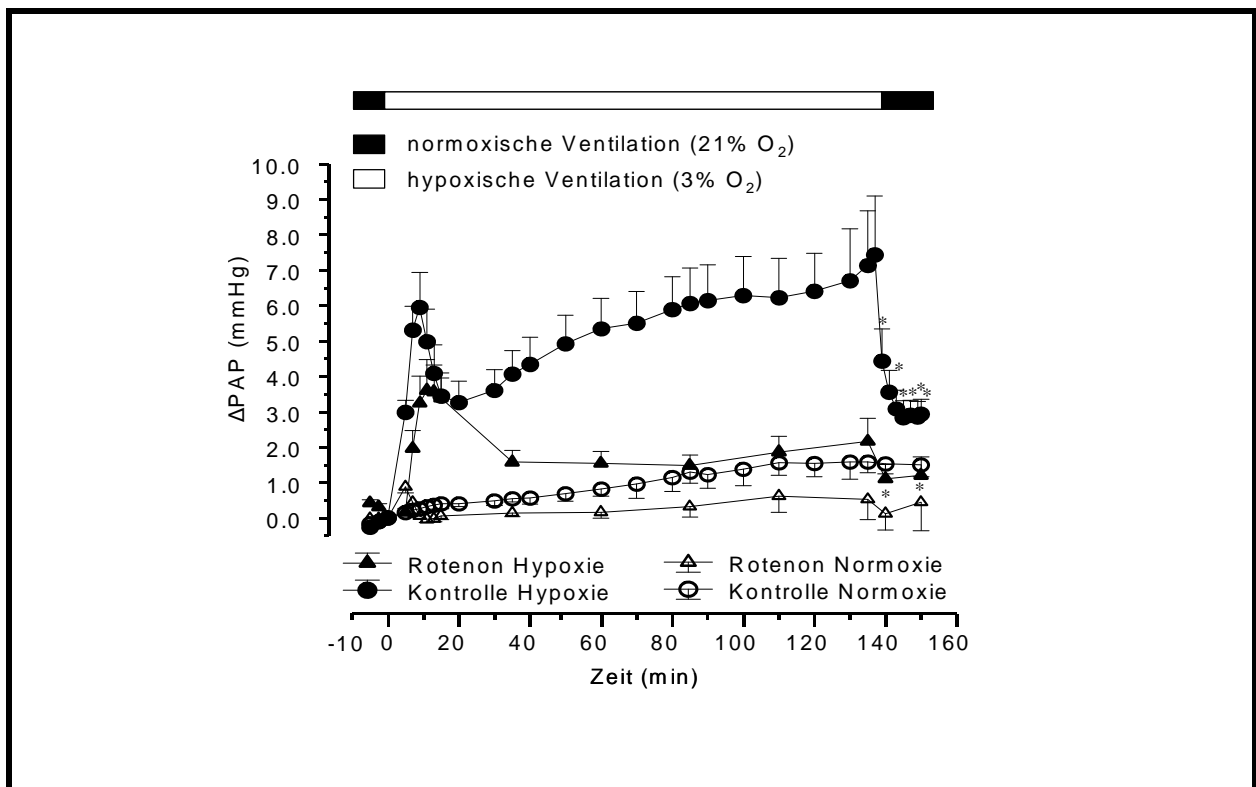
Bei Rotenon wurde aus o.g. Gründen eine lange Hypoxie-Phase von 135 min gewählt.

Die Applikation der einzelnen Rotenon-Boli führte sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einem deutlichen transienten Anstieg des PAP. Diese Druckspitzen sind zur besseren Übersicht in den Grafiken nicht dargestellt. Die gezeigten Werte wurden zu den Zeitpunkten gemessen, bei denen in den Vorversuchen der wiederholten Kurzzeit-Hypoxie unter Rotenon-Hemmung und Hypoxie der maximale Druckanstieg registriert wurde.

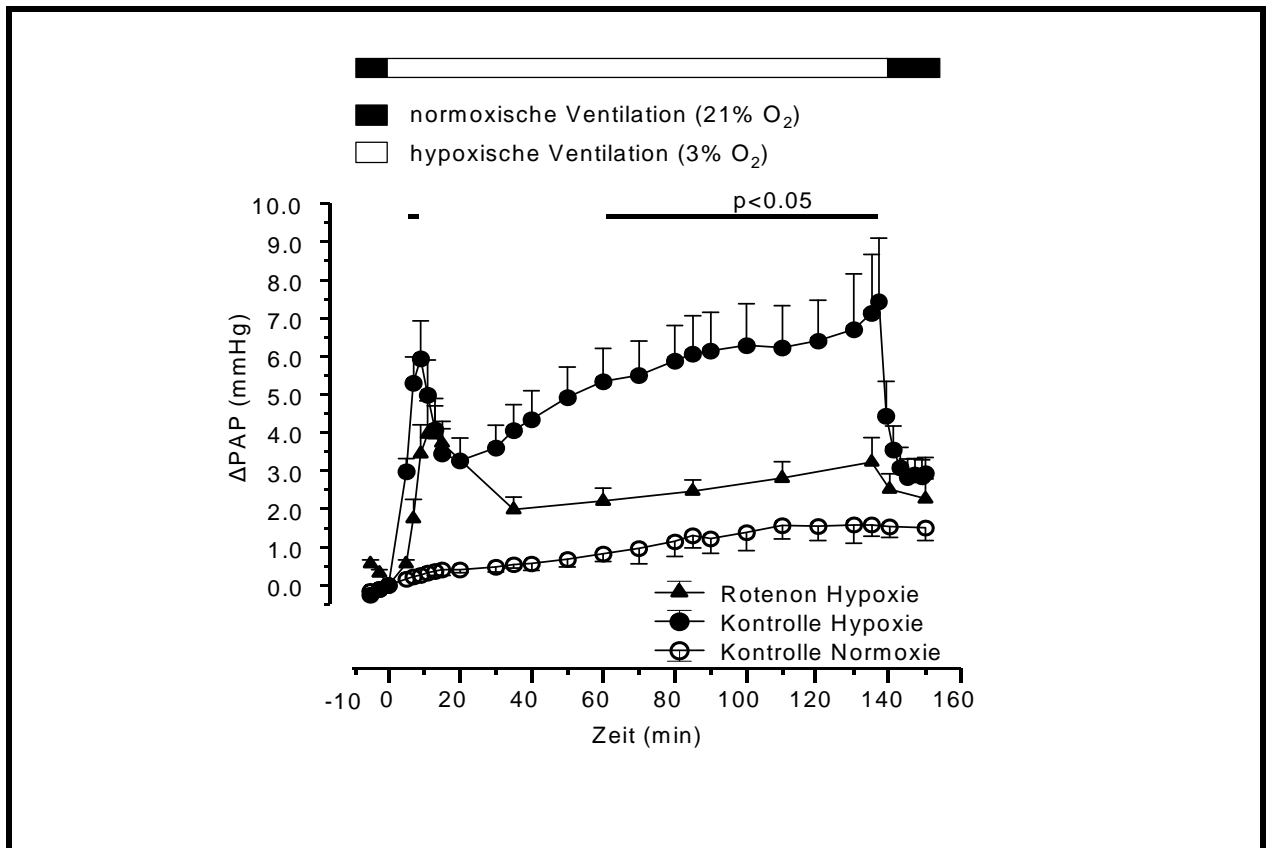
Unter Normoxie war bei Versuchen mit Rotenon über den Verlauf der Versuchsdauer einen leichten Druckabfall ( $-0,8 \pm 0,6$  mmHg) zu beobachten, während es in den Kontrollen zu einem leichten Anstieg ( $1,4 \pm 0,4$  mmHg) kam (s. Abb. 8a).

Der Einfluss auf die subakute Phase ist tendenziell größer (s. Abb. 8b). Bei der Betrachtung der AUC's ergibt sich für Rotenon ein Wert von  $90,8 \pm 10,1$  im Vergleich zu  $118,3 \pm 12,4$  für die entsprechende Kontrolle. Allerdings lässt sich dieser Unterschied statistisch nicht verifizieren (s. Abb. 8c).

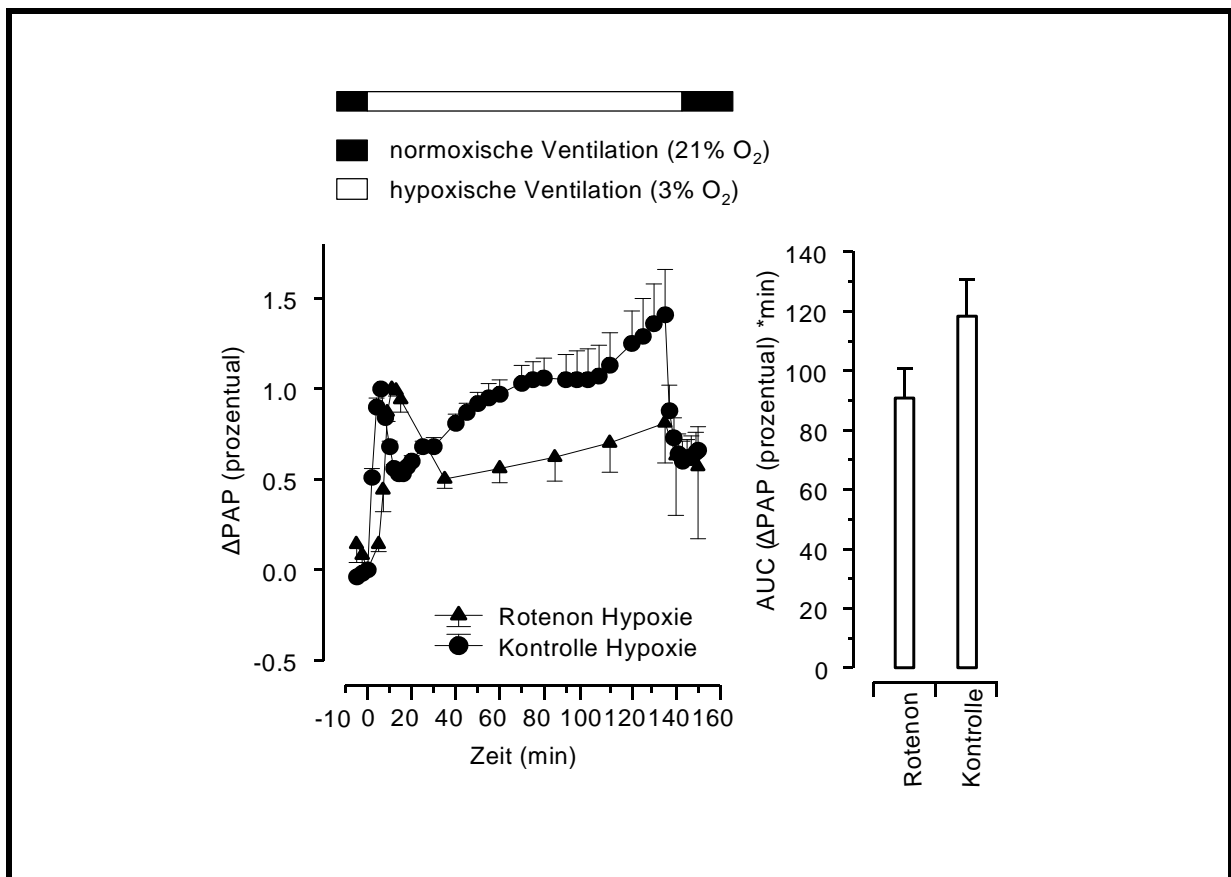
Bei den Versuchen mit Rotenon war, wie in den entsprechenden Kontrollen, ein Verlust der posthypoxischen Vasorelaxation zu beobachten (s. Abb. 8a).



**Abb. 8a:** Vergleich der Kurvenverläufe von Rotenon und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils  $n=5$ . Die Sternchen \* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Hypoxie- zur entsprechenden Normoxie-Kurve.



**Abb. 8b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



**Abb. 8c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5.

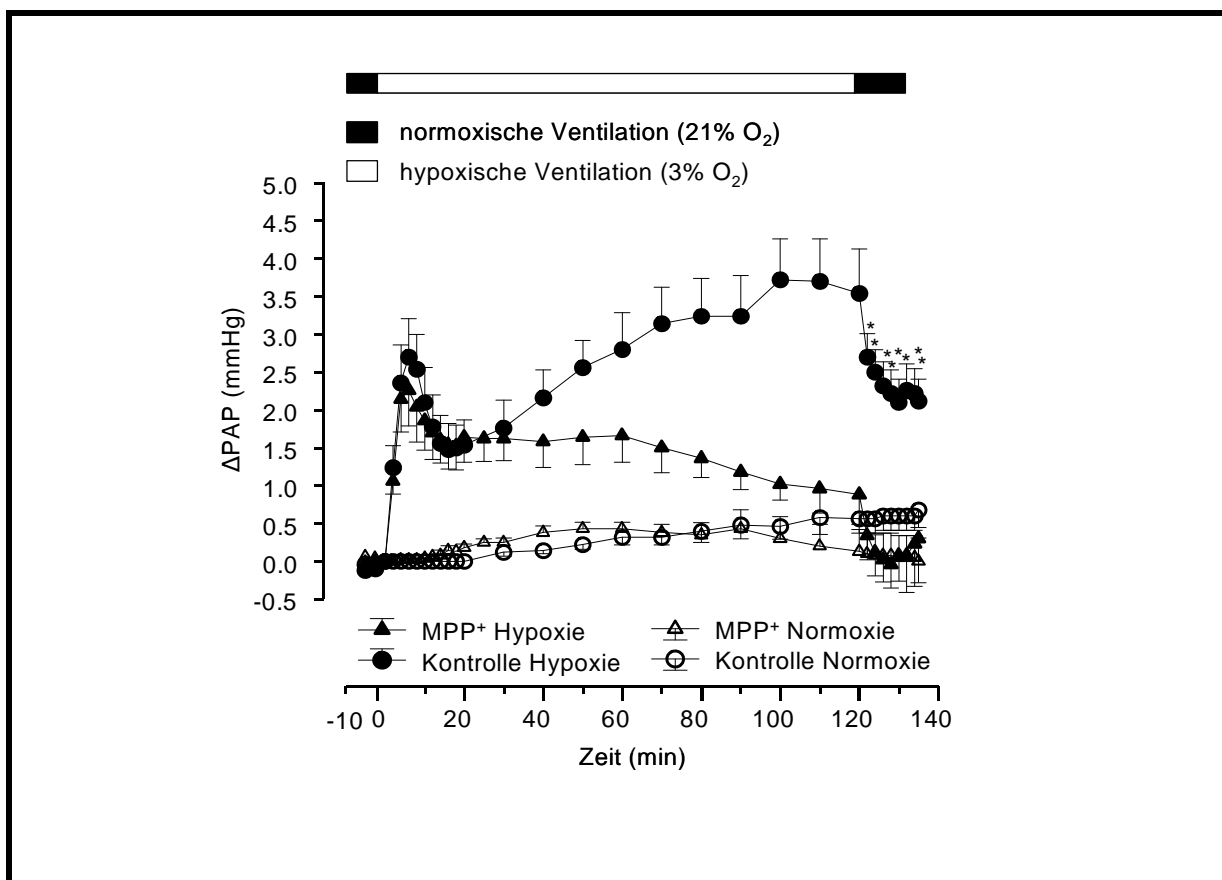
### 3.4 MPP<sup>+</sup>

Der Komplex I Inhibitor MPP<sup>+</sup> hatte, im Gegensatz zu Rotenon, bei Applikation keinen Einfluss auf den gemessenen Vasotonus. Auch zeigte sich keine signifikante Veränderung des normoxischen Vasotonus über den gesamten Verlauf des Experiments (s. Abb. 9a).

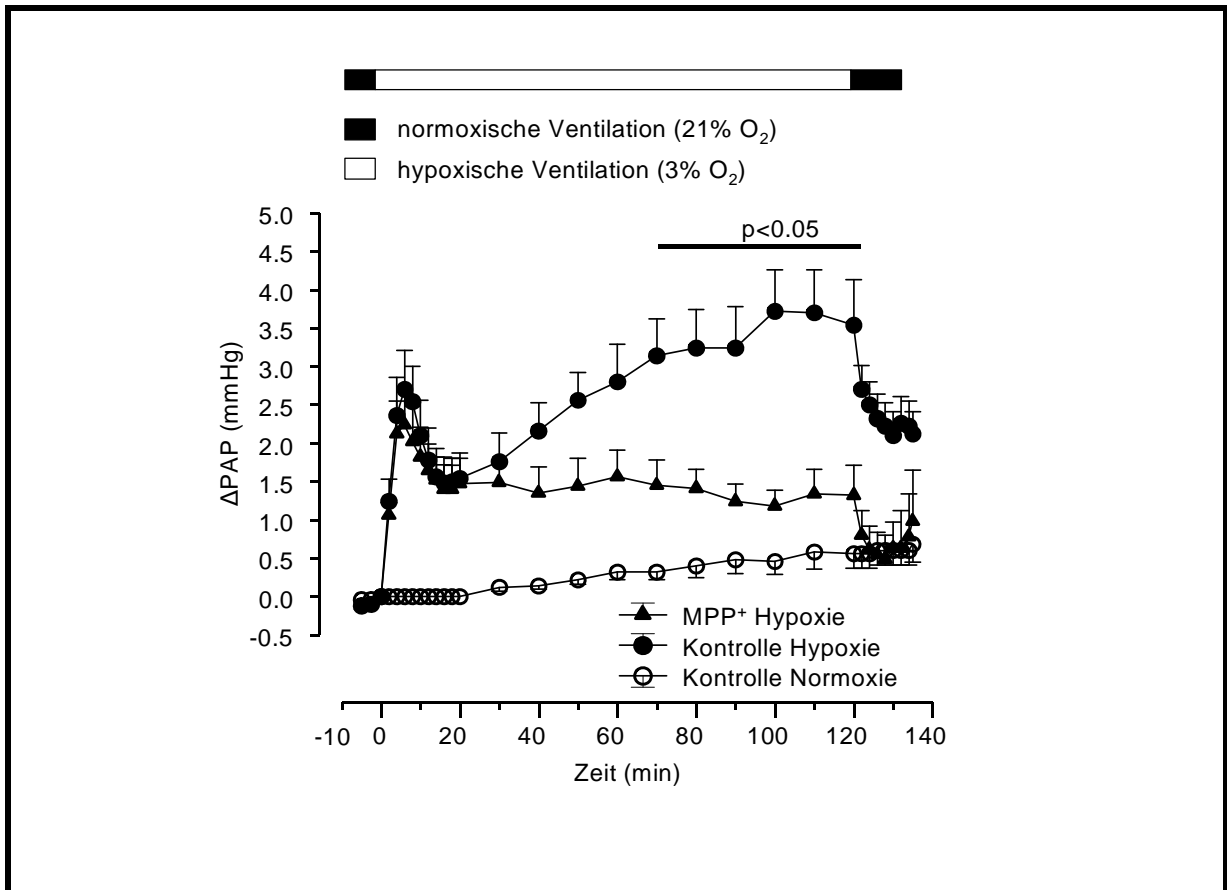
Allerdings fiel auf, dass die unmittelbar der initialen Bolusgabe folgende, kurze Hypoxie, im Bezug auf die erste kurze Hypoxie ( $4,1 \pm 0,4$  mmHg = 100 %), einen größeren maximalen PAP-Anstieg ( $4,4 \pm 0,2$  mmHg =  $112 \pm 12$  %) verursachte.

Unter Hypoxie zeigte die Verwendung von MPP<sup>+</sup> ähnlich Ergebnisse wie bei den Versuchen mit Rotenon. Der Einfluss von MPP<sup>+</sup> auf die subakute Phase der HPV ist auch hier tendenziell größer als auf die akute Phase (s. Abb. 9b). Beim Vergleich der AUC's der beiden prozentualen Kurven (s. Abb. 9c) zeigt sich ein signifikanter Unterschied von  $77,3 \pm 9,5$  (MPP<sup>+</sup>) im Vergleich zu  $127,3 \pm 6,4$  (Kontrolle).

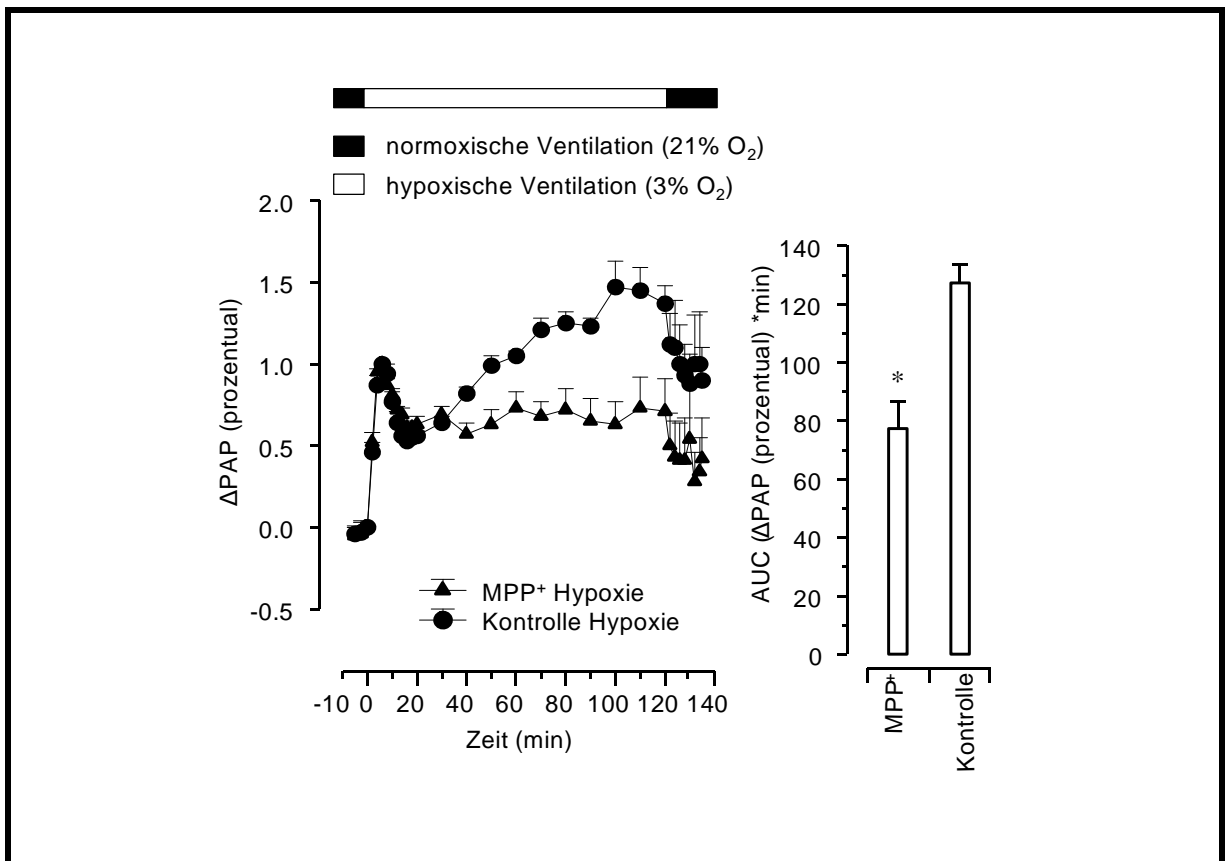
Der in den Kontrollversuchen festgestellte Verlust der posthypoxischen Vasorelaxation wurde durch MPP<sup>+</sup> aufgehoben (s. Abb. 9a).



**Abb. 9a:** Vergleich der Kurvenverläufe von MPP<sup>+</sup> und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils n=5. Die Sternchen \* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied (p < 0,05) der Hypoxie- zur entsprechenden Normoxie-Kurve.



**Abb. 9b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.

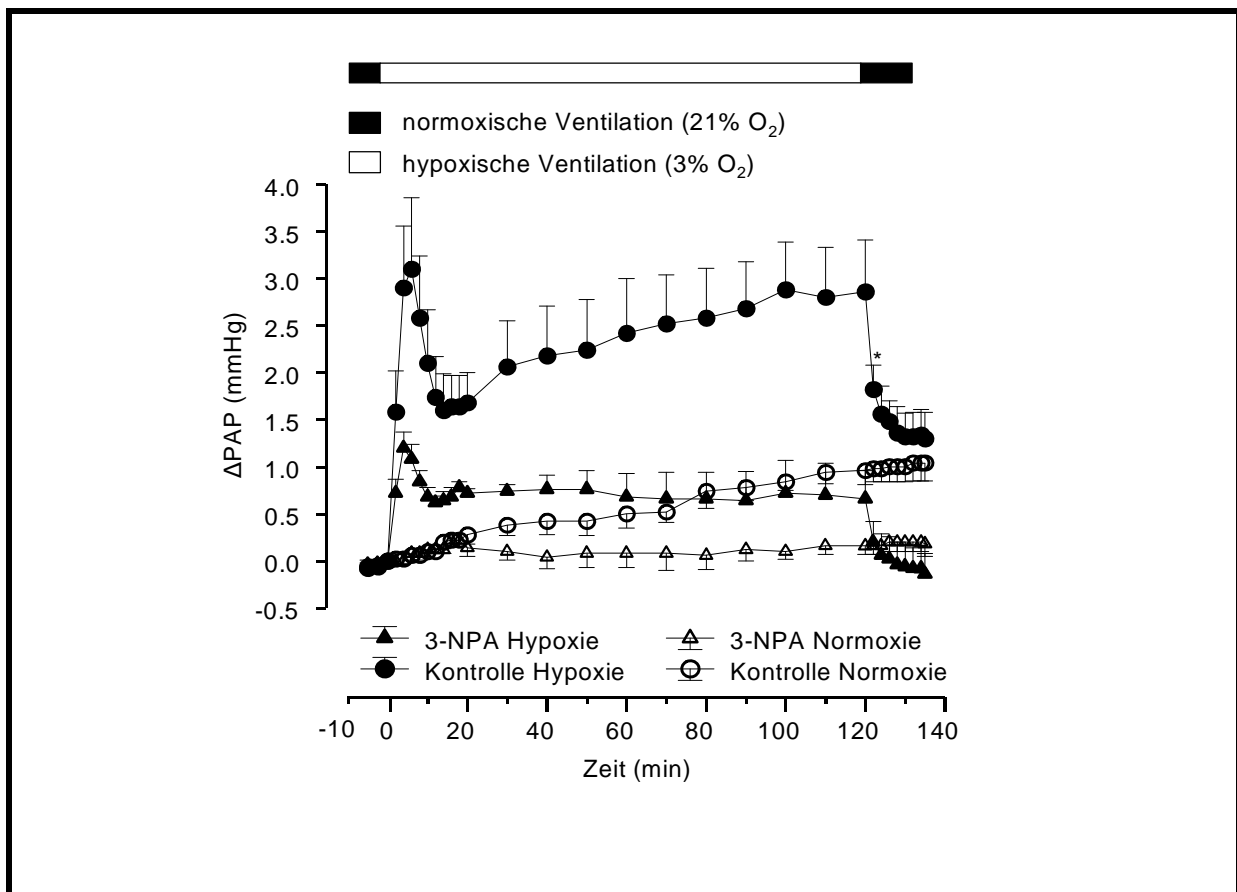


**Abb. 9c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5. Das Sternchen \* markiert einen statistisch signifikanten Unterschied beider Flächen (p < 0,05).

### 3.5 3-NPA

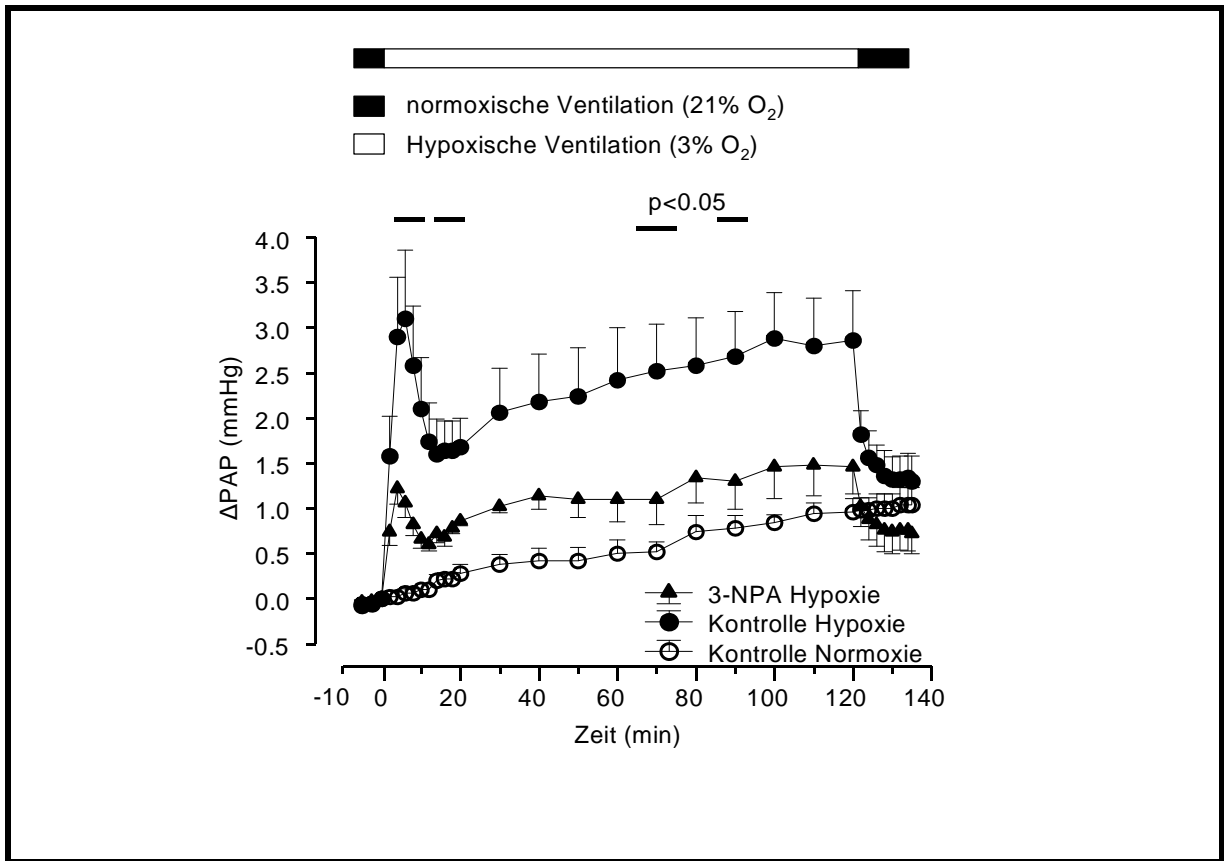
3-NPA, ein Komplex II Inhibitor, zeigte bei Applikation keinen Einfluss auf den PAP. Unter Normoxie (s. Abb. 10a) fällt jedoch der Druckanstieg im Versuchsverlauf mit 3-NPA deutlich geringer aus ( $0,2 \pm 0,1$  mmHg) als in der Kontrollgruppe ( $1,0 \pm 0,2$  mmHg).

In der prozentualen Darstellung ist der Verlauf beider Kurven nahezu identisch, was auch zu ähnlich großen AUC-Werten führt (3-NPA:  $11,5 \pm 17,5$ ; Kontrolle:  $101,6 \pm 17,3$ ). Die Hemmung des hypoxischen Druckanstiegs betrifft die akute und subakute Phase etwa in gleichem Ausmaß (s. Abb. 10b+c).

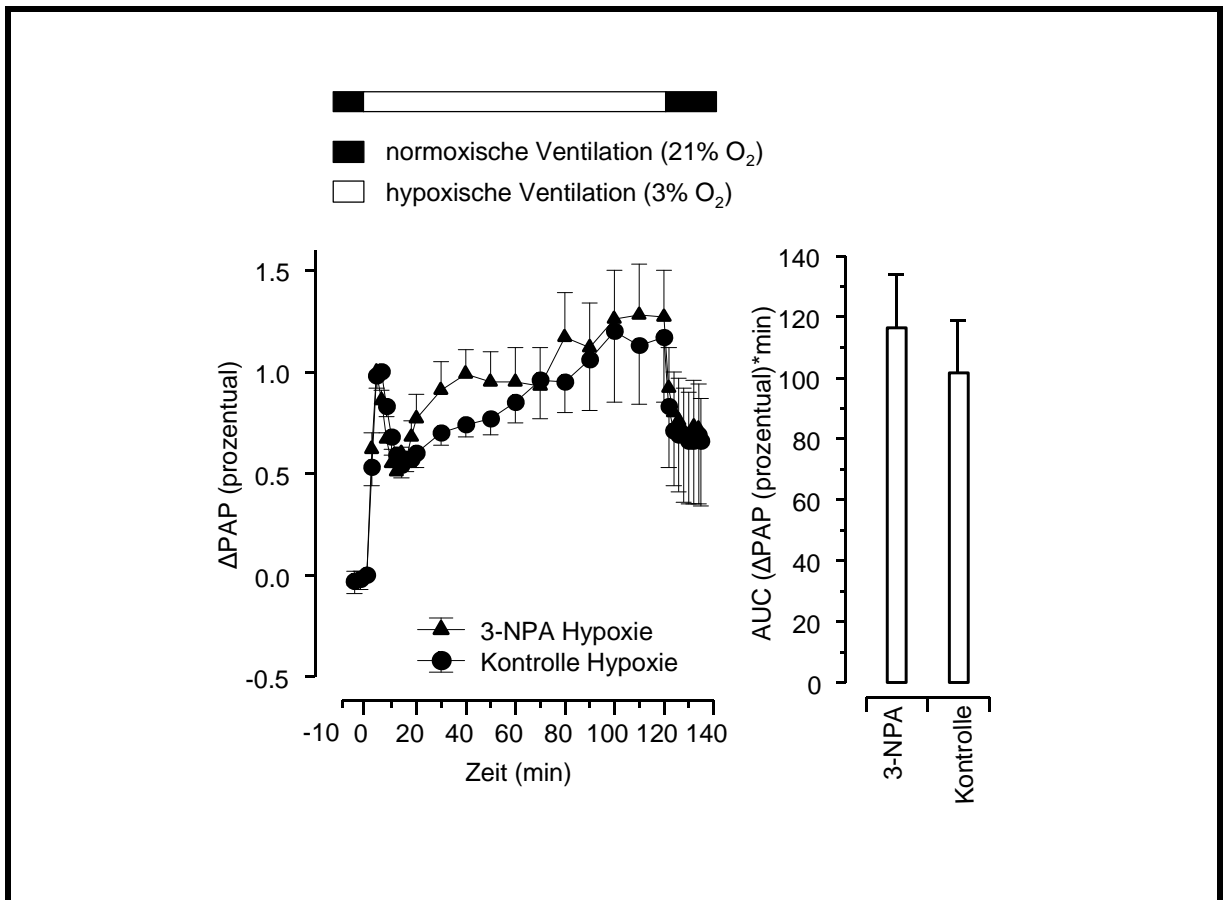


**Abb. 10a:** Vergleich der Kurvenverläufe von 3-NPA und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils  $n=5$ . Die Sternchen \* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Hypoxie- zur entsprechenden Normoxie-Kurve





**Abb. 10b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



**Abb. 10c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5.

### 3.6 Antimycin A

Antimycin A ist ein Komplex III Inhibitor. In den Vorversuchen stellte sich heraus, dass Antimycin A in den Konzentrationen, die nötig waren um die HPV in gewünschten Maß zu verringern, zu einer starken Gewichtszunahme der verwendeten Lungen führte. Um diesen Effekt dennoch möglichst gering zu halten, wurde Antimycin A in repetitiven Boli zugeführt und nicht als kontinuierliche Infusion. Unter Normoxie war die Gewichtszunahme mit  $8,25 \pm 2,25$  g geringer als in den Kurzzeit-Hypoxie Versuchen ( $18,53 \pm 8,96$  g) und den Versuchen mit 120-minütiger Hypoxie ( $21,98 \pm 3,53$  g).

Die dargestellten Werte korrelieren wie bei Rotenon mit dem Zeitpunkt des maximalen PAP-Wertes unter Hypoxie in den Kurzzeit-Hypoxie Versuchen.

Bei Applikation war ein leichter transients Druckanstieg zu beobachten. Unter Normoxie fällt in der Druckzunahme im Versuchsverlauf jedoch kein Unterschied zu Kontrolle auf (s. Abb. 11a).

Die AUC-Werte der hypoxischen, prozentual dargestellten Versuche unterscheiden sich signifikant voneinander (Antimycin A:  $229,22 \pm 31,54$ ; Kontrolle:  $102,94 \pm 11,74$ ), wobei der Einfluss von Antimycin A auf die akute Phase tendenziell größer ist als auf die subakute Phase (s. Abb.11b+c).

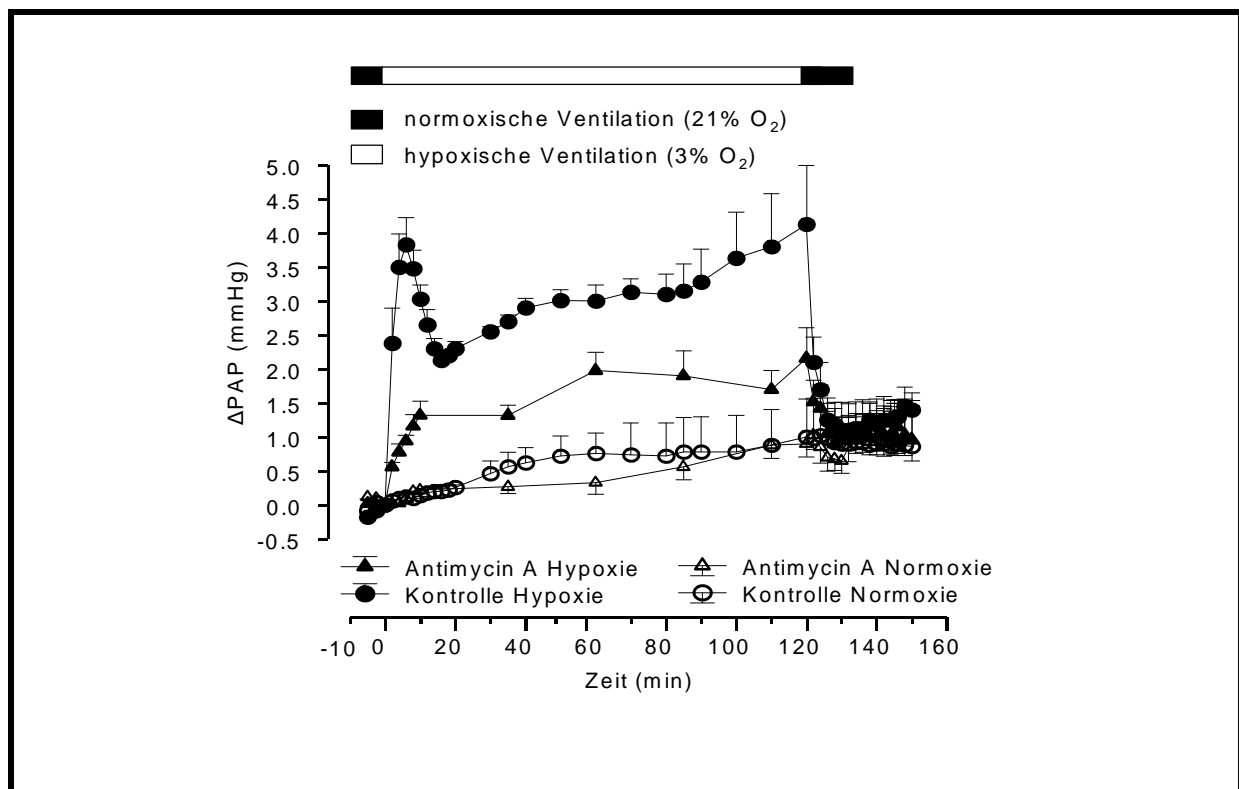
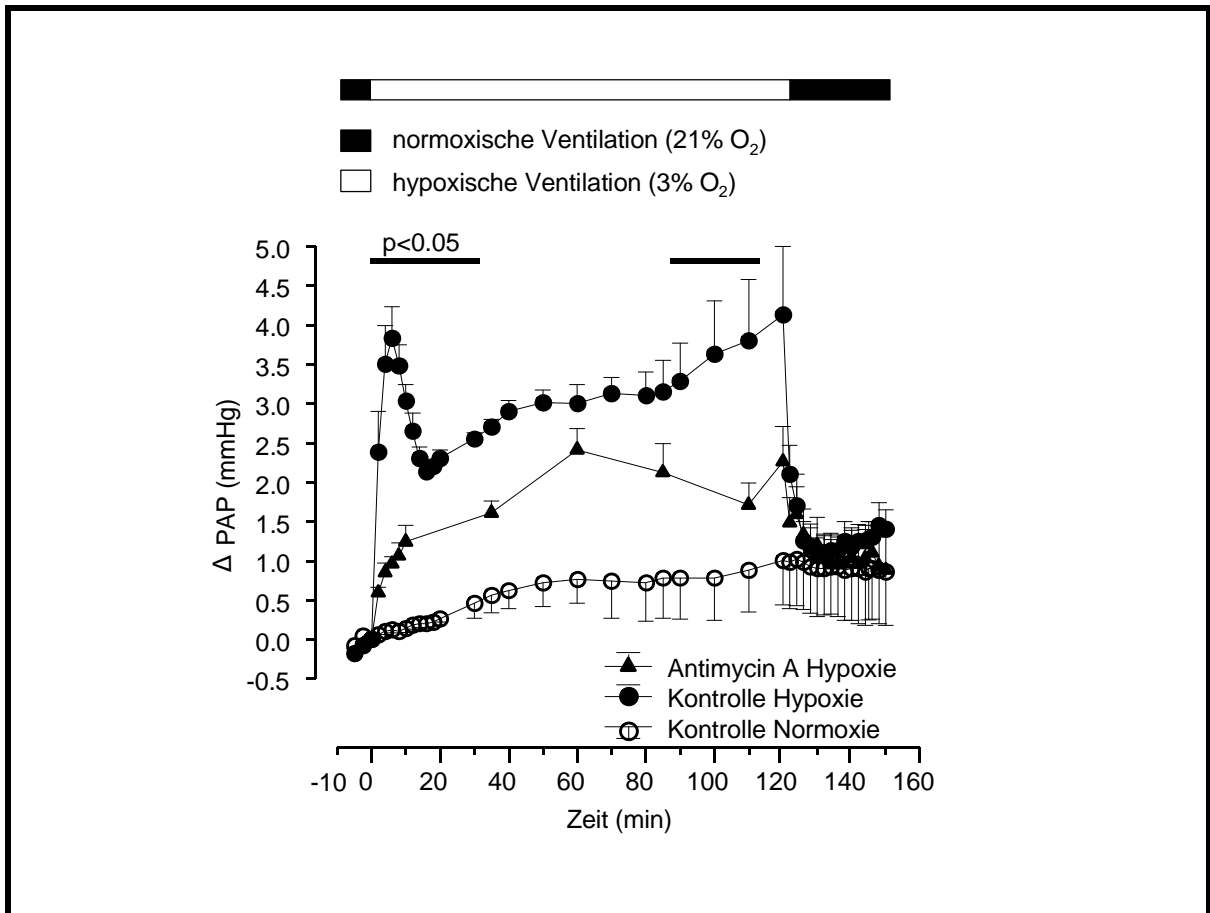
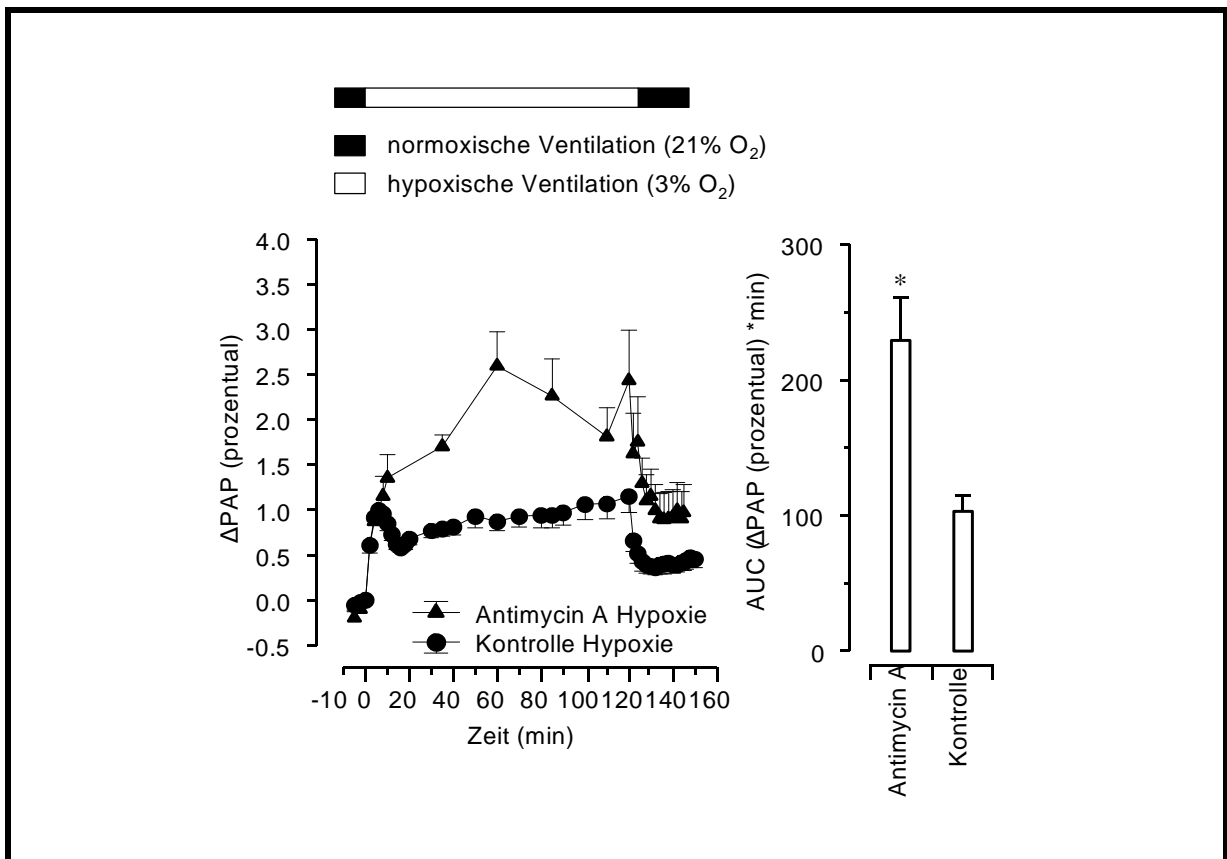


Abb. 11a: Vergleich der Kurvenverläufe von Antimycin A und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils n=5.



**Abb. 11b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



**Abb. 11c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5. Das Sternchen \* markiert einen statistisch signifikanten Unterschied beider Flächen ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Cyanid

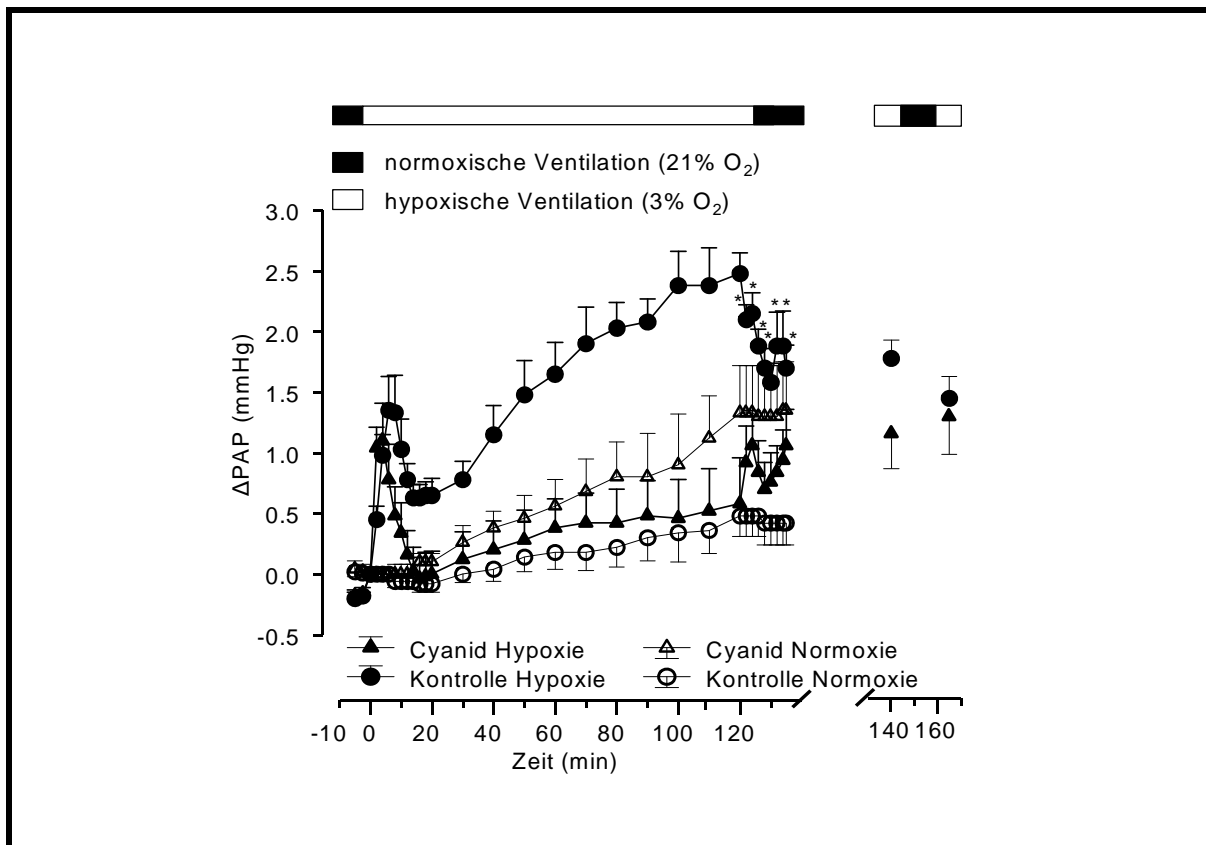
Der Komplex IV Inhibitor Cyanid führte bei Applikation zu einem leichten Druckanstieg ( $0,3 \pm 0,1$  mmHg, Kontrollversuche:  $0,1 \pm 0,0$  mmHg). Auch war in den Normoxie-Versuchen der normoxischer Vasotonus bei Cyanid am Ende tendenziell höher als in den Kontrollen, allerdings nicht statistisch signifikant (s. Abb. 12a).

In der Hypoxie zeigte sich unter Cyanideinfluß ein vollständiges Fehlen der protrahierten Phasen. Nach Durchlaufen der akuten Phase fielen die gemessenen Druckwerte sogar unter den Ausgangsdruck zu Beginn der Hypoxie ( $=0$  mmHg) und unter die Werte der Normoxie. Nach der 120-minütigen Hypoxie ergab sich mit Beginn der erneuten normoxischer Beatmung sogar einen leichten Druckanstieg (s. Abb. 12b).

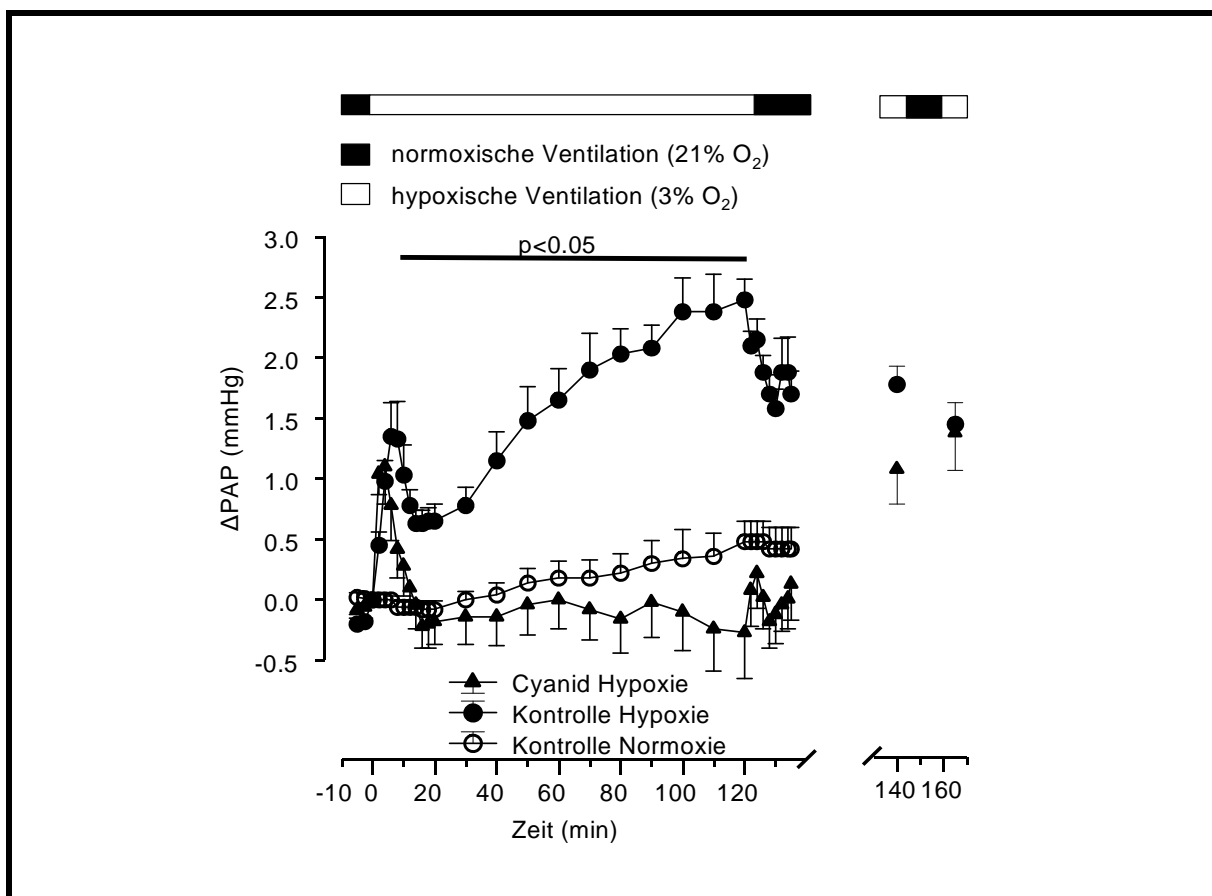
Um nachzuweisen, dass der Verlust der protrahierten Phase nicht Folge eines generellen Verlustes der Kontraktionsfähigkeit der Lungen war, wurden die Lungen im Anschluss an die 120-minütige Hypoxiephase 15 Minuten normoxisch beatmet und dann erneut einer 10-minütigen Hypoxiephase ausgesetzt. Dabei zeigten alle Lungen einen für die akute Phase typischen Druckanstieg, dessen Stärke den Werten entsprach, die zu korrelierenden Zeitpunkten in den Vorversuchsreihen mit wiederholter Kurzzeithypoxie gemessen wurden (vgl. Tab. 2, Kapitel 3.8). Um dies zu verdeutlichen, sind die Stärken der nachfolgenden Druckanstiege bei Cyanid in den Grafiken mit abgebildet.

Für die AUC der Cyanid-Versuche ergibt sich auf Grund des Kurvenverlaufs unterhalb der Nulllinie ein negativer Wert ( $-29,1 \pm 24,3$ ), der sich signifikant vom Kontrollwert ( $150,7 \pm 18,5$ ) unterscheidet (s. Abb. 12c).

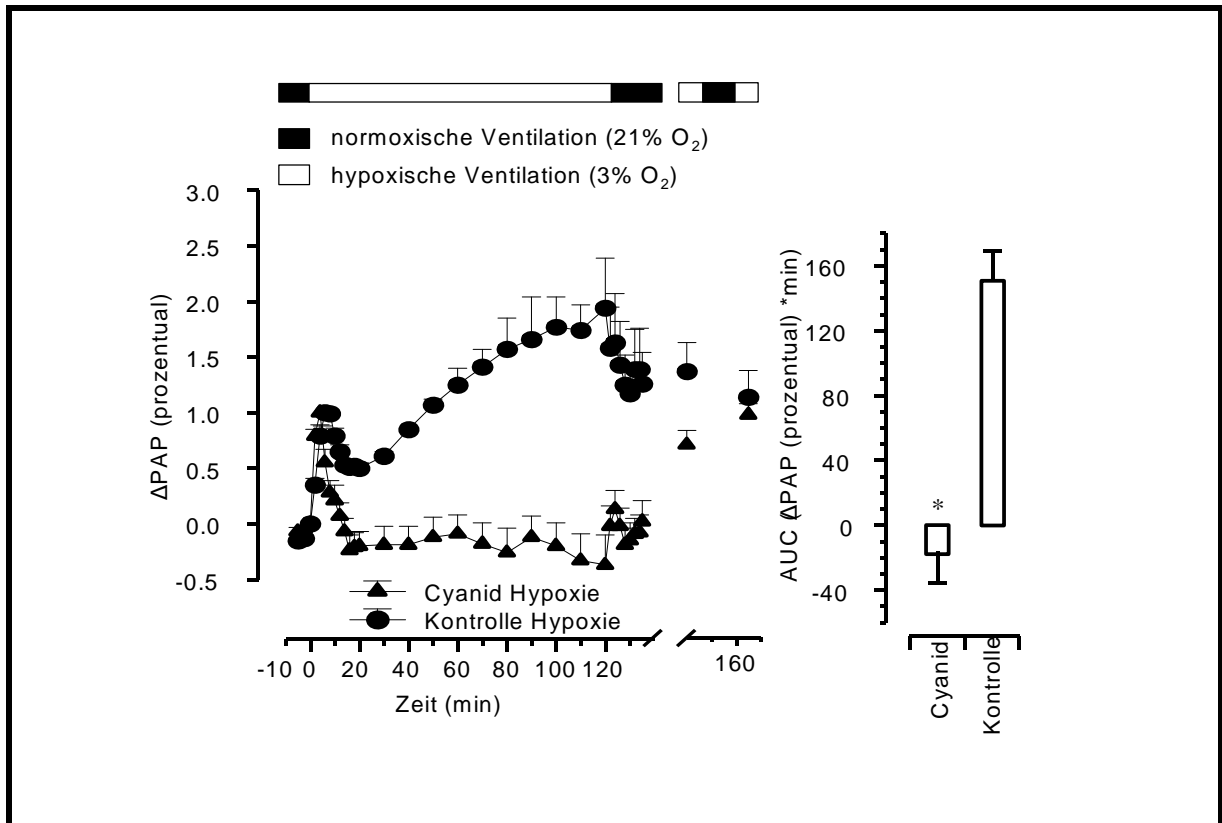
Der Verlust der posthypoxischen Relaxation wurde durch Cyanid aufgehoben (s. Abb. 12a).



**Abb. 12a:** Vergleich der Kurvenverläufe von Cyanid und den dazugehörigen Kontrollen, jeweils n=5. Die Sternchen \* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Hypoxie- zur entsprechenden Normoxie-Kurve. Zusätzlich ist der Druckanstieg der nachfolgenden kurzen Hypoxie angegeben.



**Abb. 12b:** Vergleich der Hypoxie-Kurvenverläufe, jeweils n=5. Der Balken markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Hypoxie-Kurven.



**Abb. 12c:** Prozentuale Darstellung der Hypoxie-Kurven und der daraus errechneten Fläche unter der Kurve (AUC), jeweils n=5. Das Sternchen \* markiert einen statistisch signifikanten Unterschied beider Flächen ( $p < 0,05$ ).

### 3.8 Allgemeines

Um auszuschließen, dass beobachtete Druckunterschiede auf einen generellen Verlust der Kontraktionsfähigkeit zurück zu führen sein könnten, wurden alle Hypoxie-Lungen nach Ende der 120-minütigen Hypoxie und 15 Minuten normoxischer Beatmung erneut 2 kurzen Hypoxie-Phasen ausgesetzt. Alle Lungen reagierten mit dem für die kurze Hypoxie charakteristischen Druckanstieg, und es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Hypoxie-Phasen der Versuche mit repetitiven Kurzzeit-Hypoxien feststellen (s. Tabelle 2).

Substanz	1.		2.	
	nach langer Hox	wiederholte kurze Hox	nach langer Hox	wiederholte kurze Hox
AEBSF	2,0±0,8	2,1±0,6	2,0±0,8	1,8±0,5
Verapamil	1,6±0,9	1,1±0,1	1,1±0,5	1,1±0,1
Rotenon	3,3±0,1	2,4±0,4	3,4±0,4	1,7±0,7
MPP <sup>+</sup>	1,5±0,4	1,0±0,1	1,1±0,2	1,1±0,6
3-NPA	1,0±0,3	1,0±0,3	0,9±0,2	0,8±0,2
Antimycin A	1,6±0,4	0,8±0,4	1,0±0,3	0,7±0,1
Cyanid	1,2±0,3	0,9±0,1	1,3±0,3	1,0±0,1

**Tabelle 2:** Stärke der maximalen Vasokonstriktion im Verlauf der beiden Kurzzeit-Hypoxien nach der Langzeit-Hypoxie bzw. die Stärke der zeitlich dazu äquivalenten Hypoxien bei Versuchsreihen mit repetitiven Kurzzeit-Hypoxien, jeweils n=5.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kalzium-Antagonist

#### Verapamil

Physiologischerweise ist Kalzium an der Kontraktion aller Muskelzellen beteiligt (44). Verapamil verhindert das Einströmen von Kalziumionen in die Zelle, indem es an die  $\alpha_{1c}$ -Unterheit der langsamen, spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ bindet (62).

Die Arbeitsgruppe um McMurty zeigte 1976 erstmals, dass Kalzium-Antagonisten, u.a. auch Verapamil, die HPV in intakten Lungen inhibieren (56, 90).

Seither wurde wiederholt gezeigt, dass der Kalzium-Einstrom in die glatten Gefäßmuskelzellen ein wesentlicher Bestandteil der HPV ist. Einige Autoren sind sogar der Meinung, dass allein dieser Kalzium-Einstrom ausreicht, um eine HPV hervorzurufen (1, 98).

In neueren Untersuchungen ließ sich direkt zeigen, dass Hypoxie in intakten Pulmonalarterien und in isolierten glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien zu einem Einstrom von Kalzium in die Zellen führte (15, 33, 54, 71, 72, 75, 92, 98, 99, 115). Einige Autoren spezifizieren den Kanal, durch den dieser Einstrom erfolgt, als langsamen, spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom L-Typ (16, 49, 75, 92) und beschreiben einen proportionalen Zusammenhang zwischen Stärke der Vasokonstriktion und Menge des einströmenden Kalziums. In vielen Untersuchungen zeigte die Stärke des Kalziumeinstroms einen biphasischen Verlauf, dessen graphisch dargestellte Kurvenform derjenigen der HPV stark ähnlich sah (71, 72, 75, 115). Beachtenswert ist allerdings, dass der gemessene intrazelluläre Kalzium-Spiegel in der protrahierten Phase fast konstant blieb, die Stärke der HPV aber leicht zunahm. Diskutiert wird hierbei eine Endothel-abhängige, durch Rho-Kinase vermittelte Sensibilisierung der glatten Muskelzellen gegenüber Kalzium (47, 60). Leach und Robertson untersuchten den biphasischen Verlauf der HPV an isolierten Pulmonalarterien der Ratte und beschreiben bei einer Verminderung der akuten Phase durch Verapamil einen vollständigen Verlust der protrahierten Phase (49). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den hier gefundenen Ergebnissen, bei denen bei verminderter akuter Phase eine zwar ebenfalls verminderte, aber noch deutlich messbare protrahierten Phase vorhanden war. Unterschiede sowohl in der



Tierart (Kaninchen vs. Ratte) als auch im Modell (isolierte Lunge vs. isolierte Pulmonalarterie) können für diese Differenz verantwortlich gemacht werden.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Verapamil auf die akute und subakute Phase der HPV einen gleich starken Einfluss hat. Kalzium spielt in beiden Phasen der HPV somit eine wichtige Rolle.

Im Gegensatz dazu waren bei der Hemmung der mitochondrialen Atemkette und der NADPH-Oxidase protrahierte und akute Phase unterschiedlich betroffen. Dies ist bei Hemmung des Kalziumeinstroms nicht so. Es kommt zwar zu einer Hemmung der Quantität der HPV, ändert jedoch nicht die Charakteristik des Verlaufs.

Dies könnte damit erklärt werden, dass die Kalziumkanäle vom L-Typ und der Kalziumeinstrom keine eigentlichen Sensoren der HPV sind. In einer Signalkaskade der HPV befinden sich die Kalziumkanäle in nachgeschalteter Position und werden durch andere Faktoren gesteuert. Der Kalziumeinstrom fungiert lediglich als Signaltransduktor, der letztendlich zur Kontraktur der glatten Gefäßmuskulatur führt.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere Kalziumkanal-Varianten oder andere Ionenkanäle Sauerstoff-sensibel sind und ihrerseits eine Öffnung der L-Typ Kalziumkanäle bewirken.

## 4.2 NADPH-Oxidase Inhibitor

### AEBSF

AEBSF (oder auch Pefabloc®) wurde ursprünglich als irreversibler Serin-Protease-Inhibitor entwickelt. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Substanz gleichzeitig ein kompetitiver Inhibitor der NADPH-Oxidase ist. Die klassisch phagozytäre NADPH-Oxidase besteht aus den transmembranen Untereinheiten gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup>, einer kleinen GTPase (Rac 1 oder 2), sowie den zytosolischen Proteinen p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup>. Lange Zeit wurde die NADPH-Oxidase nur im Zusammenhang der Abwehr durch Phagozyten betrachtet. Inzwischen haben Untersuchungen gezeigt, dass sich NADPH-Oxidasen auch in vielen anderen Geweben befinden (4, 19, 31, 34). Besonders für die Untereinheit gp91<sup>phox</sup> konnten mehrere Isoformen gefunden werden. Die erste bekannte Isoform wurde als NOX1 bezeichnet, gp91<sup>phox</sup> selbst als NOX2. Weitere bekannte Isoformen sind NOX3, NOX4 und NOX5. NOX1 und NOX4 wurden in glatten Muskelzellen gefunden (46, 84), NOX4 wurde sogar von Wang et al. (96) als möglicher O<sub>2</sub>-Sensor der Lunge beschrieben. Auch für die anderen Untereinheiten sind inzwischen Isoformen beschrieben worden (5, 32, 88).

In einer NADPH abhängigen Reaktion katalysiert die Oxidase die Bildung von Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>). Um zu wirken, müssen sich die einzelnen Untereinheiten der Oxidase aneinander lagern. AEBSF verhindert dies, indem es p47<sup>phox</sup> aus seiner Position verdrängt. Somit wird das Enzym an seiner Funktion gehindert und es werden keine Sauerstoffradikale gebildet (22).

Aus Untersuchungen von Weissmann et al. (106) geht hervor, dass AEBSF ein spezifischer Inhibitor der HPV ist, da kein Effekt auf die durch U-46619 (einem stabilen Thromboxan-Analogon) ausgelöste Vasokonstriktion nachgewiesen werden konnte. Auch der einzig bekannte Nebeneffekt von AEBSF, die Proteasehemmung, hat keine Auswirkung auf die HPV, da Untersuchungen mit anderen Proteaseinhibitoren wie PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride) und Aprotinin die HPV nicht beeinflussen (106). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Hemmung der HPV durch AEBSF stärker ausgeprägt war, wenn die NO-Synthese der verwendeten Lungen zuvor durch L-NMMA inhibiert wurde. Deshalb wurde auch in den hier durchgeführten Versuchen dem Perfusionsmedium L-NMMA zugesetzt.

Der von uns beobachtete transiente Druckerhöhung bei Beginn der Applikation von AEBSF wird in anderen Arbeiten ebenfalls beschrieben und ist möglicherweise auf eine Interaktion der Substanz mit dem Eisen-Atom der Häm-Struktur der NADPH-Oxidase zurück zu führen (27, 45, 106). Ein Einfluss dieser Vasokonstriktion auf die Versuchsergebnisse ist auszuschließen, da vor Beginn der 120-minütigen Hypoxie die gemessenen Drücke wieder auf Werte vor der Applikation von AEBSF abfielen.

Eine Reaktion der NADPH-Oxidase auf Hypoxie wird auch von anderen Autoren beschrieben (55, 81), ebenso eine Verminderung der HPV durch Substanzen, welche die Bildung von Sauerstoffradikalen verhindern (55, 81, 106, 111). Weissmann, Winterhalder et al. untersuchten den Einfluss des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI (Diphenyleneiodonium) auf den biphasischen Verlauf der HPV und beschreiben eine Verminderung beider Phasen der HPV (111). Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Versuchen mit AEBSF, dessen Einfluss auf die akute Phase wesentlich stärker als auf die protrahierte Phase war, verhielt sich dies bei den genannten Versuchen mit DPI genau umgekehrt. Bei einer Reduktion der akuten Phase auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes wird ein fast vollständiger Verlust der zweiten Phase der HPV beschrieben. Dieser Widerspruch erklärt sich eventuell daraus, dass DPI kein sehr selektiver Inhibitor der NADPH-Oxidase ist, sondern gleichzeitig einen unspezifischen Einfluss auf viele Flavoproteine ausübt, und somit auch den Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette hemmt. Gleichzeitig hat DPI einen supprimierenden Effekt auf einige Ionen-Kanäle, wie etwa  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle (17, 30, 51, 83, 103, 117).

Arbeiten mit isolierten Lungen Gen-defizienter Mäuse, denen die p47-Untereinheit der NADPH-Oxidase fehlt, zeigen Ergebnisse, die mit denen der hier dargestellten Versuche übereinstimmen: im Vergleich zu Versuchen mit Wildtyp-Mäusen ist die akute Phase der HPV deutlich vermindert, die protrahierte Phase jedoch in vollem Umfang ausgeprägt. Der Vasotonus unter Normoxie ist bei den p47-defizienten Mäusen nicht erhöht (112). Im Gegensatz dazu wurde bei Versuchen mit gp91<sup>phox</sup>-defizienten Mäusen keine Veränderung der HPV im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen gefunden. Ursächlich dafür könnte das Vorhandensein der gp91-Isoformen wie z.B. NOX1 oder NOX4 sein, die zu einem funktionsfähigen NADPH-Oxidase-Komplex führen.

Dies spricht zusammen mit unseren Ergebnissen für eine Aktivierung der NADPH-Oxidase unter Hypoxie, wobei diese Aktivierung hauptsächlich die akute Phase der HPV triggert und nur eine geringe Auswirkung auf die subakute Phase hat.

### 4.3 Inhibition der mitochondriale Atmungskette

#### Rotenon

Es wurde mehrfach gezeigt, dass der Komplex I Inhibitor Rotenon zu einer Hemmung der akuten Phase der HPV führt (3, 47, 48, 73, 102, 109). Daten von Weissmann et al. zeigen, dass Rotenon zu einer selektiven Inhibition der HPV im Vergleich zu U46619-induzierten Vasokonstriktion führte, wenn die NO-Synthese der Lunge durch L-NMMA verhindert wurde (109). Aus diesem Grund wurde zu Beginn der hier durchgeführten Versuche dem Perfusionsmedium L-NMMA zugesetzt. Auch der hier beobachtete Druckanstieg bei Applikation von Rotenon wurde mehrfach beschrieben (3, 47, 73). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch recht unterschiedlich. Waypa et al. beobachteten zusammen mit der Hemmung der HPV eine gleichzeitige Hemmung des intrazellulären Kalziumanstiegs (99), der ursächlich auf die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette zurückgeführt werden könnte. Eine neuere Untersuchung von Searle et al. zieht aber auch einen eventuellen unspezifischen hemmenden Einfluss von Rotenon auf Kalium-Kanäle in Betracht (77). Die Arbeitsgruppe um Leach zeigte, dass die durch Rotenon induzierte Hemmung der HPV in der protrahierten Phase durch die Zugabe des Komplex II-Substrats Succinat reversibel ist (47). Dies spricht für eine wesentliche Beteiligung des Elektronenflusses in der mitochondrialen Atmungskette an der HPV: Die Hemmung des Elektronenflusses an Komplex I vermindert die HPV, die Umgehung von Komplex I über die Zufuhr von Elektronen aus Komplex II hebt die Hemmung auf. Die Arbeitsgruppe um Zhao beobachtete den Einfluss von Rotenon auf die protrahierte HPV an isolierten Pulmonalarterienringen von Ratten und beschreibt bei verminderter akuter HPV einen vollständigen Verlust der protrahierten Phase (109). Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Beobachtungen, wonach eine Hemmung der akuten Phase durch Rotenon auf etwa 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Hemmung der subakuten Phase auf unter 30% führt.

Eine ähnliche Auswirkung im Bezug auf beide Phasen beschreiben Weissmann et al. (111) bei der Verwendung von DPI (Diphenyleneiodonium). Möglicherweise ist dieser Effekt nicht auf die Wirkung von DPI als Oxidasehemmer, sondern auf die für DPI ebenfalls beschriebene Wirkung als Komplex I Inhibitor (30, 51) zurück zu führen.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass Komplex I der mitochondrialen Atmungskette wesentlich an der Regulation der HPV beteiligt ist. Akute und protrahierte Phase der HPV scheinen unterschiedlich reguliert zu werden, wobei Komplex I sowohl auf die akute, jedoch in weit größerem Ausmaß auf die protrahierte Phase Einfluss nimmt.

### **MPP<sup>+</sup>**

Durch die Verwendung von MPP<sup>+</sup> war es möglich, mit einem Komplex I Inhibitor zu arbeiten, auf dessen Applikation kein mit den Beobachtungswerten interferierender Druckanstieg, wie bei Rotenon, stattfand. Der hemmende Effekt von MPP<sup>+</sup> auf die Sauerstoffsensibilität von Glomuszellen wurde von Ortega-Sáenz beschrieben (64) und Untersuchungen von Weissmann et al. beschäftigten sich mit der Auswirkung von MPP<sup>+</sup> auf die akute Hypoxie (109). Darin wurde MPP<sup>+</sup> als spezifischer Inhibitor der HPV identifiziert, da die behandelten Lungen eine Verminderung der HPV bei vollständig erhaltener Reaktion auf das Thromboxan-Analogon U46619 zeigten. Weiterhin wird eine Erhöhung des Vaskulartonus in den normoxischen Kontrollen mit MPP<sup>+</sup> beschrieben. Dieses Verhalten war in den hier durchgeführten Versuchen nicht reproduzierbar.

Da MPP<sup>+</sup> an Komplex I die gleiche Bindungsstelle benutzt wie Rotenon (20, 35), waren bei beiden Versuchsreihen ähnliche Ergebnisse zu erwarten. Tatsächlich hatten beide Inhibitoren denselben Effekt auf die Hypoxie-Phasen. Auch bei MPP<sup>+</sup> scheint der Einfluss auf die protrahierte Phase wesentlich bedeutender zu sein als der auf die akute Phase, und die bei der Diskussion von Rotenon gemachten Aussagen über Komplex I werden durch diese Ergebnisse unterstützt.

### **3-NPA**

Da in neueren Arbeiten eine potentielle Rolle des Komplex II als wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffverbindungen unter Hypoxie diskutiert wird (66), erschien es interessant, auch die Auswirkungen eines Komplex II Inhibitors auf die einzelnen Phasen der HPV zu untersuchen. Da uns kein Komplex II Inhibitor bekannt war, der

selektiv die HPV hemmt, entschieden wir uns für 3-NPA. Für diese Substanz war von Weissmann et al. zumindest eine partielle HPV-Selektivität beschrieben worden, da 3-NPA die HPV wesentlich stärker hemmte als die U46619-induzierte Vasokonstriktion (109). In derselben Arbeit wurde ein fehlender Einfluss von 3-NPA auf den Vaskulartonus unter Normoxie beschrieben. Im Gegensatz dazu fiel in der hier vorliegenden Arbeit eine Verminderung der Tonuszunahme über den gesamten Versuchsverlauf unter Normoxie auf. Unmittelbar nach Applikation hatte 3-NPA jedoch keine messbare Auswirkung auf den Gefässtonus.

Im Bezug auf die protrahierte und akute HPV führte 3-NPA zwar zu einer Verminderung der Stärke beider Phasen, es ließ sich aber kein größerer Effekt auf die akute oder protrahierte Phase beobachten. Die Verminderung der HPV unter Hemmung von Komplex II wird unterstützt durch Untersuchungen von Paddenberg et al. (66), die unter Hypoxie eine von Komplex II abhängige, gesteigerte ROS-Produktion nachwiesen. Daraus kann man schließen, dass Komplex II zwar an der HPV beteiligt ist, ihm aber keine differenzierende Rolle in der Unterteilung in akute und protrahierte Phase zukommt.

## **Antimycin A**

Ein weiterer, häufig verwendeter Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette ist das an Komplex III ansetzende Antimycin A. Mehrere Arbeiten befassen sich auch mit dem Einfluss von Antimycin A auf die akute HPV bei isolierten Lungen und beschreiben eine spezifische Verminderung bzw. Aufhebung der Vasokonstriktion unter Hypoxie. Bei einigen Autoren wird der auch hier zu beobachtende Druckanstieg bei Applikation vermerkt (3, 73, 102), bei anderen allerdings nicht (109). In niedrigen Dosierungen hemmte Antimycin A spezifisch die HPV bei erhaltener U46619-induzierter Kontraktion. Die Dosierungen entsprachen 1ng/ml bei isolierten Rattenlungen (102) bzw. 1-4 nM bei isolierten Kaninchenlungen (109), einem Dosierungsbereich also, in dem auch die von uns verwendeten Dosierungen liegen. Interessanterweise konnten Waypa und Kollegen keine Verminderung des Kalziumeinstroms in Pulmonalarterien-Myozyten durch Antimycin A unter Hypoxie feststellen (99).

Insgesamt sind die in den hier durchgeführten Antimycin A-Versuchen gefundenen Ergebnisse kritisch zu betrachten und vorsichtig zu interpretieren, da es bei allen mit Antimycin A behandelten Lungen zu einer Gewichtszunahme kam und die damit zunehmende Ödembildung und Zellzerstörung die HPV beeinflussen könnte.

Jedoch legen die Daten nahe, dass Antimycin A auf die akute Phase einen weitaus größeren Effekt hat als auf die subakute Phase, und somit der Komplex III stärker an der Regulation der subakuten Phase beteiligt ist.

## **Cyanid**

Die Versuche mit dem Komplex IV Inhibitor Cyanid erwiesen sich als überaus interessant. Der Einfluss von Cyanid auf die HPV ist in der Literatur mehrfach beschrieben, allerdings mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Die hier beobachtete leichte Vasokonstriktion zu Beginn der Applikation von Cyanid wird auch von anderen Autoren beschrieben (3, 73). Dies wurde oft als Hinweis darauf interpretiert, dass ein möglicher O<sub>2</sub>-Sensor innerhalb der mitochondrialen Atmungskette proximal des Komplex IV zu finden sei. Bei einer Blockade der Atmungskette distal der Sensorregion könnten so mehr Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die so vermehrte ROS-Bildung sollte dann zu einer Imitation der HPV führen. Somit ließe sich auch der, im Vergleich zur Kontrolle, etwas erhöhte Druckanstieg unter Normoxie erklären. Möglicherweise könnte auch eine Verstärkung der HPV durch einen synergistisch erhöhten ROS-Anstieg durch Cyanid und Hypoxie resultieren. Was die Stärke der HPV nach Cyanid-Gabe betrifft, finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Für die akute Phase der HPV beschreiben die Arbeitsgruppen um S.L. Archer und G.B. Waypa (3, 102) tatsächlich eine Verstärkung der HPV unter Cyanideinfluss am Modell der isolierten Rattenlunge. Zusätzlich stellten Waypa et al. keine Veränderung des hypoxie-induzierten Kalziumeinstroms bei isolierten Pulmonalarterien-Myozyten von Ratten durch Cyanid fest (99). Rounds et al. beobachteten allerdings am gleichen Modell wie Archer et al. (und einem identischen Rattenstamm) eine fast vollständige Suppression der akuten HPV (73). Auffällig ist, dass Archer et al. und Waypa et al. wesentlich niedrigere Dosierungen (10-150 µM) verwendeten als Rounds et al. (1 mM). Auch Arbeiten von Weissmann et al. zeigen am Modell der



isolierten Kaninchenlunge eine vollständige Suppression der akuten HPV unter Cyanid bei Dosierungen ab 80  $\mu\text{M}$  (112), wobei sich diese Dosierung auf Grund der unterschiedlichen Tierart nur bedingt mit den o.g. Werten vergleichen lässt.

Leach und seine Arbeitsgruppe beobachteten als eine der ersten den Einfluss von Cyanid auf die prolongierte, subakute HPV an kleinen isolierten Pulmonalarterien-Ringen von Ratten (47). Bei einer Dosierung von 100  $\mu\text{M}$  fanden sie zwar eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte akute HPV, jedoch eine deutliche Verstärkung der subakuten Phase. Diese Daten widersprechen den hier gefundenen Ergebnissen im Bezug auf die subakute HPV. Mögliche Erklärungen hierfür sind die Unterschiede beider Arbeiten sowohl im Bezug auf die verwendeten Tierarten (Ratte vs. Kaninchen) als auch auf die Modelle (isolierte Pulmonalarterien-Ringe vs. isolierte Lunge). Es muss in Betracht gezogen werden, dass die HPV am Modell der isolierten Lunge ein weitaus größeren Zahl von Regulations- und Modulationsfaktoren unterworfen ist als dies bei isolierten Arterien der Fall ist und Cyanid auf die verschiedenen Faktoren einen unterschiedlichen Einfluss haben kann. Da Leach et al. in derselben Veröffentlichung ebenso wie andere Autoren (21, 61, 97) berichten, dass die protrahierte Phase stark abhängig von intaktem Endothel ist, d.h. der Verlust des Endothels zu einem Verlust der protrahierten HPV führt, stellte sich die Frage, ob nicht eine Schädigung des Endothels oder der glatten Gefäßmuskulatur selbst durch Cyanid eine Erklärung für den beobachteten Verlust der zweiten Phase sein könnte. Vergleicht man die Gewichtszunahme im Verlauf des Versuchs der mit Cyanid behandelten Lunge ( $3,56 \pm 0,45$  g) und die der Kontrolle ( $3,52 \pm 0,55$  g), lässt sich in der Cyanid-Gruppe allerdings keine stärkere Ödembildung als Zeichen der Zellschädigung feststellen, was dieser Argumentation widerspricht. Eine Schädigung der glatten Gefäßmuskulatur ist ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, da nach Beendigung der 120-minütigen Hypoxie-Phase die Lungen mit zwei weiteren 10-minütigen Hypoxie-Phasen konfrontiert wurden, und die akute HPV in den mit Cyanid behandelten Lungen weiterhin voll ausgeprägt war.

Somit kann angenommen werden, dass Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette ein potentieller Sensor oder aber zumindest ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade der subakuten HPV ist.

#### 4.4 Posthypoxische Vasorelaxation

In jüngster Zeit wurde neben der eigentlichen HPV einem weiteren Phänomen, der posthypoxischen Vasorelaxation, zusätzliche Beachtung geschenkt. Während Wellington und seine Kollegen 1993 in Versuchen mit Hundelungen nach Abschluss einer 160-minütigen Hypoxie eine unveränderte Vasorelaxation beschreiben (48), zeigten Versuche von Weissmann et al., dass es nach Abschluss einer prolongierten Hypoxiephase zu einem partiellen Verlust der Vasorelaxation kommt (111). Der (normoxische) Vasotonus, auf den die Druckwerte nach Beenden der Hypoxie abfielen, lag über den Werten der rein normoxisch beatmeten Kontrollgruppe. Auch in allen hier durchgeführten Kontrollversuchen war diese Tendenz erkennbar, statistisch signifikant allerdings nur in den Kontrollgruppen für die Substanzen  $MPP^+$ , Rotenon, Cyanid und Verapamil. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen lagen die Druckwerte aller Langzeit-Hypoxie-Versuche, bei denen die Inhibitoren eingesetzt wurden, tiefer. Bei keinem dieser Versuche konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich mit der normoxisch beatmeten Gruppe festgestellt werden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Stärke der HPV und Verlust der posthypoxischen Vasorelaxation gesehen werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Verlust der posthypoxischen Vasorelaxation unabhängig von der eigentlichen HPV ist und ggf. auch durch andere Mechanismen als denen der HPV reguliert werden kann.

## 4.5 Schlussfolgerungen

Auf Grund der Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche muss davon ausgegangen werden, dass akute und protrahierte Phase der HPV unterschiedlich reguliert sind.

Der Kalziumeinstrom und Komplex II scheinen keine Bedeutung in der unterschiedlichen Regulation der beiden Phasen zu haben.

Die Beobachtung, dass vor allem der NADPH-Oxidase Inhibitor AEBSF einen wesentlichen stärkeren Einfluss auf die akute im Vergleich zur subakuten Phase hatte, lässt auf eine führende Rolle der NADPH-Oxidase in der Regulation der akuten HPV schließen.

Zusammen mit den vorausgehenden Daten für DPI (111), sprechen die hier gefundenen Ergebnisse für Rotenon und MPP<sup>+</sup> für eine starke Beteiligung von Komplex I an der subakuten Phase der HPV. Die Bedeutung der Mitochondrien an der Regulation der HPV wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Cyanid die protrahierte Phase der HPV vollständig unterdrückt. Für die Entwicklung einer Vasokonstriktion in der protrahierten Phase scheint auf Grund der hier vorliegenden Daten ein funktionsfähiger Komplex IV wesentlich zu sein. Untersuchungen an Hepatozyten (12) und an Kardiomyozyten (26) konnten zeigen, dass Komplex IV in diesen Zelltypen für den Sauerstoffsensoren-Prozess eine wesentliche Rolle spielt. Möglicherweise stellt Komplex IV auch in der HPV einen Sensor für die protrahierte Hypoxie dar.

Diese differenzierte Regelung der akuten und protrahierten Phase könnte ein Hinweis darauf sein, dass die unterschiedlichen Hypothesen zur HPV kompatibel sind, und lediglich verschiedene Aspekte eines höchst komplexen Vorgangs widerspiegeln. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind nötig, um die weiterhin offenen Fragen zur Regulation der akuten und protrahierten HPV zu klären.

## 5 Zusammenfassung

Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV) beschreibt einen essentiellen Mechanismus, der es der Lunge erlaubt, den lokalen Blutfluss der lokalen Ventilation anzupassen. Dies geschieht durch gezielte Vasokonstriktion und somit Drosselung der Perfusion in den schlecht ventilerten Bereichen. Störungen der HPV finden sich u. a. bei Pneumonie, dem akuten Lungenversagen und Leberversagen und führen zu schweren Hypoxämien. Weiterhin ist bekannt, dass chronisch alveoläre Hypoxie zu chronisch pulmonaler Hypertonie führt.

Seit der Beschreibung durch von Euler und Liljestrand im Jahr 1946 war die HPV Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch sind die ihr zu Grunde liegende Regulationsvorgänge nicht vollständig geklärt. Fraglich ist z.B., welche Zellen und Zellstrukturen an den Regulationsprozessen der HPV beteiligt sind und welche als biochemische Sauerstoffsensoren fungieren. Diskutiert werden hier u.a. NAD(P)H-Oxidase, Mitochondrien und Ionenkanäle. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass die unter Hypoxie in den Lungengefäßen stattfindende Vasokonstriktion einen biphasischen Verlauf aufweist. Bei der ersten oder akuten Phase kommt es mit Beginn der Hypoxie zu einem schnellen Anstieg des Gefäßwiderstandes, der nach etwa 5 Minuten sein Maximum erreicht und sich anschließend wieder partiell verringert. In der zweiten, protrahierten Phase, ca. 20 Minuten nach Beginn der Hypoxie, steigt der Gefäßwiderstand erneut und kontinuierlich an.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf diese beiden Phasen der HPV untersucht werden, um festzustellen, ob diese gleichen oder unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Untersucht wurden:

- Verapamil, ein Kalzium Antagonist
- AEBSF (Pefabloc), ein NADH-Oxidase-Inhibitor
- Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (angegeben jeweils mit Ansatzort der Hemmung):
  - Rotenon (Komplex I)
  - MPP<sup>+</sup> (Komplex I)
  - 3-NPA (Komplex II)
  - Antimycin A (Komplex III)
  - Cyanid (Komplex IV)

In Versuchen mit repetitiven 10-minütigen Hypoxien, die die akute Phase repräsentieren, wurde für jede Substanz ein Applikationsschema ermittelt, bei dem

repetitive, akute Hypoxiereaktionen gleich stark gehemmt wurden. Danach wurden Versuchsreihen mit Lungen durchgeführt, die bei gleichem Applikationsschema einer protrahierten, 120-minütigen Hypoxie ausgesetzt wurden, wobei sich die Auswirkungen auf die protrahierte Phase der HPV beobachten ließen. Kontrollreihen wurden sowohl mit durchgehend normoxisch beatmeten Lungen, als auch mit Lungen, die mit dem gleichen Hypoxie-Intervallen beatmet wurden, denen aber nur die für die Substanzen verwendeten Lösungsmittel entsprechend den Applikationsschemata zugesetzt wurden, durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Verapamil und 3-NPA beiden Phasen der HPV etwa gleich stark hemmten.

AEBSF wirkte auf die akute Phase stärker inhibitorisch als auf die protrahierte. Rotenon und MPP<sup>+</sup> und Cyanid dagegen inhibierten die protrahierte Phase stärker. Insbesondere die Applikation von Cyanid hatte eine vollständige Suppression der protrahierten Phase der HPV zur Folge.

Somit konnte gezeigt werden, dass der akuten und protrahierten Phase der HPV (partiell) unterschiedliche Regulationsmechanismen zu Grunde liegen. Potentiell sind NADH-Oxidasen stark an der Regulation der akuten Phase beteiligt, wo hingegen Mitochondrien, und hier insbesondere Komplex IV, eine stärkere Rolle für die Regulation der protrahierten HPV spielen.

## Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is an essential mechanism of the lung, which adapts local blood flow to local alveolar ventilation. This is achieved by local vasoconstriction and thereby restricted perfusion in poorly ventilated areas. Disturbance in HPV, as it occurs in pneumonia, the adult respiratory distress syndrome and liver failure may result in severe hypoxemia. Further on, generalized chronic alveolar hypoxia is known to induce chronic pulmonary hypertension.

HPV was first described by von Euler and Liljestrand in 1946 and has hence been a subject of intensive investigations. However, the underlying mechanisms are yet poorly understood. It is still uncertain which cells and cell-structures are involved in HPV and which ones act as a biochemical oxygen sensor. Among other things, NAD(P)H-oxidases, mitochondria and ion-channels are under discussion for it.

Recent studies showed that HPV is biphasic. Typically, hypoxia provokes an initial rapid vasoconstriction with a maximum approximately 5 minutes after the onset of hypoxia, followed by a partial relaxation. Secondary, a more or less pronounced sustained vasoconstriction occurs.

In this present study, the influence of several inhibitors on both phases of HPV was observed to find out, whether acute and sustained HPV are differently regulated.

Following substances have been used:

- Verapamil, a calcium-antagonist
- AEBSF (Pefabloc), an inhibitor of NADH-oxidase
- inhibitors of the mitochondriale electron transport chain (given with their localisation of investigation):
  - rotenone (complex I)
  - MPP<sup>+</sup> (complex I)
  - 3-NPA (complex II)
  - antimycine a (complex III)
  - cyanide (complex IV)

In a protocol with repetitive 10-minute hypoxia, representing the first phase of HPV, a pattern of application for each substance was ascertained, by which a series of following, repetitive HPV-reactions were depressed to a similar degree.

Afterwards, employing the same pattern of application, lungs were challenged with 120-minute hypoxia. In doing so, influence on the second phase could be observed.

Controls were performed by using only normoxic ventilated lungs and lungs with an identical ventilation-scheme but only application of the used solvents.

Verapamil and 3-NPA decreased acute and sustained phase of HPV by an identical degree. AEBSF inhibited the acute phase more than the sustained one. Rotenone, MPP<sup>+</sup> and cyanide on the other hand had a more prominent influence on the sustained phase. Especially cyanide totally suppressed the sustained vasoconstriction under prolonged hypoxia.

Consequently, it could be shown that first and second phase of the HPV are regulated differently. NADH-oxidase is investigated in the regulation of the acute phase, whereas mitochondria, especially complex IV, are strongly involved in the regulation of the sustained phase of HPV.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Aaronson, P.I., T.P. Robertson, J.P. Ward. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132: 107-120, 2002.
- 2 Archer, S.L., E. Souil, A.T. Dhin-Xuan, B. Schremmer, J.G. Mercier, A. El Jaagoub, L. Nguyen-Huu, H.L. Reeve, V. Hampl. Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, on hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *Clin. Invest.* 101: 2319-2330, 1998.
- 3 Archer, S.L., J. Huang, T. Henry, D. Petterson, E.K. Weir. A redox based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ. Res.* 73: 1100-1112, 1993.
- 4 Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex, K.H. Krause. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276: 37594-37601, 2001.
- 5 Banfi, B., R.A. Clark, K. Steger, K.H. Krause. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.* 278: 3510-3513, 2003.
- 6 Bartels, H., P. Dejours, H. Kellog, J. Mead. Glossary on respiration and gas exchange. *J. Appl. Physiol.* 34: 549-558, 1997.
- 7 Bennie, R.E., C.S. Packer, D.R. Powell, N. Jin, R.A. Rhoades. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 261: L156-163, 1991.
- 8 Benninghoff, A. (Hrsg.: Drenckhahn, D., W. Zenker). *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1*, 15. Auflage: S. 529-588, Urban & Schwarzenberg, 1994.



- 9 Bjertnaes, L.J., A. Hauge, T. Torgrimsen. The pulmonary vasoconstriction response to hypoxia. The hypoxia sensitive site studied with a volatile inhibitor. *Acta Physiol. Scand.* 109: 447-642, 1980.
- 10 Chandel, N.S., D.S. McClintock, C.E. Feliciano, T.M. Woods, J.A. Melendez, A.M. Rodriguez, P.T. Schumacker. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-induced factor-1 $\alpha$  during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275: 25130-25138, 2000.
- 11 Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, P.T. Schumacker. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11715-11720, 1998.
- 12 Chandel, N.S., G.R.S. Budinger, S.H. Choe, P.T. Schumacker. Cellular respiration during hypoxia: role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 18808-18816, 1997.
- 13 Chandel, N.S., P.T. Schumacker. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old question, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88: 1880-1889, 2000.
- 14 Chen, Q., E.J. Vazques, S. Moghaddas, C.L. Hopper, E.J. Lesnefsky. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278: 36027-36031, 2003.
- 15 Cornfield, D.N., T. Stevens, I.F. McMurty, S.H. Abman, D.M. Rodman. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265: 53-56, 1993.
- 16 Cornfield, D.N., T. Stevens, I.F. McMurty, S.H. Abman, D.M. Rodman. Acute hypoxia causes membrane depolarisation and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J. Physiol.* 266: 469-475, 1994.

- 17 Cross, A.R., O.T. Jones. The effect of the inhibitor diphenyleneiodonium on the superoxid-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* 237:111-116, 1986.
- 18 Cutaia, M., S. Rounds. Hypoxic pulmonary constriction. *Chest* 97: 706-718, 1990.
- 19 De Deken, X., D. Wang, M.C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J.E. Dumont, F. Miot. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275: 23227-23233, 2000.
- 20 Degli, E.M.. Inhibitors of the NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochem. Biophys. Acta* 1364: 222-235, 1998.
- 21 Demiryurek, A.T., R.M. Wadsworth, K.A. Kane, A.J. Peacock. The role of endothelium in hypoxic constriction of human pulmonary artery rings. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 283-290, 1993.
- 22 Diatchuk, V., O. Lotan, V. Koshkin, P. Wikstroem, E. Pick. Inhibition of NAPH oxidase activation by 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J. Biol.Chem.* 272: 13292-13301, 1997.
- 23 Dipp, M., P.C. Nye, A.M. Evans. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281: L318-325, 2001.
- 24 Doenicke, A., D. Kettler, W.F. List, J. Radke, J. Tarnow (Hrsg.) *Anästhesiologie*, 7. Auflage: S.1137, Springer Verlag Berlin, 1995.
- 25 Domino, K.B., L. Chen, C.M. Alexander, J.J. Williams, C. Marshall, B.E. Marshall. Time course and responses of sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction in the dog. *Anaesthesiology* 60: 562-566, 1984.

- 26 Duranteau, J., N.S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao, P.T. Schumacker. Intracellular signalling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 11619-11624, 1998.
- 27 Edwards, S.L., T.L. Poulos. Ligand binding and structural perturbations in cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 2588-2595, 1990.
- 28 Emery, C.J.. Vascular remodelling in the lung. *Eur. Respir. J.* 7: 217-219, 1994.
- 29 Fishman, A.P.. Hypoxia on the pulmonary circulation. *Circ. Res.* 38: 221-231, 1976.
- 30 Gatley, S.J., H.S. Sherrat. The effects of diphenyleneiodonium and of 2,4-dichlorodiphenyleneiodonium on mitochondrial reactions. Mechanism of the inhibition of oxygen uptake as a consequence of the catalysis of the chloride/hydroxyl-ion exchange. *Biochem. J.* 158: 317-326, 1976.
- 31 Geiszt, M., J.B. Kopp, P. Varnai, T.L. Leto. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8010-8014, 2000.
- 32 Geiszt, M., K. Lekstrom, J. Witta, T.L. Leto. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 20006-20012, 2003.
- 33 Geiszt, M., T.L. Leto. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defence and beyond. *J. Biol. Chem.* 279: 51715-51718, 2004.
- 34 Gelband, C.H., H. Gelband. Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels. *Circulation* 96: 3647-3654, 1997.
- 35 Gluck M.R., M.J. Krueger, R.R. Ramsay, S.O. Sablin, T.P. Singer, W.J. Nicklas. Characterization of the inhibitory mechanism of 1-methyl-4-

- phenylpyridinium and 4-phenylpyridine analogs in inner membrane preparations. *J. Biol. Chem.* 269: 3167-74, 1994.
- 36 Gurney, A.M.. Multiple sites of oxygen sensing and their contributions to hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132: 43-53, 2002.
- 37 Hardin, C.. Making sense of oxygen sensing. *J. Physiol.* 536: 2, 2001.
- 38 Hillier, S.C., J.A. Graham, C.C. Hanger, W.W. Wagner Jr.. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J. Appl. Physiol.* 82: 1084-1090, 1997.
- 39 Höhler, B., B. Holzapfel, W. Kummer. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem. Cell Biol.* 114: 29-37, 2000.
- 40 Jabr, R.I., H. Toland, C.H. Gelband, X.X. Wang, J.R. Hume. Prominent role of intracellular  $Ca^{2+}$  release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 122: 21-30, 1997.
- 41 Jolin, A., L. Bjertnaes. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the adult respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35, Suppl. 95: 40-54, 1991.
- 42 Kang, T.M., M.K. Park, D.Y. Uhm. Characterization of hypoxia-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *Life Sciences* 70: 2321-2333, 2002.
- 43 Kang, T.M., P.K. Park, D. Uhm. Effects of hypoxia and mitochondrial inhibition on the capacitative calcium entry in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Life Sciences* 72: 1467-1479, 2003.

- 44 Klinker, R., S. Silbernagel (Hrsg.). Lehrbuch der Physiologie, 2. Auflage: S. 80-104, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996.
- 45 Lahiri, S., W. Ehleben, H. Acker. Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the rat carotid body: roles of heme ligands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9427-9432, 1999.
- 46 Lassegue, B., D. Sorescu, K. Szocs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S.L. Grant, J.D. Lambeth, K.K. Griendlings. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signalling pathways. Circ. Res. 88: 888-894, 2001.
- 47 Leach, R.M., H.M. Hill, V.A. Snetkov, T.P. Robertson, J.P.T. Ward. Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor. J. Physiol. 536: 211-224, 2001.
- 48 Leach, R.M., H.S. Hill, V.A. Snetkov, J.P.T. Ward. Hypoxia, energy state and pulmonary vasomotor tone. Resp. Physiol. Neurobiol. 132: 55-67, 2002.
- 49 Leach, R.M., T.P. Robertson, C.H. Twort, J.P.T. Ward. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. Am. J. Physiol. 266: 223-231, 1994.
- 50 Levy, A.P., N.S. Levy, S. Wegner, M.A. Goldberg. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. J. Biol. Chem. 270: 13333-13340, 1995.
- 51 Li, Y., M.A. Trush. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253: 295-299, 1998.

- 52 Lippert, H.. Lehrbuch Anatomie, 5. Auflage: S. 187-197, Urban & Fischer München Jena, 2000.
- 53 Löffler, G.. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4. Auflage: S.439, Springer Verlag Berlin, 2001.
- 54 López-Barneo, J., R. Pardal, P. Ortega-Sáenz. Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 259-287, 2001.
- 55 Marshall, C., A.J. Mamary, A.J. Verhoeven, B.E. Marshall. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 633-644, 1996.
- 56 McMurty, I.F., A.B. Davidson, J.T. Reeves, R.F. Grover. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ. Res.* 38: 99-104, 1976.
- 57 Michelakis, A.D., B. Thébaud, E.K. Weir, S.L. Archer. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O<sub>2</sub>-sensitive K channels by a mitochondrial O<sub>2</sub> sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J. Mol. Biol. Cell. Cardiol.* 37: 1119-1136, 2004.
- 58 Molter, G., F. Mertzlufft. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. *Anaesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 28: 447-452, 1993.
- 59 Morio, Y., I.F. McMurty. Ca<sup>2+</sup> release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 92: 527-534, 2002.
- 60 Moudgil, R., E.D. Michelakis, S.L. Archer. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.* 98: 390-403, 2005.

- 61 Murata, T., H. Yamawaki, M. Hori, K. Sato, H. Ozaki, H. Karaki. Hypoxia impairs endothelium-dependent relaxation in organ cultured pulmonary artery. *Eur. J. Pharm.* 421: 45-53, 2001.
- 62 Mutschler, E., G. Geisslinger, H.K. Kroemer, M. Schäfer-Korting. *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 8. Auflage: S.559, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.
- 63 Oel, O., M. Maggiorini, M. Ritter, U. Waber, R. Jenni, P. Vock P. Bärtsch. Nifedipin for high altitude pulmonary edema. *Lancet* 2: 1241-1244, 1996.
- 64 Ortega-Sáenz, P., R. Pardal, M. Garcíá-Fernandéz, J. Lopéz-Barneo. Rotenone selectively occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells. *J. Physiol.* 548: 789-800, 2003.
- 65 Osipenko, O.N., A.M. Evans, A.M. Gurney. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O<sub>2</sub>-sensing potassium current. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1461-1470, 1997.
- 66 Paddenberg, R., B. Ishaq, A. Goldenberger, P. Faulhammer, F. Rose, N. Weissmann, R.C. Braun-Dullaeus, W. Kummer. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L710-719, 2003.
- 67 Peake, M.D., A.L. Harabin, N.J. Brennan, J.T. Sylvester. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J. Appl. Physiol.* 51:1214-1219, 1981.
- 68 Post, J.M., C.H. Gelband, J.R. Hume. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inhibition of K<sup>+</sup> channels in canine pulmonary artery: novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarisation. *Circ. Res.* 77:131-139, 1995.

- 69 Post, J.M., J.R. Hume, S.L. Archer, E.K. Weir. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 262: C882-890, 1992.
- 70 Prien, Th., J. Thomitzek, A. W. Sielenkämper. Anästhesie zur video-assistierten thorakoskopischen Chirurgie. *Anesthesiologie & Intensivmedizin* 4: 184-193, 1999.
- 71 Robertson, P.T., D.E. Hague, P.I. Aaronson, J.P.T. Ward. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J. Physiol.* 525: 669-680, 2000.
- 72 Robertson, T.P., P.I. Aaronson, J.P.T. Ward. Hypoxic vasoconstriction and intracellular  $Ca^{2+}$  in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent  $Ca^{2+}$  sensitisation. *Am. J. Physiol.* 268: 301-307, 1995.
- 73 Rounds, S., I.F. McMurty. Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor response in rat lungs. *Circ. Res.* 48: 393-400, 1981.
- 74 Roux, E., M. Marhl. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in  $Ca^{2+}$  removal on airway myocytes. *Biophys. J.* 86: 2583-2595, 2004.
- 75 Salvaterra, C.G., W.F. Goldman. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* 264: 323-328, 1993.
- 76 Scherrer, U., L. Vollenweider, A. Delabays, S. Savcic, U. Eichenberger, G.R. Kleger, A. Fikrle, P.E. Ballmer, P. Nicod and P. Bärtsch. Inhaled nitric oxide for high-altitude pulmonary edem. *N. Engl. J. Med.* 334: 624-629, 1996.
- 77 Searle, G.J., M.E. Hartness, E. Hoareau, C. Peers, P.J. Kemp. Lack of contribution of mitochondrial electron transport to acute  $O_2$  sensing in model airway chemoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 332-337, 2002.



- 78 Seeger, W., D. Walmrath, F. Grimminger. ARDS. *Internist* 36: 785-801, 1995.
- 79 Seeger, W., D. Walmrath, F. Grimminger. Pathogenese und Klinik des ARDS. *Chemotherapie Journal* 3. Jahrgang Heft 4, 1994.
- 80 Seeger, W., H.G. Lasch. Respiratorische Insuffizienz. *Internist* 36: 318-326, 1995.
- 81 Sham, J.S.K.. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Ups and downs of reactive oxygen species. *Circ. Res.* 91: 649-651, 2002.
- 82 Staub, N.C.. Sites of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 88 (Suppl.): 240S-245S, 1985.
- 83 Stuehr, D.J., O.A. Faschun, N.S. Kwon, S.S. Gross, J.A. Gonzales, R. Levi, C.F. Nathan. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 5: 98-103, 1991.
- 84 Suh, Y., R.S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A.B. Chung, K.K. Griendling, J.D. Lambeth. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401: 79-82, 1999.
- 85 Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, Z. Rao. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121: 1043-57, 2005.
- 86 Sylvester, J.T.. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ. Res.* 88: 1228-1230, 2001.
- 87 Szibor, M., C. Richter, P. Ghafourifar. Redox control of mitochondrial functions. *Antioxid. Redox Signal.* 3: 515-523, 2001.

- 88 Takeya, R., N. Ueno, K. Kami, M. Taura, M. Kohijma, T. Izaki, H. Nuno, H. Sumimoto. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* 278: 25234-25246, 2003.
- 89 Theissen, J.L., A. Meißner. Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. *Anaesthesist* 45 : 643-652, 1996.
- 90 Tucker, A., I.F. McMurty, R.F. Grover, J.T. Reeves. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by verapamil in intact dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 611-614, 1976.
- 91 Turner, J.L., R.Z. Kozlowski. Relationship between membrane potential, delayed rectifier K<sup>+</sup> currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp. Physiol.* 82: 629-645, 1997.
- 92 Vadula, M.S., J.G. Kleinman, J.A. Madden. Effects of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am J. Physiol.* 265: 591-597, 1993.
- 93 Voelkel, N.F.. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 1186-1194, 1986.
- 94 Voet, D., J.G. Voet. *Biochemie*, 1. Auflage: S.532-545, VCH Verlag Weinheim, 1994.
- 95 Von Euler, U.S. and G. Liljestrand. Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 12: 301-320, 1946.
- 96 Wang, D., C. Youngson, V. Wong, H. Yeger, M.C. Dinan, E. Vega-Saenz Miera, B. Rudy, E. Cutz. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K<sup>+</sup> channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13182-13187, 1996.

- 97 Ward, J.P., T.P. Robertson. The role of endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Exp. Physiol.* 80: 793-801, 1995.
- 98 Ward, J.P.T., V.A. Snetkov, P.I. Aaronson. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell calcium* 36: 209-220, 2004.
- 99 Waypa, G.B., J.D. Marks, M.M. Mack, C. Boriboun, P.T. Mungai, P.T. Schumacker. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Cir. Res.* 91: 719-726, 2002.
- 100 Waypa, G.B., P.T. Schumacker. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J. Appl. Physiol.* 98: 404-414, 2005.
- 101 Waypa, G.B., P.T. Schumacker. O<sub>2</sub> sensing in hypoxic vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 132: 81-91, 2002.
- 102 Waypa, G.P., N.S. Chandel, P.T. Schumacker. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ. Res.* 88: 1259-1266, 2001.
- 103 Weir, E.K., C.N. Wyatt, H.L. Reeve, J. Huang, S.L. Archer, C, Peers. Diphenyleneiodonium inhibits both potassium and calcium currents in isolated pulmonary smooth artery smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 76: 2611-2615, 1994.
- 104 Weir, E.K., S.L. Archer. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* 9: 183-189, 1995.
- 105 Weißmann, N. . Die hypoxische Vasokonstriktion isolierter, artifiziell perfundierter und ventilierter Kaninchenlungen. Promotionsschrift aus der naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen, 1994.

- 106 Weissmann, N., A. Tadić, J. Hänze, F. Rose, S. Winterhalder, M. Nollen, R.T. Schermuly, H.A. Ghofrani, W. Seeger, F. Grimminger. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L683-L690, 2000.
- 107 Weissmann, N., F. Grimminger, A. Olschewski and W. Seeger. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281: L314-L317, 2001.
- 108 Weissmann, N., F. Grimminger, D. Walrath and W. Seeger. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Resp. Physiol.* 100: 159-169, 1995.
- 109 Weissmann, N., N. Ebert, M. Ahrens, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, J. Hänze, L. Fink, F. Rose, J. Conzen, W. Seeger, F. Grimminger. Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: 1-13, 2003.
- 110 Weissmann, N., R. Voswinkel, T. Hardebusch, S. Rosseau, H.A. Ghofrani, R. Schermuly, W. Seeger, F. Grimminger. Evidence for a role of protein kinase C in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 276: L90-L95, 1999.
- 111 Weissmann, N., S. Winterhalder, M. Nollen, R. Voswinckel, K. Quanz, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, W. Seeger, F. Grimminger. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280: L638-L645, 2001.
- 112 Weissmann, N., S. Zeller, R.U. Schäfer, C. Turowski, M. Ay, K. Quanz, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, L. Fink, W. Seeger, F. Grimminger. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 34:505-13, 2006.

- 113 Weissmann, N., W. Seeger, J. Conzen, L. Kiss and f. Grimminger. Effects of arachidonic acid metabolism on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Eur. J. Pharm.* 356: 231-237, 1998.
- 114 Wellington K.I., R. Sanchez, J.B. Ravn, B. Larsen, O. Amtorp. Effect of prolonged alveolar hypoxia on pulmonary arterial pressure and segmental vascular resistance. *J. Appl. Physiol.* 75: 1194-1200, 1993.
- 115 Wilson, H.L., M. Dipp, J.M. Thomas, C. Lad, A. Galione, A.M. Evans. ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydroxylase act as a redox sensor: a primary role for cADPR in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Biol. Chem.* 276: 11180-11188, 2001.
- 116 Woodmansey, P.A., F. Zhang, K.S. Channers, K.A. Morice. Effects of the calcium antagonist amlodipine on the two phases of hypoxic pulmonary vasoconstriction in rat large and small isolated pulmonary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25: 324-329, 1995.
- 117 Wyatt, C.N., E.K. Weir, C. Peers. Diphenyleneiodonium blocks  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in type I cells isolated from the neonatal rat carotid body. *Neurosci. Lett.* 172: 63-66, 1994.
- 118 Zapol, W.M., M.T. Snider. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N. Engl. J. Med.* 276:476-480, 1976.
- 119 Zollinger, A.. Anästhesie in der Thoraxchirurgie. *Anästhesist* 48: 193-204, 1999.

## 7 Lebenslauf

19.04.1980            Geburt in Villingen  
                         Eltern: August Zeller und Ulla Zeller, geb. Steiner

### **Schulbildung**

1986 - 1990            Grundschule Blumberg

1990 - 1999            Fürstenberg-Gymnasium Donaueschingen

Juni 1999              Abitur mit den Leistungskursen Mathematik und Biologie

### **Berufliche Ausbildung**

Juli 1999              Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter der  
                         Marine

Juli '99 - April '00    Militärische Vorausbildung (Grundausbildung, Offizierslehrgang,  
                         Segelausbildung)

2000 - 2006            Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität  
                         Gießen:  
                         März 2002    ärztliche Vorprüfung  
                         März 2003    erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
                         März 2005    zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
                         Mai 2006    dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und  
                         Approbation

                         April 2003    Beginn der hier vorliegenden Arbeit bei PD Dr.  
                         Weißmann am Medizinischen Zentrum für Innere  
                         Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

seit Juni 2006           Assistenzärztin am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz,  
                         Abteilung Orthopädie und Unfallchirurgie

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Norbert Weißmann für die Themenstellung und die Ermöglichung dieser Arbeit. Danke für die Motivation, die Geduld und die Bereitschaft, jederzeit als kompetenter Ansprechpartner erreichbar zu sein.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für die angenehme, herzliche Atmosphäre und viele fruchtbare Diskussionen bedanken, ganz besonders bei Karin Quanz und Nadine Ebert, die mir bei den kleineren und größeren Problemen des Laboralltags immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank geht auch an meine Eltern und Freunde, die mich immer unterstützt haben.

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.