

Untersuchungen zur Beteiligung von NADPH-  
Oxidasen und reaktiven Sauerstoffspezies an den  
Mechanismen der hypoxischen pulmonalen  
Vasokonstriktion im isolierten Organmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von      André Tadić

aus                      Hannover

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II  
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger  
Gutachter: Prof. Dr. H. Schmidt

Tag der Disputation: 28.05.2002

*Meiner Lebensgefährtin  
und unserer Tochter*

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	5
1.2	Pathophysiologie der HPV	6
1.3	Lokalisation der HPV	7
1.4	Sensoren der HPV	7
1.5	Mediatoren der HPV	8
1.6	Zugrundeliegende Arbeitshypothesen	8
1.6.1	NAD(P)H-Oxidase	9
1.6.2	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	9
1.6.3	Stickstoffmonoxid (NO)	9
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen	10
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>11</b>
2.1	Experimentelle Agenzien und Pharmaka	11
2.2	Geräte und Hilfsmittel	12
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Modell der isolierten Kaninchenlunge	13
3.1.1	Grundlagen	13
3.1.2	Aufbau des Arbeitsplatzes	13
3.1.3	Präparation der isolierten Lunge	18
3.1.4	Integration des Organs in das Meßsystem	19
3.1.5	Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems	20

<b>3.2</b>	<b>Experimentelle Modi zur Untersuchung der HPV</b> .....	<b>20</b>
3.2.1	Experimente mit hypoxisch- oder U46619-induzierten Vasokonstriktionen.....	20
3.2.1.1	Grundlagen .....	20
3.2.1.2	Applikation der Agenzien.....	23
3.2.1.3	Kontrollexperimente .....	24
3.2.1.4	Evaluierung der Effekte der applizierten Substanzen.....	24
3.2.1.5	Auswertung und Präsentation der Daten .....	25
3.2.1.6	Statistik .....	28
3.2.2	Experimente ohne induzierte Vasokonstriktionen .....	28
3.2.2.1	Grundlagen .....	28
3.2.2.2	Applikation der Agenzien.....	29
3.2.2.3	Kontrollexperimente .....	29
3.2.2.4	Evaluierung der Effekte der applizierten Substanzen.....	30
3.2.2.5	Auswertung und Präsentation der Daten .....	30
3.2.2.6	Statistik .....	30
<b>3.3</b>	<b>Detailbeschreibung der verwendeten Substanzen und ihr postulierte Wirkprofil für die Differenzierung von Sensor- und Signaltransduktionsmechanismen der HPV</b> .....	<b>31</b>
3.3.1	Untersuchungen zur NADPH-Oxidase .....	31
3.3.1.1	AEBSF.....	31
3.3.1.2	Aprotinin.....	33
3.3.1.3	PMSF .....	33
3.3.2	Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	34
3.3.2.1	DETC.....	34
3.3.2.2	TETA .....	34
3.3.2.3	DFO .....	35
<b>3.4</b>	<b>Messung des Einflusses von 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid (AEBSF) auf den NADPH-Oxidase-abhängigen <i>oxidative burst</i> von Alveolarmakrophagen der Kaninchenlunge</b> .....	<b>36</b>
3.4.1	Isolation von Alveolarmakrophagen und Messung des <i>oxidative burst</i> .....	36
3.4.2	Evaluation des Einflusses von AEBSF auf den <i>oxidative burst</i> .....	37

<b>3.5</b>	<b>Messung des exhalativen Stickstoffmonoxids (NO) unter Versuchsbedingungen .....</b>	<b>37</b>
3.5.1	Technik der <i>online</i> -Bestimmung des exhalativen NO .....	37
3.5.2	Auswertung und Präsentation der Daten .....	37
<b>3.6</b>	<b>Spektrophotometrische Messung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) aus homogenisiertem Lungengewebe.....</b>	<b>38</b>
3.6.1	Grundlagen .....	38
3.6.2	Versuchskomponenten und ihre Wirkungsweise .....	39
3.6.2.1	Mitgelieferte Komponenten.....	39
3.6.2.2	Prinzipien des Assays .....	39
3.6.3	Definition der Einheit „SOD-525“ .....	40
3.6.4	Extraktion der Cu/Zn-SOD .....	41
3.6.5	Spektrophotometrische Messung der Enzymaktivität.....	42
3.6.6	Berechnung der SOD-Aktivität .....	43
3.6.7	Statistische Auswertung .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zur NADPH-Oxidase.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	AEBSF.....	46
4.1.1.1	Einfluss auf den normoxischen Vasotonus.....	46
4.1.1.2	Einfluss auf die HPV .....	48
4.1.2	PMSF und Aprotinin .....	54
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) .....</b>	<b>55</b>
4.2.1	DETC.....	55
4.2.2	TETA.....	58
4.2.3	DFO .....	62

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Interpretation möglicher Ergebniskonstellationen .....</b>	<b>66</b>
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen zur NADPH-Oxidase.....</b>	<b>67</b>
5.3.1	AEBSF.....	67
5.3.2	PMSF und Aprotinin .....	68
5.3.3	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zur NADPH-Oxidase.....	69
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) .....</b>	<b>71</b>
5.4.1	DETC.....	71
5.4.2	TETA.....	72
5.4.3	DFO .....	73
5.4.4	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies .....	75
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>104</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion**

Der Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion wurde erstmalig im Jahre 1946 von VON EULER und LILJESTRAND an der Katze beschrieben (1). Dies ist der Grund dafür, dass die HPV synonym als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet wird. Bei allen darauf untersuchten Säugetieren wurde die Existenz der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nachgewiesen (2). Die Ubiquität dieses Mechanismus zur Optimierung des Blut-Gas-Austausches in der Lunge kennzeichnet seine Notwendigkeit und Zuverlässigkeit innerhalb der Säugetierspezies.

Durch die HPV wird eine lokale Anpassung der pulmonalen Perfusion an die Ventilation ermöglicht. Zur Optimierung des Gasaustausches und der Oxygenierung des Blutes während der Lungenpassage müssen unterventilierte (hypoxische) Lungenareale in einem gewissen Maße vom Blutdurchfluss abgeschlossen werden. In schlecht oder nicht ventilierten Lungenarealen sinkt der Sauerstoffpartialdruck, so dass diese Abschnitte gar nicht (Shuntperfusion), resp. in geringem Maße zur Sauerstoffanreicherung beitragen. Blut aus diesen Lungenabschnitten verlässt die Lunge mit unzureichender Sauerstoffbeladung. Zur Aufrechterhaltung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes ist es folglich notwendig, dass die Perfusion den Ventilationsbedingungen angepasst ist (3, 4).

Die Existenz von gering und nicht ventilierten Lungenarealen ist physiologisch (2). Die HPV führt zu einer vaskulären Widerstandserhöhung in präkapillären, muskularisierten Arteriolen, die innerhalb der hypoxischen Lungenazini lokalisiert sind. Der hier erhöhte Widerstand für die Blutperfusion führt zu einer Umverteilung des Blutes und zu einem erhöhten Blutangebot in besser ventilierten Lungenabschnitten. Bei physiologischerweise temporär hypoventilierten und atelektatischen Lungenabschnitten gewährleistet die HPV als ein basaler Mechanismus bestmögliche Blutoxygenierung und minimales Shuntvolumen. Auch bei einer Atelektasenbildung, die die Grenze vom Physiologischen zum Pathologischen überschreitet, kann die HPV eine ausreichende Oxygenierung des Blutes gewährleisten.

Ausgehend von der Beschreibung des Euler-Liljestrand-Mechanismus vor 55 Jahren konnten bedeutende grundlegende und klinisch bedeutsame Kenntnisse über die pulmonale Zirkulation gewonnen werden (5, 6). Nichtsdestotrotz ist bis heute ungeklärt, a) welche Zellen als

Sauerstoffsensoren fungieren, b) welche subzelluläre Struktur diesen darstellt und c) wie der Mechanismus der inter- oder intrazellulären biochemischen Signaltransduktion bis hin zum Effektor, der Kontraktion der glatten Muskulatur, geartet ist.

Dem Verständnis dieses Mechanismus kommt potentiell große Bedeutung zu, da sowohl seine Störung, als auch seine Überaktivierung zu häufigen, teils schwerwiegenden klinischen Problemen führt (z.B. arterielle Hypoxämie, pulmonale Hypertonie). Eine genaue Kenntnis der Regulationsvorgänge ist nötig, um spezifische, mit therapeutischer Zielsetzung gefasste Interventionen durchzuführen.

## 1.2 Pathophysiologie der HPV

Zu einer Störung oder dem Ausfall der HPV kann es unter anderem bei Erkrankungen wie der Pneumonie, der Sepsis, dem ARDS (acute respiratory distress syndrom) und in seltenen Fällen der Leberzirrhose kommen (4, 7). Der resultierende Shuntfluß der Lunge kann zu unzureichender Blutoxygenierung führen, und in sehr schweren Fällen, z.B. beim ARDS, sogar Patienten gefährden, die mechanisch optimal ventiliert werden. Daher ist es in besonderem Maße für derartige Krankheitsbilder von Bedeutung, eine HPV-spezifische Intervention zu ermöglichen (8).

Den genannten Krankheiten stehen eine Gruppe von Leiden gegenüber, die eine globale pulmonale Hypoventilation und somit alveoläre Hypoxie hervorrufen. Bei chronisch obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale, COPD und Mukoviszidose trägt der hierbei in allen Lungenarealen übermäßig aktivierte Euler-Liljestrand-Mechanismus mit zu der Pathologie bei. Die beim Gesunden notwendige und sinnvolle Vasokonstriktion im Bereich hypoxischer Alveolen führt bei diesen Patienten zu einer extremen Verringerung des Gesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn. Bei aus physiologischer Notwendigkeit nicht in gleichem Maße abnehmendem Herzzeitvolumen ist die direkte Folge ein Anstieg des totalen pulmonalarteriellen Widerstandes mit konsekutiver Druckerhöhung im Lungenkreislauf, einer sogenannten *Pulmonalen Hypertonie*. Zusätzlich kommt es zu einem Umbau der Lungengefäße mit Hypertrophie und Hyperplasie der Gefäßmuskulatur (9); die zunächst reversible pulmonale Hypertonie wird morphologisch fixiert. Der rechte Herzventrikel hält der Druckbelastung nicht ohne Veränderungen stand, sondern hypertrophiert bei chronischer Belastung: es entwickelt sich ein *Cor pulmonale* (10).

Auch bei in großer Höhe Lebenden tritt eine globale alveoläre Hypoxie mit konsekutiver Rechtsherzbelastung auf. Das bei nicht Adaptierten in großer Höhe akut auftretende Höhenödem zeigt pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit dem ARDS und wird möglicherweise durch eine ungleichmäßige HPV ausgelöst (11, 12).

### 1.3 Lokalisation der HPV

Die Lokalisation der HPV wird durch die Anatomie der Lunge determiniert. Die Kapillarstrombahn umschließt lakunenartig die Alveolen. Diesem Gefäßabschnitt sind präkapilläre, muskularisierte Gefäße vorgeschaltet, welche die abhängigen Azini versorgen. Es besteht eine enge räumliche Beziehung zwischen muskularisierter Arteriole und Bronchiolus terminalis; weiter existieren Areale im Bereich des Eintritts der Arteriole in den Azinus, in denen abhängige Alveolen direkt der Gefäßwand anliegen. Nach gegenwärtiger Vorstellung ermöglicht eine derartige Anatomie die Perfusionsverminderung in der zugehörigen Kapillarstrombahn durch ein alveoläres Hypoxiesignal (13).

Dieser direkte alveolo-arterioläre Kontakt ist Voraussetzung für die Hypothese der Regulation der HPV mittels hypoxieinduzierter oder hypoxieinhibierter Mediatorproduktion durch pulmonale Nicht-Muskelzellen, konsekutive Signalvermittlung durch Diffusion der Mediatoren zur glatten Muskulatur der Arteriole und nachfolgender Aktivierung oder Inhibition intrazellulärer Signalsysteme, die zur Kontraktion der glatten Muskelzelle führen (2, 14). Diese *Mediatorhypothese* nimmt einen von der glatten Muskelzelle unabhängigen Sauerstoffsensorkomplex an; gegebenenfalls sind auch die metabolisch leistungsfähigen Endothelzellen (2), Typ-II-Pneumozyten oder Alveolarmakrophagen (14, 15) in Betracht zu ziehen. Im Gegensatz dazu nimmt die Hypothese der Regulation der HPV durch *direkte Hypoxiewirkung* an, dass die glatte Muskelzelle den Hypoxiesensor und Effektor in einem verkörpert, die Signaltransduktion also ausschließlich intra- und nicht interzellulär stattfindet.

### 1.4 Sensoren der HPV

Die Suche nach dem Sauerstoffsensorkomplex als initialem Glied der Signalkette zur HPV führte zur Entwicklung unterschiedlichster Modelle und Versuchsansätze, wie Untersuchungen an Menschen und Ganztieren, teilsolierten Lungen, vollständig isolierten, artifiziell ventilerten

und blutfrei perfundierten Lungen, sowie isolierten Pulmonalgefäßen, Zellkulturen und Studien an subzellulären Strukturen. Orientierend am derzeitigen Kenntnisstand sind als potentielle Sauerstoffsensoren in Diskussion:

- Oxidoreduktasen (14, 16)
- NO-Synthetase (17, 18)
- Die mitochondriale Atmungskette und ATP-Produktion (2, 19)
- Ionenkanalproteine (7, 20)

### **1.5 Mediatoren der HPV**

Eine Vielzahl der möglichen physiologischen vasoaktiven Substanzen und Mediatoren wurde in den vergangenen 55 Jahren seit der Erstbeschreibung des Euler-Liljestrand-Mechanismus untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen konzentriert sich die Forschung zum jetzigen Zeitpunkt auf folgende mögliche Mediatoren oder Regulationsvorgänge:

- Sauerstoffradikale und deren Metaboliten (21, 22)
- Nicht-Sauerstoffradikale und deren Metaboliten (23)
- Stickstoffmonoxid (NO) und seine Metaboliten (17, 18)
- Zyklische Nukleotidmonophosphate und diese regulierende Enzymsysteme (24, 25)
- Membranständige Ionenkanalproteine (26, 27)

Nach allgemeinem Konsens, basierend auf den bisherigen Untersuchungen zur HPV, spielen die vasoaktiven Mediatoren Angiotensin II, biogene Amine, Neurotransmitter, die sympathische und parasympathische Innervation und Cyclo- sowie Lipoxygenaseprodukte des Arachidonsäuremetabolismus allenfalls eine modulierende, jedoch keine kausale Rolle bei der spezifischen Regulation der HPV (7, 28, 29).

### **1.6 Zugrundeliegende Arbeitshypothesen**

Bisher ist nur für wenige Substanzen der Beweis erbracht, dass sie spezifisch in den Sensor- oder Regulationsmechanismus der HPV eingreifen.

### **1.6.1 NAD(P)H-Oxidase**

Es bestehen Hinweise für eine zentrale Rolle einer NAD(P)H-Oxidase für die Regulation der HPV. Diese Hinweise basieren zu einem bedeutenden Teil auf Untersuchungen mit Diphenyleneiodonium (DPI), dem bisher einzigen NAD(P)H-Oxidase-Hemmstoff, der einen spezifisch-inhibitorischen Einfluss auf die HPV der isolierten und artifiziell ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge sowie auf die hypoxisch induzierte Bildung von Superoxidanionen in glattmuskulären Zellen der Pulmonalarterie des Kalbes zeigte (21, 22).

### **1.6.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Vorausgehende Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen legen nahe, dass durch eine NAD(P)H-Oxidase generierte Sauerstoffradikale an der Regulation der HPV beteiligt sind. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse basieren auf Arbeiten, bei denen der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Diphenyleneiodonium (DPI) eingesetzt wurde. Diese zeigten eine dosisabhängige vollständige Aufhebung der hypoxieinduzierten Vasokonstriktion, jedoch keine Hemmung pharmakologisch induzierter Vasokonstriktionen (21, 30).

### **1.6.3 Stickstoffmonoxid (NO)**

Die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) an der Regulation der HPV konnte nachgewiesen werden. Pulmonale Zellen generieren auf kontinuierliche Art und Weise den starken Vasodilatator NO; dieser wird sowohl in das alveoläre als auch in das vaskuläre Kompartiment freigesetzt. Die Menge des freigesetzten NO ist nicht gleichbleibend, sondern wird auf bisher unbekannte Weise, sicher aber sauerstoffabhängig, moduliert. Eine alveoläre Hypoxie provoziert einen sehr raschen Abfall der exhalativen NO-Konzentration, welcher dem pulmonalarteriellen Druckanstieg in der isolierten, volumenfluss-konstant artifiziell perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge vorausgeht. Wird jedoch ein pulmonalarterieller Druckanstieg durch Zugabe von Angiotensin II oder Thromboxan hervorgerufen, ist kein Abfall der exhalativen NO-Konzentration zu verzeichnen (17, 31). Dieser NO-Konzentrationsabfall ist reversibel: die exhalative NO-Konzentration erreicht nach Beendigung der Hypoxie ebenso schnell wieder ihr prähypoxisches Niveau, wie sie es

verlassen hat. Darüber hinaus geht der beschriebene Anstieg der posthypoxischen Gefäßrelaxation zeitlich voraus. Die Inhibition der pulmonalen NO-Produktion verstärkt die HPV im Vergleich zu anderen vasokonstriktorischen Stimuli selektiv. Eine Imitation der HPV findet dabei allerdings nicht statt: die pharmakologische Ausschaltung dieses wichtigen Vasodilatators führt zu keinem nennenswerten Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes unter normoxischer Beatmung. Die hypoxieinduzierte Abnahme der exhalativen NO-Konzentration könnte somit zum Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes beitragen, erklärt den Mechanismus der HPV jedoch nicht hinreichend.

### **1.7 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen**

Basierend auf den bisher bekannten oben genannten Einflussfaktoren der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion adressieren die vorliegenden Untersuchungen:

1. die Abhängigkeit des Mechanismus der HPV von einer NAD(P)H-Oxidase an dem Modell der isolierten Kaninchenlunge anhand der vor kurzem als NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor charakterisierten Substanz 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid (AEBSF).
2. die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für den Sensor- und Signaltransduktionsmechanismus der HPV. Insbesondere sollte untersucht werden, ob eine hypoxische Ventilation der Lunge und die nachfolgende pulmonalvaskuläre Konstriktion durch eine steigende oder sinkende ROS-Menge mediiert wird.

Bei den vorliegenden Untersuchungen stellte das Versuchsmodell der isolierten, artifiziell ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge die optimale Synthese aus nativ erhaltenem Tierorgan inklusive vollständig erhaltener physiologischer Reaktionen und maximaler Reduktion der komplexen Störgrößen eines Lebewesenmodells (Innervation, Blutkreislauf, extrapulmonale metabolische Prozesse) dar.

## 2 Material

### 2.1 Experimentelle Agenzien und Pharmaka

- AEBSF [4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid], Merck (München, Deutschland)
- Aspisol<sup>®</sup> (D,L-Lysin-mono-acetylsalizylat/Glycin, 9:1, AS), Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
- DETC (Diethyldithiocarbaminsäure), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), pro analysi, J. T. Baker Chemicals (Deventer, Holland)
- Gase, Fa. Messer-Griesheim (Herborn, Deutschland)
- HBSS (Hank's balanced salt solution), Gibco (Deutschland)
- Isopropylalkohol, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9% (NaCl), Braun (Melsungen, Deutschland)
- Ketanest<sup>®</sup>, 50 mg/ml (Ketaminbase), Parke-Davis (Berlin, Deutschland)
- Liquemin<sup>®</sup> 25000: 5000 I.E./ml (Na-Heparin), Hoffman La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- L-NMMA (N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin), Calbiochem (Frankfurt, Deutschland)
- Methanol (CH<sub>2</sub>OH) destilliert in Glas, Fluka AG (Bern, Schweiz)
- NaHCO<sub>3</sub>, 8,4 %, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Perfusatlösung, Serag-Wiessner (Naila, Deutschland)
- PMA (Phorbolmyristataacetat), Sigma (München, Deutschland)
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
- Rompun<sup>®</sup>, 2 % (Xylazin), Bayer (Leverkusen, Deutschland)
- Superoxide-Dismutase-Assay-Kit, Calbiochem (Frankfurt, Deutschland)
- TETA (Triethylenetetramindihydrochlorid), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
- Trasylol<sup>®</sup> (Aprotinin), Bayer (Leverkusen, Germany)
- U 46619 (9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ), Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland)
- Xylocain<sup>®</sup>, 2% (Lidocainhydrochlorid), ASTRA Chemicals (Wedel, Deutschland)

## 2.2 Geräte und Hilfsmittel

- Blutgasanalysegerät, ABL 330, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
- Druckaufnehmer Combitrans<sup>®</sup> Monitoring-Set, B. Braun Medical (Melsungen, Deutschland)
- Durchflusszytometer FACSTAR PLUS Cell Sorter, Beckton-Dickinson (Mountain View, USA)
- Gasmischanlage, KM 60-3/6 MESO, Witt (Witten, Deutschland)
- Hamilton Präzisionsspritze 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Mehrfachschreiber, Hellige (Freiburg, Deutschland)
- Membranoxygenator, Modell M8 Exp., Jostra (Hirrlingen, Deutschland)
- Messverstärker, Plugsys DBA 660, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
- Nahtmaterial, Mersilene 4,1 SH, Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
- NO-Analysator, Sievers 280 NOA, Sievers Instruments (Boulder, CO, USA)
- Perfusatfilter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp. (Fajardo, USA)
- Perfusionssystemschläuche „arterielle Seite“, Tygon, Kalensee (Gießen, Deutschland)
- Perfusionssystemschläuche „venöse Seite“, PVC, Sorin Biomedica (Düsseldorf, Deutschland)
- Peristaltikpumpe, roller pump BP 742, Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
- Photometer Uvikon 860, Kontron Instruments (Basel, Schweiz)
- Starling Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
- Thermopumpe, Frigomix 1495, Thermomix 1480, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Venenpunktionsbesteck, W.I.N. 25 G, Abott (Sligo, Irland)
- Wägezelle, Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik (Langen, Deutschland)
- X-Y Schreiber, Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics (Freiburg, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifuge RC-5C, Sorvall<sup>®</sup> Instruments, Du Pont Company (Newtown, CT, USA)

### **3 Methoden**

#### **3.1 Modell der isolierten Kaninchenlunge**

##### **3.1.1 Grundlagen**

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge als isoliertes, blutfrei perfundiertes und artifiziell ventiliertes Organ ist bereits in mehreren Arbeiten beschrieben worden (z.B. 32). Mit leichten Modifikationen in verschiedenen Experimenten eingesetzt, bietet das isolierte, intakte Organ ein von den zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System. Mit ihm können physiologische Organreaktionen untersucht werden, ohne die komplexen Beziehungen der interzellulären biochemischen Interaktionen zu stören. Das Modell ermöglicht die kontinuierliche Messwerterfassung der biophysikalischen Parameter pulmonalarterieller Druck, pulmonalvenöser Druck, Ventilationsdruck und Lungenmasse ebenso wie die einfache Entnahme von Proben aus dem zirkulierenden Perfusat für biochemische Untersuchungen. Lungenmodelle zur Untersuchung der HPV basieren meist auf dem unter Abschnitt 1.2 „Pathophysiologie der HPV“ dargestellten Verhalten von Lungen, bei globaler alveolärer Hypoxie, entsprechend hypoxischer Beatmung der gesamten Lunge, mit einer Reduktion des pulmonalvaskulären Gesamtquerschnittes zu reagieren (33, 34, 35, 36). Das Ausmaß der pulmonalvaskulären Widerstandserhöhung war aufgrund der Verwendung eines perfusionsfluss-konstanten Systems als pulmonalarterieller Druckanstieg erfassbar. Der für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendete Lungenmessplatz wurde für die Untersuchung der HPV an isolierten Kaninchenlungen entwickelt (37). Die Charakterisierung des gesamten Perfusions-, Ventilations- und Meßsystems sowie die Entwicklung optimaler Versuchsmodi erfolgte bereits in vorangehenden Untersuchungen (28, 37).

##### **3.1.2 Aufbau des Arbeitsplatzes**

Die Perfusion der Lunge erfolgte mittels einer Schlauch-Peristaltikpumpe, die einen pulsierenden Perfusatfluss erzeugte. In den Kreislauf waren zwei parallel geschaltete beheizte Perfusatbehälter mit je max. 300 ml Füllvolumen integriert, wodurch ein Perfusatwechsel ohne Unterbrechung der Perfusion sichergestellt wurde. Von diesen Behältern gelangte das

Perfusionsmedium über die Pumpe und einen temporären Perfusatfilter zur Separation ausgespülter Zellen in die Arteria pulmonalis. Das Perfusat passierte kurz vor dem Eintritt in die Pulmonalarterie einen Membranoxygenator (MO). Dieser MO diente der Desoxygenierung des während der Lungenpassage (s.u.) oxygenierten Perfusates; so ermöglichte er die kontrollierte Einhaltung physiologischer gemischtvenöser Gaspartialdrücke und funktionierte gleichsam als Blasenfalle zur Verhinderung von Luftembolien. Der arterielle Katheter war in der Pulmonalarterie fixiert. Das Perfusat passierte die Lungenstrombahn, floss danach über einen im linken Ventrikel fixierten Katheter und das Schlauchsystem zurück in den Perfusatbehälter; es handelte sich folglich um ein rezirkulierendes System. Der linksventrikuläre Katheter war zur Regulation des pulmonalvenösen Drucks in einer höhenverstellbaren Vorrichtung untergebracht. Wenige Zentimeter vor dem Eintritt des pulmonalarteriellen Katheters in die A. pulmonalis konnten über einen Injektionsstopfen Agenzien infundiert und injiziert werden. Auch die Reservoirgefäße wurden zu diesem Zweck genutzt.

In dem pulmonalarteriellen Katheter befand sich ein kleinlumiger hartwandiger Druckmesskatheter (Innendurchmesser 1 mm), dessen distale Öffnung in der Pulmonalarterie zu liegen kam. Dieser Katheter war luftblasenfrei mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt und über eine Abzweigung im pulmonalarteriellen Schenkel des Schlauchsystems an einen elektromechanischen Druckwandler angeschlossen. Das elektrische Drucksignal wurde verstärkt und durch einen XY-Schreiber sowie zeitgleich mittels einer speziellen Software auf einem Personal-Computer registriert.

Das Perfusat wurde durch eine Thermopumpe auf 38,5 °C erwärmt. Dieses erfolgte durch doppelwandige, von der Temperierflüssigkeit durchströmte Reservoirgefäße und einen an den Membranoxygenator gekoppelten Wärmeaustauscher. Die Wärme- und Feuchtigkeitsverluste an der Lungenoberfläche wurden durch ihre Integration in einen ebenfalls erwärmten und abgedeckten Trog minimiert. Ein Kühlgerät (Frigomix) senkte die Perfusatemperatur auf die für die initialen Präparationsschritte notwendigen 4 °C. Das gesamte Füllvolumen des Perfusionssystems betrug 350 ml.

Die Perfusion erfolgte mit einem synthetischen sterilen Perfusionsmedium (Krebs-Henseleit-Puffer, Serag Wiessner AG) mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl 125,0 mM
- KCl 4,0 mM
- CaCl<sub>2</sub> 2,4 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM
- MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM
- Glucose 5,3 mM

Der pH-Wert des Perfusates wurde durch die Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> vor und während des Versuches im Bereich zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt und dann konstant gehalten. Die Perfusion erfolgte initial mit einem Volumenfluss von 10 ml/min, der parallel zur Erwärmung des Organs auf 150 ml/min gesteigert wurde. Nach dem Erreichen der angestrebten Perfusionsgeschwindigkeit und Perfusatemperatur erfolgte eine Beobachtungsperiode. Nur Lungen, die über einen Zeitraum von mindestens 20 Minuten Druck- und Gewichtsstabil waren, wurden in die Untersuchungen aufgenommen (*steady state periode*).

Die Ventilation der Lunge wurde mit einer Kleintierbeatmungspumpe durchgeführt. Als Beatmungsparameter wurden 30 ml Tidalvolumen, 30 min<sup>-1</sup> Beatmungsfrequenz und ein positiv endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule eingesetzt. Die der Pumpe zugeführten Atemgase entsprachen in ihrer Zusammensetzung (alle Angaben in Volumenprozent):

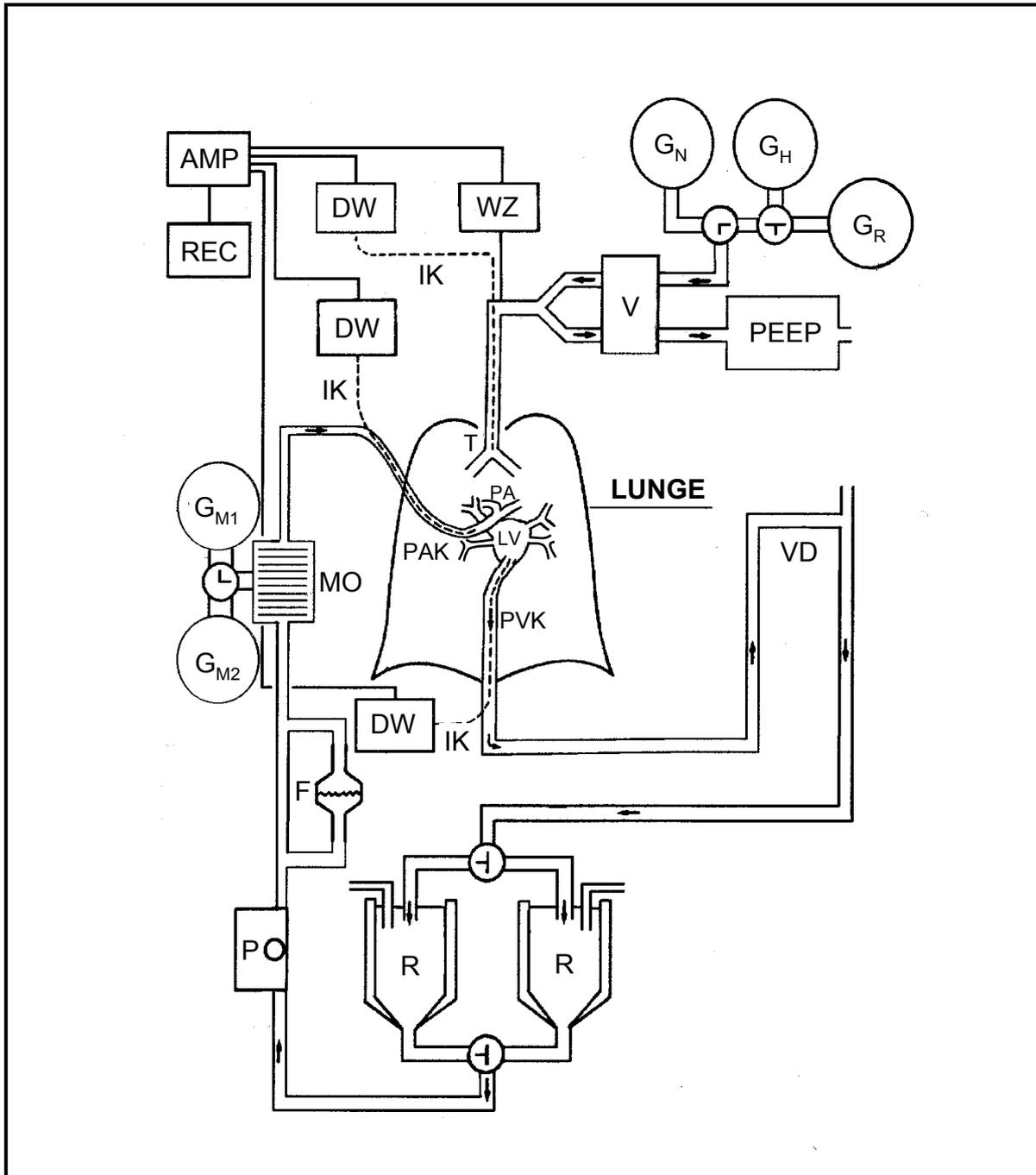
- Raumluft (G<sub>R</sub>)
- Konstantes normoxisches Gasgemisch (G<sub>N</sub> = 21,0 % O<sub>2</sub>; 5,3 % CO<sub>2</sub>; 73,7 % N<sub>2</sub>)
- Hypoxisches Gasgemisch aus Gasmischanlage (G<sub>H</sub> = 3,0 % O<sub>2</sub>; 5,3 % CO<sub>2</sub>; 91,7 % N<sub>2</sub>)
- Initiales Gasgemisch aus Gasmischanlage für gekühlte Präparationsschritte (21,0 % O<sub>2</sub>; 4,0 % CO<sub>2</sub>; 75,0 % N<sub>2</sub>)

Durch eine besondere Gasventilinstallation war der schlagartige Wechsel der Beatmungsgase und die Versorgung der Lunge mit differenten Gasen innerhalb von wenigen Sekunden möglich.

Der verwendete Membranoxygenator ist ein Experimentalprodukt, das in modifizierter Form bei kardiochirurgischen Eingriffen verwendet wird. Seine Gasaustauschfläche beträgt 0,7 m<sup>2</sup>, Flüssigkeits- und Gaskompartimente sind durch eine dünne diffusible Silikonmembran voneinander getrennt. Das Gerät wurde auf Flüssigkeitsseite mit einer Volumenstromstärke

von 150 ml/min betrieben, auf der Gasseite mit einem Gasfluss von 800 ml/min bei einem Gasüberdruck von 4 hPa relativ zum atmosphärischen Druck. Eine vollständige Equilibrierung der Gaspartialdrücke im Perfusat mit denen des Oxygenatorgases war dadurch gesichert. Die Gasspeisung des Membranoxygenators zur Definition der „gemischtvenösen“ Gaspartialdrücke in dem pulmonalarteriellen Perfusionsmedium erfolgte über eine zweite Mischkammer der Gasmischanlage. Das Membranoxygenatorgas wurde anhand von stromab des Oxygenators entnommener und mittels eines Blutgasanalysegerätes gemessener Perfusatproben optimiert. Die so eingestellten physiologischen „gemischtvenösen“ Gaspartialdrücke betragen 40 mmHg O<sub>2</sub> und 40 mmHg CO<sub>2</sub>.

Die schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abb. 1 gezeigt.



**Abb. 1:** Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der HPV an der isolierten Kaninchenlunge in schematischer Darstellung. AMP=Meßverstärker; DW=elektromechanischer Druckwandler; F=Filter;  $G_{M1}+G_{M2}$ =Gasmischkammern zur Begasung des Membranoxygenators;  $G_N+G_H+G_R$ =Gasgemische zur Ventilation der Lunge, Indizes: N=normoxisches Gasgemisch, H=hypoxisches Gasgemisch, R=Raumluft; IK=Innenkatheter; LV=linker Ventrikel; MO=Membranoxygenator; P=Peristaltikpumpe; PA=Pulmonalarterie; PAK=pulmonalarterieller Katheter; PVK= pulmonalvenöser Katheter; PEEP=positiv endexpiratorischer Druck; R=Reservoirgefäß für Perfusionsmedium; REC=Schreiber und Personalcomputer zur Registrierung der gemessenen Parameter; T=Trachea; V=Ventilator; VD=Vorrichtung zur Regulation des pulmonalvenösen Druckniveaus. Pfeile geben Flussrichtung des Perfusionsmediums und der Gase an. Detaillierte Beschreibung im Text.

### 3.1.3 Präparation der isolierten Lunge

Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 2,5 und 3,5 kg und einem Alter zwischen vier und fünf Monaten wurden mit einem Gemisch aus Ketanest<sup>®</sup> und Rompun<sup>®</sup> (im Verhältnis 3:2) analgosediert und mit Heparin à 1000 I.E./kg Körpergewicht antikoaguliert. Die Injektion erfolgte mittels Venenpunktionsbesteck in die bei jedem Kaninchen vorhandene Ohrdrainvene. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Relaxation bei erhaltener Spontanatmung des Tieres wurde die ventrale Halsregion durch die Injektion von 2%igem Xylocain<sup>®</sup> etwa 3 cm unterhalb des Larynx lokal anästhesiert. Danach konnte die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Präparieren unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus mobilisiert werden. Auf Tracheotomie folgte die endotracheale Kanülierung und die Fixation der Kanüle durch Ligatur. Die Beatmung mit 30 ml Hubvolumen bei einer Frequenz von 30 min<sup>-1</sup> erfolgte initial mit Raumluft und einem endexpiratorischen Druck von 1 cm H<sub>2</sub>O. Bei nun gesicherter maschineller Beatmung wurde die Narkose über 10 min. bis zur für die weitere Präparation notwendige Analgesie unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz vertieft.

Daraufhin wurde die Haut durch schonend ausgeführte Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert. Über eine Inzision im Epigastrium erfolgte die Oberbauchlaparotomie, der Processus xiphoideus wurde mittels chirurgischer Klemme kontrolliert und das Abdomen durch Scherenschnitte entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas breit eröffnet. Nach stumpfer Lösung des Diaphragmas vom Sternum gelang die Eröffnung beider Pleurahöhlen ohne Lungenläsion. Es folgte die mediane Sternotomie und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes. Im nächsten Schritt wurde das Perikard eröffnet sowie Aorta und A. pulmonalis mit je einem Faden angeschlungen.

Daraufhin wurde die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 4 % CO<sub>2</sub> umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit bikarbonatgepuffertem Perfusionsmedium zu erreichen. Nach Inzision in das schlagende rechte Ventrikelmyokard folgte das sofortige Einbringen und Fixieren des pulmonalarteriellen Katheters (Innendurchmesser (= ID) 4 mm) ohne Unterbrechung der Lungenperfusion. Der Katheter war mit 4 °C kaltem Perfusat blasenfrei gefüllt vorbereitet, die Perfusion begann sofort mit einem Fluss von ca. 10 ml/min. Mit der beschriebenen Technik konnten Luftembolien in die pulmonale Strombahn verhindert werden. Unmittelbar nach Fixierung des pulmonalarteriellen Katheters wurde die linksventrikuläre Herzspitze mit *einem* Scherenschnitt reseziert, damit sich kein Abflusswiderstand aufbauen konnte, der zur

Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit konsekutivem Lungenödem hätte führen können. Danach erfolgte die Ligatur der Aorta proximal des Koronararterienabganges mittels des liegenden Fadens. Die Lunge war somit perfusions- und ventilationsseitig vollständig vom Tierkörper isoliert.

### **3.1.4 Integration des Organs in das Meßsystem**

Nach Ligatur und davon distaler Durchtrennung der Vena cava inferior und superior sowie der Aorta konnte das Herz-Lungen-Paket unter vorsichtiger Lösung des mediastinalen Bindegewebes atraumatisch explantiert werden und auf einem speziellen Präparationsgestell weiter vorbereitet werden. Reste des mediastinalen Bindegewebes wurden entfernt. Das linke Herzhorn wurde ligiert, um schwankende Druckverhältnisse zu verhindern. Die Fixation eines in den linken Ventrikel eingeführten Katheters ( $\emptyset = 8$  mm) erfolgte mit einer intramyocardialen Tabaksbeutelnaht. Damit konnte zur vollständigen Integration der Lunge in das Perfusionssystem das Schlauchsystem geschlossen werden. Nach Sicherung aller Verbindungen wurde die Lunge an der Wägezelle hängend in einem temperierten Trog platziert. Bei kontinuierlicher Registrierung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), pulmonalvenösen Druckes (PVP), Ventilationsdruckes (VP) und der Lungenmasse erfolgte die stetige Steigerung des Perfusionsflusses auf 150 ml/min und der Temperatur auf 38,5 °C über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten. Bei einer Temperatur von 30 °C wurde der CO<sub>2</sub>-Anteil des Atemgases auf 5,3 % erhöht, um der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes im verwendeten Bikarbonat/CO<sub>2</sub>-Puffersystem Rechnung zu tragen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die PEEP-Beatmung begonnen. Das Perfusionssystem wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht-rezirkulierend betrieben, das aus der Lunge austretende Perfusat von etwa einem Liter Volumen verworfen. Auf diese Periode des weitgehenden Freispülens der Lungenstrombahn von Blutresten folgte die Rezirkulationsphase über die gesamte Versuchsdauer ohne Austausch des Perfusionsmediums.

Der Nullpunkt der Druckwandler wurde vor jedem Versuch auf der Höhe des Lungenhilus gegen atmosphärischen Druck abgeglichen, eine Kontrolle der Eichung des gesamten Meßsystems erfolgte 14-tägig mit einem Eichgerät nach Prof. Dr. O. H. Gauer. Der pulmonalvenöse Druck wurde auf 2 mmHg eingestellt, um expiratorisch Zone III-Bedingungen nach West (5) in allen Lungenarealen zu garantieren.

Einschlusskriterien der Lungen zur Verwendung im Versuch waren eine homogene, nach Ausspülen des Blutes weiße Oberfläche ohne sichtbare Atelektasen, Druck- und Gewichtskonstanz während des *steady-state*, Einhaltung der Normwerte für Perfusions- (4 - 8 mmHg) und Beatmungsdruck (6 - 11 mmHg) sowie vollständige Dichtigkeit des Schlauchsystems und der Verbindungsstellen zwischen diesem und dem Organ.

### **3.1.5 Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems**

Vor jedem Versuch wurde das System mit 4 Liter steriler Kochsalzlösung (0,9%) und anschließend 2 Liter sterilem Perfusionsmedium nicht-rezirkulierend durchspült. Während des Spül- und Füllungsvorganges wurden alle Luftblasen aus dem System entfernt. Das blasenfreie System rezirkulierte unter laufender Kühlung auf 4 °C über 45 Minuten (bis zum Ende der Tierpräparation) mit einem in den Perfusatfluss eingeschalteten endotoxinbindenden Filter (Perfusatfilter Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm), der entsprechende Partikelfreiheit sicherstellte.

Die Reinigung nach jedem Experiment bestand aus mehrfacher gründlicher Spülung des gesamten Perfusionssystems bei 60 °C unter Zugabe eines Detergens, abschließend mehrfacher Spülung mit demineralisiertem Wasser und Trocknen durch Ausblasen mit Druckluft.

Die Membranoxygenatoren wurden 2 Stunden lang mit insgesamt 5 Liter auf 80 °C erhitztem sterilem Aqua destillata gereinigt, und konnten so in bis zu 4 Experimenten Verwendung finden.

## **3.2 Experimentelle Modi zur Untersuchung der HPV**

### **3.2.1 Experimente mit hypoxisch- oder U46619-induzierten Vasokonstriktionen**

#### **3.2.1.1 Grundlagen**

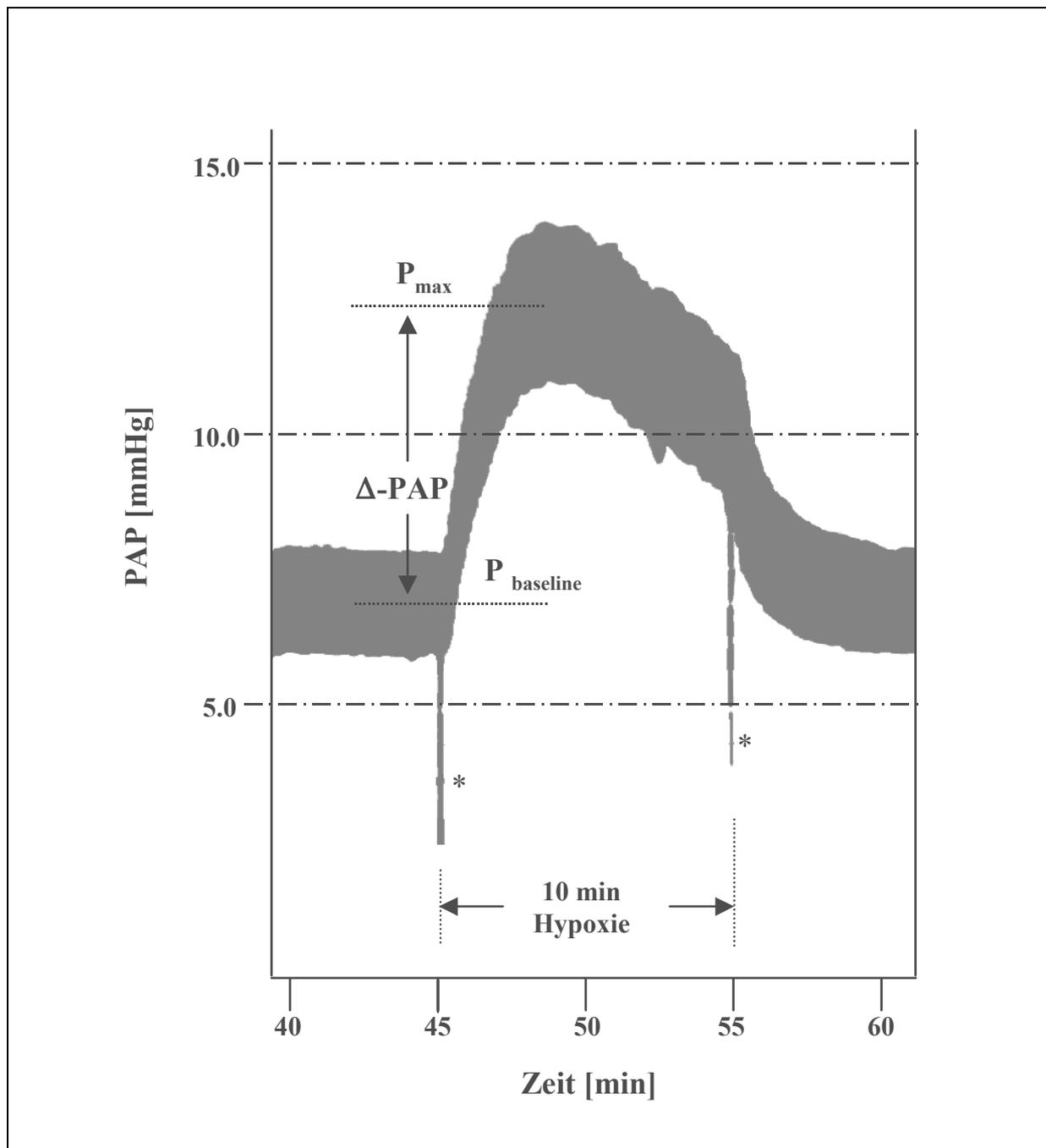
Die Etablierung eines geeigneten Modus zur Untersuchung der HPV an dem verwendeten experimentellen Aufbau geht auf Weissmann et al. (37) zurück.

Nach der initialen 20minütigen steady-state Phase wurden die Lungen im Rhythmus sequentieller Hypoxien (3 % O<sub>2</sub>) von 10 Minuten Dauer, unterbrochen durch normoxische Beatmung (21 % O<sub>2</sub>) von 15 Minuten Dauer, ventiliert. Die Lungen zeigten unter diesem Beatmungszeitmuster exzellent reproduzierbare hypoxische Vasokonstriktionen über einen Zeitraum von bis zu sechs Stunden (37).

Die Effekte der verschiedenen untersuchten pharmakologischen Agenzien auf den pulmonalarteriellen Druckanstieg (Abb. 2) wurden anhand solcher repetitiver hypoxischer pulmonaler Vasokonstriktionen untersucht. Das Ausmaß der zweiten HPV eines jeden Experiments diente als relative Referenzgröße (100 %) für die folgenden, pharmakologisch beeinflussten Vasokonstriktionen. Die Zugabe der Agenzien erfolgte ab der dritten Hypoxie jeweils genau fünf Minuten vor Beginn der hypoxischen Beatmungsphase. Durch Erhöhung der Konzentration der Agenzien im Perfusionsmedium vor jeder weiteren, resp. vor jeder zweiten Hypoxie, konnten kumulative Dosis-Wirkungskurven evaluiert werden. Die maximale Versuchslänge umfasste 15 hypoxische Vasokonstriktionen. Es wurden zu jedem experimentellen Ansatz vier Versuche gleichen Typs durchgeführt.

Zum Beweis der Spezifität der Wirkungen der Agenzien für den Sensor oder den daran gekoppelten Signaltransduktionsweg der HPV wurden in weiteren Experimenten vergleichbare Druckstimuli mit dem stabilen Thromboxan-Analogon U46619 ausgelöst und einer identischen pharmakologischen Dosisreihe unterzogen. Die Applikation dieses Vergleichspräparates erfolgte als schnelle Bolusinjektion über den Injektionsstopfen in den pulmonalarteriellen Schenkel direkt vor der Lunge. Der Zeitrhythmus war zu den HPV-Experimenten analog: alle 25 Minuten erfolgte eine U46619-Bolusinjektion (vergleichbar dem Beginn hypoxischer Beatmung alle 25 Minuten), die Zugabe der Agenzien fünf Minuten vor Bolusinjektion. In diesen Versuchen mit pharmakologisch ausgelösten Vasokonstriktion wurde durchgehend mit 21 % O<sub>2</sub> ventiliert. Die Bolusinjektion erfolgte mit definiertem konstantem Volumen mittels 100 µl Glasspritze. Die verwendete standardisierte Lösung von U46619 (9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymethanoprostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) resultierte aus einer tiefgefrorenen Stammlösung in DMSO, die direkt vor dem Experiment im Verhältnis 1:1 mit Perfusionsmedium verdünnt wurde. Die einmalige Bolusgabe resultierte in einer U46619-Perfusatkonzentration von 0,5 nM. Das injizierte Volumen betrug 77 µl bei 350 ml rezirkulierendem Perfusatvolumen. Die Auswertung der U46619- $\Delta$ -PAP-Daten erfolgte analog den HPV-Versuchen. Das Ausmaß der Druckanstiegsdifferenz des zweiten Druckstimulus diente als 100%-Referenz für die folgenden Vasokonstriktionen eines jeden Experiments.

Die identischen Analysemethoden erlaubten den direkten, auch statistischen Vergleich der durch Hypoxie sowie durch U46619 ausgelösten Vasokonstriktionen.

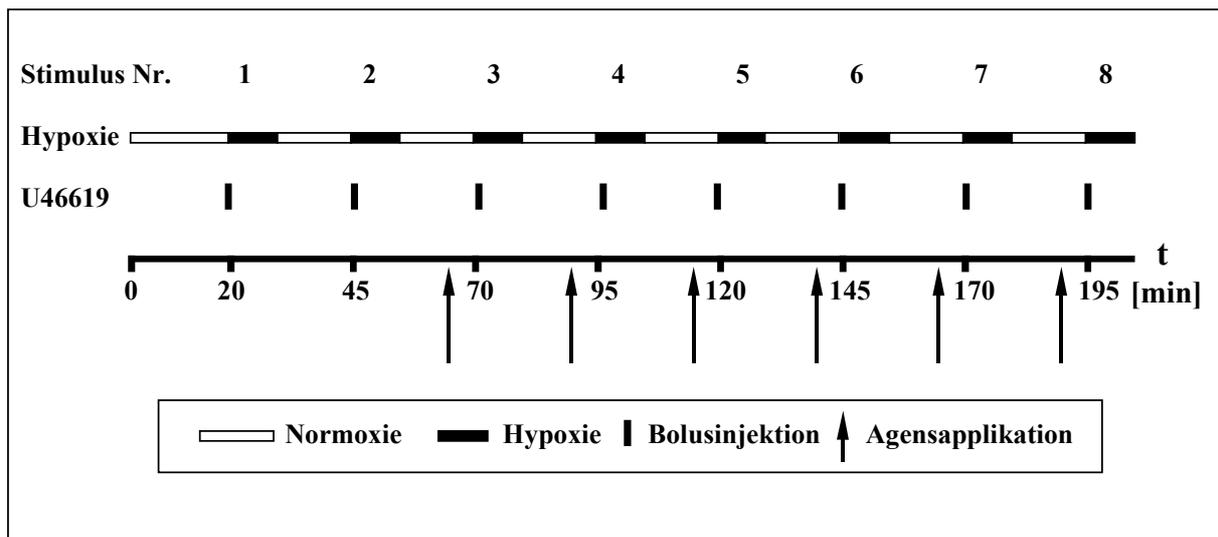


**Abb. 2:** Originalaufzeichnung des arteriellen Druckverlaufes einer hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. Eingezeichnet sind die arterielle Druckanstiegsdifferenz ( $\Delta\text{-PAP}$ ) zwischen Basisdruck ( $P_{\text{baseline}}$  = normoxischer PAP) und Maximaldruck ( $P_{\text{max}}$ ). Der pulmonalarterielle Druck steigt wenige Sekunden nach Zuführen des hypoxischen Gasgemisches an, durchläuft ein transientes Maximum und fällt danach auf ein Druckniveau ab, welches deutlich über dem Ausgangsdruck liegt. Die Abszisse zeigt die Versuchsdauer in Minuten an, die Ordinate skaliert den pulmonalen Druck in mm Hg. \*=Manuell gesetzte Markierungen zu Beginn und Ende der hypoxischen Beatmungsphase.

### 3.2.1.2 Applikation der Agenzien

Das Standard-Versuchsprotokoll sah zwei initiale hypoxische Vasokonstriktionen im Hypoxie-/Normoxie-Rhythmus von 10min/15min nach Abschluss der 20minütigen steady-state-Phase vor. Die pulmonalarterielle Druckanstiegsdifferenz ( $\Delta$ -PAP) der zweiten HPV wurde als relative 100%-Referenzgröße für die Beurteilung nachfolgender Druckreaktionen unter Agenzienapplikation genutzt. Die Applikation der Agenzien erfolgte kontinuierlich über den Zeitraum einer vollständigen Perfusatzirkulation in ein Reservoirgefäß, um eine homogene Konzentrationsverteilung zu gewährleisten. Die Applikation war fünf Minuten vor dem Beginn der folgenden Hypoxieperiode abgeschlossen. Die Konzentrationsangaben entsprechen immer der kumulierenden molaren Konzentration der Agenzien.

Analog dazu erfolgte die Applikation des Agens bei Versuchen mit U46619-vermittelten Druckanstiegen ab dem dritten Stimulus jeweils fünf Minuten vor der folgenden Bolusinjektion (siehe Abb. 3a und 3c, S. 32).



**Abb. 3a:** Experimenteller Modus zur Differenzierung spezifischer Signaltransduktionswege der HPV.

Zur Untersuchung biochemischer Mechanismen der HPV wurden nach initialer steady-state-Phase von mindestens 20 Minuten zwei verschiedene Versuchsmodi angewendet:

1. Alternierend hypoxisch-/normoxische Beatmung im Rhythmus von 10 Minuten Hypoxie (schwarze Balken in Abb. 3a und 3c) und 15 Minuten Normoxie (weiße Balken in Abb. 3a und 3c).

2. Repetitive Bolusinjektionen von U46619 (senkrechte Balken in Abb. 3a und 3c) in Abständen von 25 Minuten, vergleichbar dem Rhythmus des Hypoxiemodus.

Die Ventilation bei Modus 2 erfolgte mit normoxischem Gas über die gesamte Versuchsdauer. Zeitpunkte möglicher Agensapplikationen sind durch Pfeile gekennzeichnet und liegen jeweils fünf Minuten vor dem nachfolgenden vasokonstriktorischen Stimulus. Die Stimuli 1 und 2 dienten der Kontrolle des Mechanismus im aktuellen Experiment, die Druckanstiegsdifferenz bei Stimulus 2 wurde als Referenzreaktion für die folgenden Stimuli als 100% zugrunde gelegt.

### **3.2.1.3 Kontrollexperimente**

Um statistisch verwertbare Schlussfolgerungen aus einer Amplifikation oder Inhibition der pulmonalvaskulären Druckerhöhung durch eingesetzte Agenzien ziehen zu können, wurden identische Kontrollexperimente ohne Applikation der zu untersuchenden Substanz, wohl aber deren Lösungsmittels durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden je nach Löslichkeit der Substanz das Perfusionsmedium, Aqua destillata, sterile isotonische Natriumchlorid-Lösung oder Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die Lösungsmittel Aqua destillata, sterile isotonische Natriumchlorid-Lösung und DMSO wurden im Kontrollversuch zum gleichen Zeitpunkt und in der gleichen Menge wie in den korrespondierenden Versuchen mit Agenzieneinsatz appliziert. War die Substanz in Perfusionsmedium solubel, so wurde 5 Minuten vor dem Applikationszeitpunkt eine entsprechende Menge Perfusat dem rezirkulierenden System entnommen, und zum Applikationszeitpunkt mit gelöstem Agens wieder zugeführt.

### **3.2.1.4 Evaluierung der Effekte der applizierten Substanzen**

Der Einsatz eines in seiner Auswirkung auf die HPV oder nicht-hypoxische Druckstimuli unbekanntes Agens begann mit einem sogenannten „Dosisfindungsversuch“. Dabei wurde in einem Experiment mit repetitiven Hypoxien das zu untersuchende Agens nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll, beginnend mit einer unter der erwarteten Wirkdosis liegenden Konzentration, appliziert. Die Konzentration wurde in den folgenden

kumulierenden Konzentrationsschritten um jeweils eine Zehnerpotenz gesteigert. Der so erhaltene Wirkungsbereich des Agens wurde in weiteren Versuchen sukzessive auf die später verwendete Dosisreihe eingegrenzt. Zur Kontrolle der Auswirkungen des Agens dienten nach gleichem Muster durchgeführte Kontrollexperimente (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Das weitere Vorgehen orientierte sich an den möglichen Ergebnissen.

- 1) Agenzien, die keine signifikante Amplifikation oder Inhibition der HPV im Vergleich zu HPV-Kontrollexperimenten hervorriefen, wurden durch Wiederholungsexperimente in ihrer Aussage gesichert. Diese Agenzien wurden darüber hinaus aber nicht mit einem pharmakologischen Vasokonstriktor untersucht.
- 2) Stellte sich heraus, dass das untersuchte Agens eine signifikante Amplifikation oder Inhibition der hypoxischen Vasokonstriktion im Vergleich zu Kontrollexperimenten erzeugte, so wurde die Spezifität dieser Substanzeigenschaft für die Regulation des HPV-Mechanismus durch den Einsatz des Agens in n=4 U46619-Experimenten überprüft. Die Anfertigung von n=4 gleichartigen Experimenten erfolgte unabhängig von der ersten Einschätzung, z.B. nach n=1 Versuch, ob die geprüfte Substanz ein spezifischer Inhibitor oder Amplifikator der HPV war.

Stellte sich heraus, dass die untersuchte Substanz spezifisch in die Regulation der HPV eingreift, erfolgte die Ermittlung der substanzeigenen Effekte auf den Basisdruck in separaten Experimenten mit durchgehend normoxischer Beatmung und Hemmung der NO-Synthetase und Zyklooxygenase mittels L-NMMA- und ASA-Applikation.

Die HPV-, U46619-, Basisdruck- und Kontrollexperimente wurden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt.

### **3.2.1.5 Auswertung und Präsentation der Daten**

Der absolute pulmonalarterielle Druckanstieg ( $\Delta$ -PAP) des zweiten vasokonstriktorischen Stimulus jedes Experimentes wurde als 100%- $\Delta$ -PAP-Referenz für die folgenden Druckanstiege definiert. Die erste HPV eines jeden Experiments war als Referenzgröße nicht geeignet, da sie in Bezug auf die folgenden Druckanstiege des Versuchs zu relativ starken

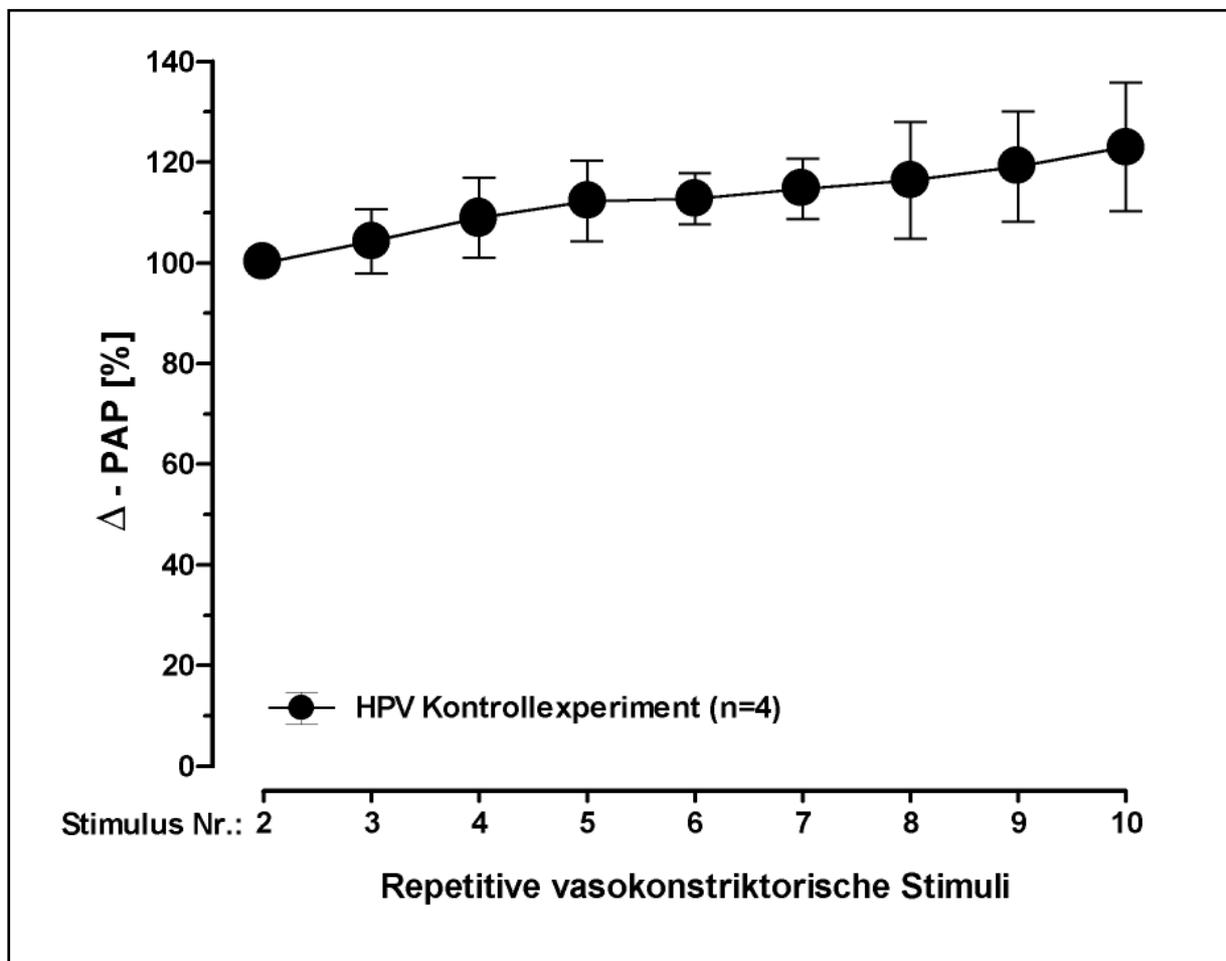
Schwankungen neigte. Die prozentuale Stärke der folgenden Vasokonstriktionen ergab sich aus dem Quotienten des Absolutwertes des jeweiligen  $\Delta$ -PAP und des Absolutwertes des Referenz- $\Delta$ -PAP. Aus den prozentualen Werten des  $\Delta$ -PAP bei gleichen Agenskonzentrationen der n=4 gleichen Experimente wurden Mittelwert (MW), Standardabweichung und *standard error of the mean* (SEM) ermittelt (siehe Tabelle 1). Durch dieses Vorgehen der Normierung wurde der zu beobachtenden individuellen Schwankung der HPV-Stärke unterschiedlicher Lungen Rechnung getragen.

Hypoxie Nr.	Experiment 1 $\Delta$ PAP [ mm Hg ]	Experiment 2 $\Delta$ PAP [ mm Hg ]	Experiment 3 $\Delta$ PAP [ mm Hg ]	Experiment 4 $\Delta$ PAP [ mm Hg ]	Mittelwert $\pm$ SEM $\Delta$ PAP [mm Hg]	Standard- Abweichung [mm Hg]
1	3,1	2,7	3,1	2,0	2,7 $\pm$ 0,3	0,5
2	2,8	3,0	2,5	1,8	2,5 $\pm$ 0,3	0,5
3	2,4	3,4	2,8	1,9	2,6 $\pm$ 0,3	0,6
4	2,4	3,4	3,0	2,1	2,7 $\pm$ 0,3	0,6
5	2,5	3,4	3,1	2,2	2,8 $\pm$ 0,3	0,5
6	2,8	3,3	3,1	2,1	2,8 $\pm$ 0,3	0,5
7	3,1	3,0	3,0	2,3	2,9 $\pm$ 0,2	0,4
8	3,0	2,7	3,1	2,6	2,9 $\pm$ 0,1	0,2
9	3,1	2,8	3,2	2,6	2,9 $\pm$ 0,1	0,3
10	3,5	2,6	3,4	2,6	3,0 $\pm$ 0,2	0,5
	[ % ]	[ % ]	[ % ]	[ % ]	[ % ]	[ % ]
1	110,7	90,0	124,0	111,1	<b>109,0</b> $\pm$ <b>7,0</b>	14,1
2	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b> $\pm$ <b>0,0</b>	0,0
3	85,7	113,3	112,0	105,6	<b>104,2</b> $\pm$ <b>6,4</b>	12,8
4	85,7	113,3	120,0	116,7	<b>108,9</b> $\pm$ <b>7,9</b>	15,7
5	89,3	113,3	124,0	122,2	<b>112,2</b> $\pm$ <b>8,0</b>	16,0
6	100,0	110,0	124,0	116,7	<b>112,7</b> $\pm$ <b>5,1</b>	10,2
7	110,7	100,0	120,0	127,8	<b>114,6</b> $\pm$ <b>6,0</b>	12,0
8	107,1	90,0	124,0	144,4	<b>116,4</b> $\pm$ <b>11,6</b>	23,3
9	110,7	93,3	128,0	144,4	<b>119,1</b> $\pm$ <b>11,0</b>	22,0
10	125,0	86,7	136,0	144,4	<b>123,0</b> $\pm$ <b>12,8</b>	25,5

**Tab. 1:** Die Tabelle gibt exemplarisch die Einzeldaten von vier HPV-Kontrollexperimenten ohne Applikation eines Agens wieder. In der ersten Spalte sind die fortlaufenden Nummern der hypoxischen Druckstimuli angegeben. Für jedes Experiment sind in der oberen Tabellenhälfte die Absolutwerte des pulmonalvaskulären Druckanstiegs  $\Delta$ -PAP angegeben und in der unteren Hälfte die anhand der Referenzhypoxie normierten korrespondierenden prozentualen Werte. Die fettgedruckten prozentualen Mittelwerte und SEM der vier Experimente bildeten die Grundlage für die graphische Darstellung der Ergebnisse einer Versuchsreihe.

Die so gewonnenen Daten wurden graphisch in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Mit der Ordinate wurden die Mittelwerte des pulmonalarteriellen Druckanstiegs  $\Delta$ -PAP, beginnend mit der Referenz, prozentual dargestellt. Die Abszisse zeigt die Chronologie des Versuchs, die Zahlenangabe der sukzessiv erfolgenden Stimuli, sowie die eingesetzte kumulative Agenskonzentration (s. Abb. 3b).

Die Aussagekraft dieser graphischen Darstellung der zusammengefassten Daten war größer als die Angabe aller Einzeldaten oder Absolutwerte. Letztere werden jedoch an für die Interpretation relevanten Stellen angegeben.



**Abb. 3b:** Beispielhafte graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM (*standard error of the mean*) aus vier Hypoxiekontrollexperimenten. Die prozentualen Mittelwerte des pulmonalarteriellen Druckanstiegs  $\Delta$ -PAP sind beginnend ab dem zweiten (Referenz-) Stimulus aufgetragen. Die Fehlerbalken des SEM sind in folgenden Graphiken zur besseren Übersicht nur in eine Richtung (z.B. nach unten) abgebildet. Die Verbindungslinien dienen der besseren Orientierung bei zusammengehörigen Datenpunkten einer Versuchsreihe.

### 3.2.1.6 Statistik

Die Daten wurden in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben. Der statistische Vergleich mehrerer experimenteller Reihen basierte auf einer Varianzanalyse mit dem Student-Newman-Keuls-*post hoc*-Test bei Signifikanz. Auswertungen nur zweier Datenreihen wurden mit zweiseitigem t-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen.

## 3.2.2 Experimente ohne induzierte Vasokonstriktionen

### 3.2.2.1 Grundlagen

Die hypoxische Beatmung der Lunge löst, wie oben beschrieben, eine Amplifikation des pulmonalvaskulären Drucks aus. Es ist vorstellbar, dass eine wie auch immer geartete Substanz die gleichen Veränderungen des pulmonalvaskulären Drucks hervorrufen kann wie die hypoxische Beatmung. Die Einführung einer solchen Substanz in die Signaltransduktionskette zwischen Sauerstoffsensoren und glattmuskulärem Effektor, die zur Druckerhöhung führt, würde zu einer „Imitation“ der HPV führen. Eine nach Substanzapplikation erfolgende HPV würde hinter der bereits stattgefundenen Druckerhöhung „verschwinden“.

Aus dieser Überlegung heraus war es für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen, die sich als Inhibitoren der HPV zeigten, notwendig, zu prüfen, ob die beobachtete Hemmung der HPV nicht auf eine Erhöhung des Druckniveaus zurückzuführen ist, sondern durch eine alleinige Hemmung der HPV entstanden ist. Diese Differenzierung erfolgte mittels separater Experimente, in denen die Lungenpräparate nicht hypoxisch oder pharmakologisch induzierten Vasokonstriktionen unterlagen, sondern der pulmonale Druckverlauf bei durchgehend normoxischer Beatmung beobachtet wurde. Diese Experimente sind im folgenden auch als *Basisdruckexperimente* oder *Basis-PAP-Experimente* bezeichnet, der bei normoxischer Beatmung bestehende Vasotonus wird in der vorliegenden Arbeit auch *Basisdruck* genannt.

### 3.2.2.2 Applikation der Agenzien

In diesen Basis-PAP-Experimenten wurde zu Beginn des Versuches, d.h. unmittelbar nach Erreichen der Zieltemperatur des Perfusates und der Zielgeschwindigkeit des Perfusatsdurchflusses, 400  $\mu$ M L-NMMA und 1mM ASA zur Hemmung der NO- und Prostanoidsynthese dem Perfusat zugesetzt. Der Moment der Zugabe dieser beiden Substanzen markierte den Zeitpunkt  $t=0$ . Danach wurde die zu untersuchende Substanz mengen- und zeitgleich zu den Experimenten mit stimulierten Vasokonstriktionen dem Perfusat zugefügt, ohne dass die Substanzzugabe von einer stimulierten Vasokonstriktion gefolgt worden wäre. Die Zeitpunkte der Substanzzugabe waren im Einzelnen: (Substanzzugabe Nr. 1 bei)  $t=65'$ , (2)  $t=90'$ , (3)  $t=115'$ , (4)  $t=140'$ , (5)  $t=165'$ , (6)  $t=190'$ , (7)  $t=215'$ , (8)  $t=240'$ , (9)  $t=265'$ . Die Bestimmung der intraexperimentell vorhandenen PAP-Werte erfolgte ebenfalls zeitgleich zu den Experimenten mit induzierten Vasokonstriktionen, d.h. im Einzelnen unmittelbar vor den theoretisch stattfindenden stimulierten Vasokonstriktion ((Stimulus Nr.1 bei)  $t=20'$ , (2)  $t=45'$ , (3)  $t=70'$ , (4)  $t=95'$ , (5)  $t=120'$ , (6)  $t=145'$ , (7)  $t=170'$ , (8)  $t=195'$ , (9) bei  $t=220'$ , (10)  $t=245'$ , (11)  $t=270'$ , (12)  $t=295'$ , (13)  $t=320'$ , (14)  $t=345'$ , (15)  $t=370'$ ), sowie unmittelbar vor der Substanzzugabe (Zeitpunkte s.o.), bzw. fünf Minuten vor der dann theoretisch folgenden stimulierten Vasokonstriktion, auch wenn im Versuchsverlauf mit stimulierten Vasokonstriktionen keine Substanzzugabe vorgesehen war (Zeitpunkte s.o., zusätzlich also bei  $t=290'$ ,  $t=315'$ ,  $t=340'$ ,  $t=365'$ ). Im Unterschied zu den Versuchen mit stimulierten Vasokonstriktionen wurde kein PAP-Wert zum Zeitpunkt des Amplitudenmaximums erhoben. Substanzspezifische Einzelheiten werden bei der Besprechung der jeweiligen Substanz berücksichtigt.

### 3.2.2.3 Kontrollexperimente

In Kontrollexperimenten zu den Basisdruckuntersuchungen wurde zum Zeitpunkt  $t=0$  400  $\mu$ M L-NMMA und 1 mM ASA hinzugefügt. Dann folgte die Erhebung der PAP-Werte im Versuchsverlauf zu den oben angegebenen Zeitpunkten. Analog zu den Kontrollexperimenten mit stimulierten Vasokonstriktionen wurde auch hier zu den Zeitpunkten, zu denen im Versuch mit Substanzzugabe das Agens appliziert wurde, das jeweilige Lösungsmittel der betreffenden Substanz appliziert.

#### **3.2.2.4 Evaluierung der Effekte der applizierten Substanzen**

Eine Evaluierung im Sinne der Dosisfindung und die ergebnisabhängige Fortsetzung der Experimente wie für die *Experimente mit hypoxisch- oder U46619-induzierten Vasokonstriktionen* war für diese Art von Experimenten nicht notwendig. Die in diesen Experimenten eingesetzten Konzentration und gewählten Zeitpunkte der Applikation waren mit denen der *Experimente mit hypoxisch- oder U46619-induzierten Vasokonstriktionen* identisch. In entsprechenden Kontrollexperimenten wurde keinerlei Agens, mit Ausnahme von L-NMMA und ASA, hinzugefügt. Die Experimente mit Substanzapplikation und Kontrollexperimente wurden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Die Auswertung der Daten ist im folgenden Kapitel erklärt.

#### **3.2.2.5 Auswertung und Präsentation der Daten**

Die *interexperimentell* vorhandenen unterschiedlichen Basis-PAP-Werte zu den bestimmten Zeitpunkten machten eine Standardisierung der *intraexperimentell* erhobenen Rohdaten notwendig. Als Bezugspunkt wurde der PAP-Wert zum Zeitpunkt  $t=65'$  mit 0 mmHg gleichgesetzt. Die *intraexperimentell* erhobenen PAP-Werte zum Zeitpunkt  $t=x$  wurden auf diesen Bezugswert bezogen, so dass sich für jeden Zeitpunkt  $t=x$  ein bestimmter  $\Delta$ -PAP ergab, der ein negatives oder positives Vorzeichen tragen konnte. Aus den Einzelwerten des  $\Delta$ -PAP zum gleichen Zeitpunkt, resp. bei gleichen Agenskonzentrationen der  $n=3$ , resp.  $n=2$  gleichen Experimente wurden Mittelwert (MW) und *standard error of the mean* (SEM) ermittelt. Die so gewonnenen Daten wurden graphisch in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Mit der Ordinate wurden die Mittelwerte der Abweichung vom Referenzwert 0 mmHg bei  $t=65$  min als  $\Delta$ -PAP dargestellt. Die Abszisse zeigt die Chronologie des Versuchs in Minuten, sowie die eingesetzte kumulative Agenskonzentration.

#### **3.2.2.6 Statistik**

Die Untersuchung des Einflusses einer bestimmten Substanz auf den Basisdruckverlauf umfasste Versuche mit Substanzzugabe und Kontrollexperimente. Der statistische Vergleich

erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test. Statistische Signifikanz wurde für  $p \leq 0,05$  angenommen.

### **3.3 Detailbeschreibung der verwendeten Substanzen und ihr postuliertes Wirkprofil für die Differenzierung von Sensor- und Signaltransduktionsmechanismen der HPV**

Im folgenden werden die verwendeten Substanzen in Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes und ihrer postulierten Einflussnahme auf biochemische Prozesse dargestellt. Dieses umfasst die genauere Spezifikation, die Herstellung der Lösung der Substanz und die eingesetzten kumulativen Konzentrationen in einer stichpunktartigen Auflistung. Die experimentelle Anwendung der so aufgeführten Agenzien erfolgte nach dem oben beschriebenen Standardversuchsprotokoll. Davon abweichende Experimente und Protokolle werden ausführlicher beschrieben. Die jeweilige Anzahl (n) der durchgeführten Einzelexperimente wird im Ergebnisteil genannt.

Die differenzierte Diskussion und zugehörige Literaturangaben finden sich im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit.

#### **3.3.1 Untersuchungen zur NADPH-Oxidase**

##### **3.3.1.1 AEBSF**

Einsatz des NAD(P)H-Oxidase-Hemmstoffs *[4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid]* (AEBSF), Fa. Merck (München, Deutschland).

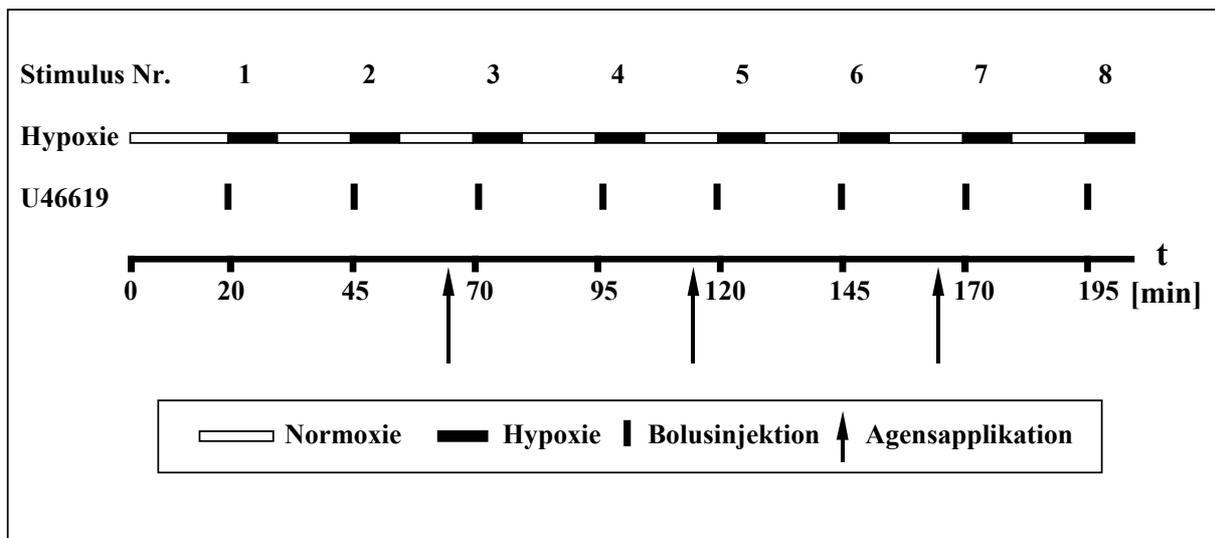
Molare Masse: 239,69

Lösungsmittel: Perfusionsmedium

Applizierte kumulierende Konzentrationen: 100  $\mu\text{M}$   
300  $\mu\text{M}$   
600  $\mu\text{M}$

### Besonderheiten:

Während der sogenannten Dosisfindungsversuche wurden nach Applikation von AEBSF transiente Vasokonstriktionen beobachtet. Diese waren zum Zeitpunkt der gemäß dem Standardversuchsprotokoll nach fünf Minuten folgenden induzierten Vasokonstriktion nicht abgeklungen. Das oben beschriebene Standardversuchsprotokoll wurde in der Art verändert, dass die Applikation von AEBSF nicht, wie für alle folgenden Substanzen beschrieben, fünf Minuten vor *jeder* weiteren stimulierten Vasokonstriktion nach der zweiten „Referenzhypoxie“, sondern vor jeder zweiten, d.h. vor der dritten, fünften und siebten induzierten Vasokonstriktion (siehe Abb. 3c) erfolgte. Das Muster der alternierend hypoxisch-normoxischen Beatmung, resp. die Applikation von U46619 in 25-minütigen Abständen wurde dabei nicht verändert. Die Versuche mit dem Agens AEBSF wurden nach der achten Hypoxie, resp. achten Applikation von U46619, beendet.



**Abb. 3c:** Experimenteller Modus zur Differenzierung spezifischer Signaltransduktionswege der HPV. Hier für AEBSF.

### 3.3.1.2 Aprotinin

Einsatz des Serinprotease-Hemmstoffs *Aprotinin* (Trasylol<sup>®</sup>), Fa. Bayer (Leverkusen, Deutschland).

Molare Masse: 6512

Lösungsmittel: Sterile isotonische Natriumchlorid-Lösung

Applizierte kumulierende Aktivität

(Angaben in Kallikrein-Inaktivator-Einheiten, KIE): 500 U/ml  
1000 U/ml  
2000 U/ml  
4000 U/ml  
6000 U/ml

### 3.3.1.3 PMSF

Einsatz des Serinprotease-Hemmstoffs *Phenylmethylsulfonylfluorid* (PMSF), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland).

Molare Masse: 174,2

Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid (DMSO)

Applizierte kumulierende Konzentrationen: 50  $\mu$ M  
500  $\mu$ M  
1000  $\mu$ M

### 3.3.2 Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Untersuchungen von vermuteten Transduktionsmechanismus der HPV unter dem Aspekt der  $O_2^{\bullet-}$ -Metabolisierung und  $H_2O_2$ -Generierung durch SOD.

#### 3.3.2.1 DETC

Einsatz der *Diethyldithiocarbaminsäure* (DETC), Fa. Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

Molare Masse: 225,3

Lösungsmittel: Aqua destillata

Applizierte kumulierende Konzentration: 100  $\mu$ M  
5 mM  
10 mM

#### 3.3.2.2 TETA

Einsatz des  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ -Chelators *Triethylentetraamin* (TETA), Fa. Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland).

Molare Masse: 219,16

Lösungsmittel: Aqua destillata

<u>Applizierte kumulierende Konzentration:</u>	1 mM
	3 mM
	5 mM
	7,5 mM
	10 mM
	20 mM
	25 mM

### 3.3.2.3 DFO

Untersuchungen des potentiellen Transduktionsmechanismus der HPV hinsichtlich der Bedeutung der *Fenton-Reaktion*:  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Fe}^{2+}$ , welches in  $\text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ , unter Oxidation des  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$ , zerfällt.

Einsatz des  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelators *30-Amino-3,14,25-trihydroxy-3,9,14,20,25-pentaazatriacontan-2,10,13,21,24-penton-methansulfonsäure* (Deferoxaminmesilat; DFO).

Molare Masse: 656,8

Lösungsmittel: Perfusionsmedium

<u>Applizierte kumulierende Konzentration:</u>	1 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{M}$
	100 $\mu\text{M}$
	1 mM
	5 mM
	10 mM

#### Besonderheiten:

Für diese Substanz wurde das Standardprotokoll erweitert: um der langen Wirklatenz dieses Chelators gerecht zu werden, wurde das Standardprotokoll bei gleichbleibender alternierender Abfolge der hypoxisch-normoxischen Beatmung auf 15 Hypoxien, resp. 15 U46619-Applikationen verlängert. Die sukzessive Konzentrationserhöhung bis 10 mM erfolgte bis zum Beginn der achten stimulierten Vasokonstriktion.

### 3.4 Messung des Einflusses von 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid (AEBSF) auf den NADPH-Oxidase-abhängigen *oxidative burst* von Alveolarmakrophagen der Kaninchenlunge\*

#### 3.4.1 Isolation von Alveolarmakrophagen und Messung des *oxidative burst*

Eine frisch isolierte Kaninchenlunge wurde über eine unter sterilen Bedingungen eingebrachte Trachealkanüle insgesamt 4 mal einer bronchoalveolären Lavage unterzogen. Die Lavageflüssigkeit bestand aus steriler, endotoxinfreier isotoner Kochsalzlösung, das eingesetzte Volumen betrug 4 mal 50 ml bei einer Volumen-Rückgewinnung von 180-190 ml. Zur Isolierung der Alveolarmakrophagen wurden das gepoolte Lavagevolumen bei Raumtemperatur 15 min bei 300 x g zentrifugiert, zweimal in Hank's HEPES Puffer gewaschen und resuspendiert. Die Alveolarmakrophagen wurden durch Giemsa- und Esterase-Färbung in jedem Experiment und durch randomisiert durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen identifiziert. Das Verhältnis der Makrophagen zu der Gesamtzahl der durch Lavage gewonnenen Zellen lag konsistent über 96%. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der kontaminierenden polymorphkernigen Neutrophilen in allen Präparationen bei < 1,5%. Die Aktivität der Zellen in Gegenwart des Stimulus wurde anhand der Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) geprüft. In allen durchgeführten Experimenten lag die Freisetzungsrates der LDH bei < 3%. Der *oxidative burst* wurde anhand der durch Superoxiddismutase inhibierbaren Reduktion des Cytochrom *c* gemessen (38). Zu diesem Zweck wurden Makrophagen in der Konzentration  $10 \times 10^6$  Makrophagen/ml mit 75  $\mu$ M Ferricytochrom *c* bei 37°C in der Ab- oder Anwesenheit von 10  $\mu$ g/ml Superoxiddismutase in zweifacher Ausführung inkubiert. Der „oxidative burst“ wurde durch die Hinzugabe von 2  $\mu$ M des Proteinkinase C-Aktivators Phorbolmyristataacetat (PMA), gelöst in DMSO, für 30 Minuten bei 37°C ausgelöst. AEBSF wurde den Experimenten am Lungenmodell entsprechend fünf Minuten vor der Auslösung der Stimulation hinzugefügt. Bei den Kontrolleexperimenten wurde nur das Lösungsmittel in gleicher Menge zugesetzt. Die Auswertung der Experimente mit AEBSF und PMA erfolgte im Verhältnis zu den durch PMA alleine ausgelösten Stimulationen.

---

\* Die Experimente zur Bestimmung des *oxidative burst* wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Frank Rose durchgeführt.

### 3.4.2 Evaluation des Einflusses von AEBSF auf den *oxidative burst*

Die Bestimmung des Einflusses des NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors AEBSF auf den „oxidative burst“ erfolgte durch Inkubation der Alveolarmakrophagen mit AEBSF in verschiedenen Konzentrationen (Dosisreihe, n=4) und dem Vergleich der resultierenden Fluoreszenzintensität mit derjenigen, die durch PMA erzeugt wurde.

Im „oxidative burst“ eingesetzte AEBSF-Konzentrationen:

0 $\mu\text{M}$
100 $\mu\text{M}$
300 $\mu\text{M}$
600 $\mu\text{M}$

### 3.5 Messung des exhalativen Stickstoffmonoxids (NO) unter Versuchsbedingungen

#### 3.5.1 Technik der *online*-Bestimmung des exhalativen NO

Die Technik wurde im Jahre 1995 an dem hier beschriebenen Modell der isolierten, artifiziell ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge etabliert und angewendet (17). Die zur Ventilation benutzte Kleintierbeatmungspumpe führte das inspiratorische und expiratorische Volumen streckenweise getrennt voneinander (siehe Kap. 3.1.2, S. 17, Abb. 1). Dies ermöglichte eine separate Untersuchung des expiratorischen Gasgemisches. Über eine luftdicht verschlossene Verbindung wurde kontinuierlich ein definierter Volumenanteil des expiratorischen Schenkels einem Chemilumineszenz-NO-Analysator (Sievers 280 NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA) zugeführt. Dieser quantifizierte das im Volumen gemessene NO in ppb (*parts per billion, vol/vol*). Die gemessenen Werte wurden nahezu zeitgleich von einem angeschlossenen analogen XY-Schreiber aufgezeichnet.

#### 3.5.2 Auswertung und Präsentation der Daten

Die *online*-Erfassung des exhalativen NO erfolgte für HPV- und U46619-Versuche mit DETC und TETA. Im *steady-state* wurde die basale NO-Freisetzung ermittelt; der Messzeitpunkt *t*

des *steady state* lag unmittelbar vor der ersten stimulierten Vasokonstriktion, d.h. am Ende eines jeden *steady state*. Alle angegebenen Werte geben die jeweilige mittlere NO-Freisetzung zum Zeitpunkt  $t$  an. Im Versuchsverlauf wurde ein Wert  $x_1$  unmittelbar vor jeder Zugabe von DETC, resp. TETA bestimmt sowie ein Wert  $x_2$  fünf Minuten später, d.h. unmittelbar vor dem Beginn einer Hypoxie, resp. vor der Zugabe von U46619. Dieses Wertepaar wurde der durch die Substanzzugabe erreichten kumulativen Konzentration im Perfusat zugeordnet:  $x \text{ [ppb]}_{y \text{ mM Agens}} = x_2 \text{ [ppb]} - x_1 \text{ [ppb]}$ .

Für die einer bestimmten kumulativen Agenskonzentration zugeordneten Werte wurden Mittelwert, SEM und SD errechnet. Die Ergebnisse wurden graphisch in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

In Kontrollexperimenten wurde nach dem gleichen Zeitschema verfahren, ohne dass dabei die Applikation von TETA oder DETC erfolgte.

### 3.6 Spektrophotometrische Messung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) aus homogenisiertem Lungengewebe

Alle angegebenen Arbeitsschritte, begonnen mit der Extraktion des Enzyms bis zur Auswertung der photometrisch gemessenen Daten, erfolgten gemäß der Anleitung zum Superoxiddismutase-Assay-Kit (CALBIOCHEM<sup>®</sup>; *Superoxide Dismutase Assay Kit*).

#### 3.6.1 Grundlagen

Superoxiddismutasen sind Metalloenzyme, die die Dismutation des Superoxid-Ions zu Sauerstoffstoff und Hydrogenperoxid nach der folgenden Reaktionsgleichung katalysieren:



Verschiedene Typen der SOD wurden beschrieben. Die verschiedenen Typen sind charakterisiert durch die Redox-aktiven Metalle im katalytischen Zentrum. So kann man zwischen Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, und Fe-SOD unterscheiden. Cu/Zn-SOD findet man in Eukaryoten, hauptsächlich im Zytosol und Nucleus als Dimer zweier identischer Untereinheiten mit einem Molekulargewicht ( $M_w$ ) von etwa 16 kDa (39). Fe-SOD ist ein Dimer zweier identischer Untereinheiten ( $M_w \approx 20$  kDa) und findet sich hauptsächlich in

Prokaryoten. Mn-SOD findet man in Eukaryoten und Prokaryoten; bei Eukaryoten in der Hauptsache mitochondrial, und Dimer identischer Untereinheiten ( $M_w \approx 20$  kDa) isoliert (39). Es ist bekannt, dass solche Enzyme dem Schutz vor  $O_2^{\bullet-}$  dienen und somit als essentiell für das Leben aerober Organismen gelten (40).

In der vorliegenden Arbeit wurde die inhibitorische Kapazität von DETC und TETA auf die Cu/Zn-SOD der nach Versuchsende homogenisierten Kaninchenlungen mit dem hier beschriebenen Assay getestet.

### 3.6.2 Versuchskomponenten und ihre Wirkungsweise

#### 3.6.2.1 Mitgelieferte Komponenten

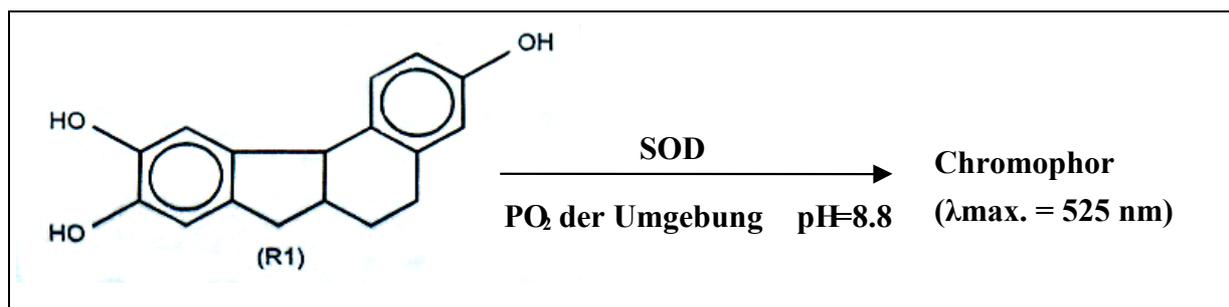
Das **Reagenz R1** war eine Lösung der chromogenen Substanz **R1** 5,6,6a,11b-Tetrahydro-3,9,10-Trihydroxybenzo[c]fluoren, 0,66 mM, in 32 mM HCl, und 0,5 mM Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA) und 2,5 % Ethanol.

Das **Reagenz R2** war eine Lösung des Mercaptan-Scavengers 1,4,6-Trimethyl-2-Vinylpyridinium, 33,3 mM, in 1 mM HCl.

Der **Puffer (Lösung 3)** 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol, 50 mM, enthält 3,3 mM Borsäure und 0,11 mM DTPA, pH = 8,8 (bei 37°C).

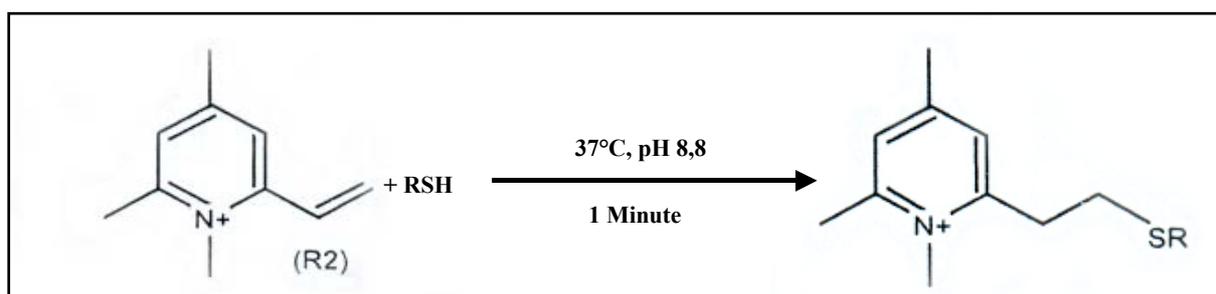
#### 3.6.2.2 Prinzipien des Assays

Die Autooxidation des Reagenz R1 (5,6,6a,11b-Tetrahydro-3,9,10-Trihydroxybenzo[c]fluoren) wird durch die SOD beschleunigt. Bei der Autooxidation entsteht ein Chromophor, welches sein Absorptionsmaximum  $\lambda_{max}$  bei 525 nm besitzt (siehe Abb. 5a).



**Abb. 5a:** Struktur des Reagenz R1 und Prinzip der Umwandlung in ein Chromophor. Abbildung aus dem Manual des SOD-Assay-Kit, Calbiochem®. Weitere Erläuterungen im Text.

Das Reagenz R2 (1,4,6-Trimethyl-2-Vinylpyridinium) eliminiert durch Mercaptane (R-SH), wie z.B. Gluthathione, verursachte Interferenzen in der zu bestimmenden Probe. (Anm.: eine „zu bestimmende Probe“ wird im folgenden Text auch als *sample* bezeichnet). R2 „fängt“ die Mercaptane mit einer schnellen Alkylierungsreaktion (siehe Abb. 5b).



**Abb 5b:** Eliminierung von Mercaptanen durch eine Alkylierungsreaktion mit dem Reagenz R2. Abbildung aus dem Manual des SOD-Assay-Kit, Calbiochem®.

### 3.6.3 Definition der Einheit „SOD-525“

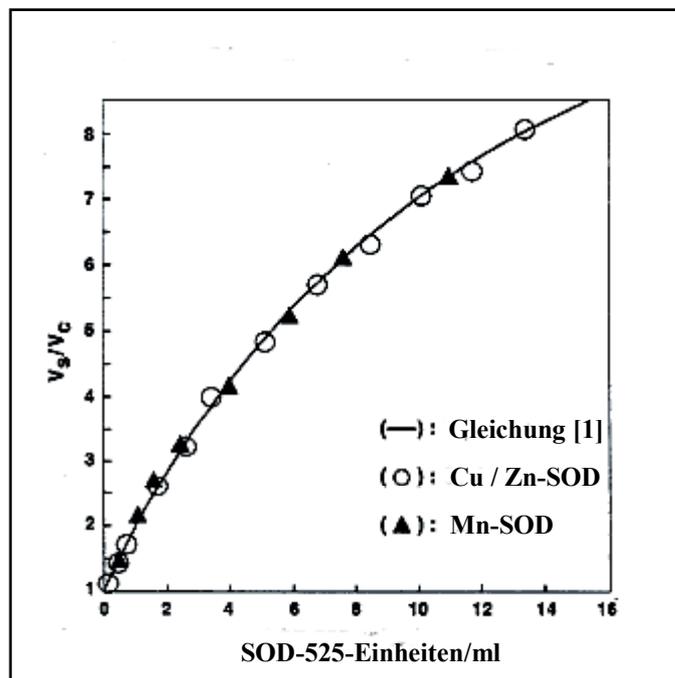
Die kinetische Messung der Absorptionsänderung bei 525 nm geschieht nach der Zugabe von R1 zum *sample*. Die SOD-Aktivität wird durch den Quotienten der Autooxidation gemessen in Gegenwart ( $V_s$ ) und in Abwesenheit ( $V_c$ ) von SOD bestimmt. Der  $V_s/V_c$ -Quotient als eine Funktion der SOD-Konzentration wird unabhängig vom Typ der SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD oder Fe-SOD) gemessen. Eine SOD-525-Aktivitätseinheit ist definiert als diejenige Aktivität, die die Autooxidationsrate der Kontrolle verdoppelt ( $V_s/V_c = 2$ ). Die Beziehung zwischen dem  $V_s/V_c$ -Quotienten beschreiben Gleichung 1 und Abbildung 5c:

Gleichung 1:

$$\frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{SOD}{\alpha (SOD) + \beta}$$

Wobei gilt:

- $V_s$  = Wert des *samples* mit SOD
- $V_c$  = Durchschnittswert der Kontrolle (SOD = 0)
- SOD = SOD-Aktivität im *sample* in SOD-525-Einheiten
- $\alpha$  = dimensionloser Koeffizient
- $\beta$  = Koeffizient in SOD-525-Einheiten



**Abb. 5c:**  $V_s/V_c$  als eine Funktion der SOD-Aktivität. Abb. aus dem Manual des SOD-Assay-Kit, Calbiochem®. Erläuterungen im Text.

### 3.6.4 Extraktion der Cu/Zn-SOD

Die Oberflächen der perfundierten Kaninchenlungen wurden unmittelbar nach Versuchsende mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt. Nach der Entfernung der noch vorhandenen Anteile des Herzens erfolgte die Lagerung des Lungenpräparates bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung. Nach dem Auftauen des Präparates wurde das in der Lunge enthaltene Wasser

atraumatisch manuell entfernt; anschliessend erfolgte die mechanische Homogenisierung in 0,25-molarer Saccharose-Lösung bei +4°C. Das Verhältnis des zur Untersuchung präparierten Stücks Lunge und der Saccharose-Lösung lag bei 1:10 (*Gewicht/Volumen*≈*weight/volume*≈*w/v*). Das so erhaltene Homogenat wurde bei 8500 x g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert (RC-5C, Sorvall® Instruments). Zu 250 µl des Überstandes wurden 400 µl eines Lösungsgemisches aus Ethanol und Chloroform [EtOH/CHCl<sub>3</sub> 62.5/37.5 (v/v)] in gläserne Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zugabe des Ethanol/Chloroform-Gemisches inaktivierte Mn- und Fe-SOD. Nach erneuter Zentrifugation (RPC Rotanta, Hettich) bei 3000 x g und 4°C für zehn Minuten konnte die oberste Flüssigkeitsschicht vorsichtig zur weiteren Analyse abpipetiert werden. Bis zur Messung des *samples* erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### 3.6.5 Spektrophotometrische Messung der Enzymaktivität

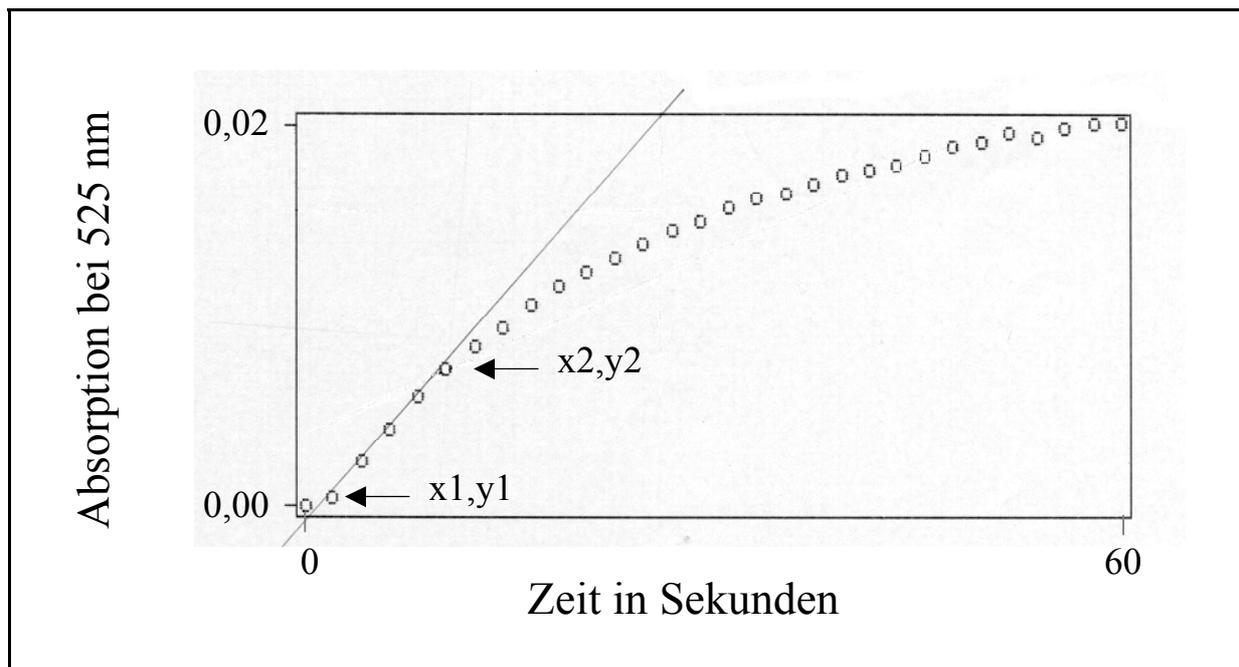
#### *Durchführung der Messung*

1. Der Puffer wurde in einem offen Behälter bei 37°C aufbewahrt und äquilibrierte auf diese Art mit der Umgebungsluft.
2. Das Spektrophotometer wurde mit deionisiertem Wasser bei 525 nm auf *Null* geeicht.
3. 900 µl Puffer wurden für Kontrollen wie *samples* in ein Teströhrchen gegeben
4. 40 µl der Kontrolle oder des *samples* wurden zum Puffer zugegeben.
5. 30 µl von R2 wurden in das Teströhrchen gegeben und für kurze Zeit gemischt.
6. Das Gemisch wurde für eine Minute bei 37°C inkubiert.
7. 30 µl von R1 wurden zum Gemisch hinzugefügt und für kurze Zeit gemischt.
8. Innerhalb von zehn Sekunden nach der Zugabe von R1 wurde das Reaktionsgemisch in eine spektrophotometrische Glasküvette überführt und mit der Aktivitätsmessung begonnen.
9. Ergebnis einer solchen Messung war eine Absorptionskurve als Funktion der Zeit (s. Abb 5d).

### 3.6.6 Berechnung der SOD-Aktivität

#### *Bestimmung der Absorptionsrate ( $\Delta A/s$ )*

Zunächst wurden für jede Kurve die zwei Punkte ( $x_1, y_1$  und  $x_2, y_2$ ) bestimmt, zwischen denen die maximale Anstiegsgeschwindigkeit der Kurve lag und sie nahezu linear verlief. (siehe Abb. 5d). Die Berechnung dieses durch die Punkte definierten Kurvenabschnittes  $z$  erfolgte nach der Gleichung  $z = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$ .



**Abb. 5d:** Originalabbildung. Bestimmung der Punkte  $x_1, y_1$  und  $x_2, y_2$  im linearen Bereich der maximalen Kurvenanstiegsgeschwindigkeit. Die Ordinate zeigt die Absorption bei 525 nm. Die Abszisse zeigt den zeitlichen Verlauf der Messung. In 60 Sekunden fanden 30 Messungen statt; das Messintervall betrug zwei Sekunden. Die Tangente im Bereich der maximalen Kurvenanstiegsgeschwindigkeit wurde manuell hinzugefügt. Weitere Erläuterungen im Text.

#### *Bestimmung des Quotienten $V_s/V_c$*

Zunächst wurden die Absorptionsraten für vier Kontrollen mit Aqua destillata anstelle eines *sample* ermittelt und der Mittelwert  $V_c$  berechnet. Es folgte die Bestimmung der  $V_s$  für jedes *sample* in randomisierter Reihenfolge. Der Quotient  $V_s/V_c$  musste  $> 1$  sein. Ein Quotient  $< 1$  hätte die Präsenz von Interferenzen bedeutet. Die Präzision dieser Methode war am größten im Bereich  $3 \leq V_s/V_c \leq 8$ .

### Bestimmung der SOD-Aktivität

Die als SOD-525 definierte Einheit entspricht dem Quotienten  $V_s/V_c = 2$ . Die Beziehung zwischen der relativen Angabe ( $V_s/V_c$ ) und SOD-525-Aktivität wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{\text{SOD}}{\alpha (\text{SOD}) + \beta}$$

Wobei gilt:  $V_s$  = Wert des *samples* mit SOD  
 $V_c$  = Durchschnittswert der Kontrolle (SOD = 0)  
SOD = SOD-Aktivität im *sample* in SOD-525-Einheiten  
 $\alpha$  = dimensionloser Koeffizient  
 $\beta$  = Koeffizient in SOD-525-Einheiten

Umformung der Gleichung ergibt:

$$\text{SOD} = \frac{0,93 (V_s/V_c - 1)}{1,073 - 0,073 (V_s/V_c)}$$

Wobei gilt:  $\alpha = 0,073$   
 $\beta = 0,93$   
 $V_s$  = Reaktionsrate des *samples* (mit SOD)  
 $V_c$  = Reaktionsrate der Kontrollen (ohne SOD), Mittelwert von vier Assays  
SOD = SOD-Aktivität in SOD-525-Einheiten

### 3.6.7 Statistische Auswertung

Die statistische Prüfung der gewonnenen Daten für die SOD-Aktivität auf Signifikanz erfolgte mit einem gepaarten t-Test.

## 4 Ergebnisse

Die sehr gute Reproduzierbarkeit der repetitiven hypoxischen Vasokonstriktionen im verwendeten Modell (37) ermöglichte den direkten Vergleich der Stärke der HPV in Kontrollversuchen mit derjenigen in Versuchen mit aufsteigenden Dosisreihen potentieller Aktivatoren oder Inhibitoren der HPV. Analog dazu konnten die durch repetitive Applikation von U46619 pharmakologisch ausgelösten pulmonalen Vasokonstriktionen sehr gut reproduziert werden. Diese Vergleichsstimuli und ihre Beeinflussung durch die zur Manipulation der HPV eingesetzten Agenzien ermöglichten erst die Differenzierung der Agenzien in HPV-Mechanismus-spezifisch oder -unspezifisch.

Die Ergebnisdarstellung wurde für die Untersuchung der NAD(P)H-Oxidase anhand des AEBSF sowie den Proteasehemmstoffen Aprotinin und PMSF besonders ausführlich gestaltet. Dies soll das Verständnis für die dargestellten Ergebnisse erleichtern und eine knappere Ausführung der folgenden Ergebnispräsentationen ermöglichen.

Die Anzahl sämtlicher Lungenexperimente betrug  $n=133$ , davon  $n=21$  Basisdruckexperimente. Es wurden nur diejenigen Lungen verwendet, die a) über die initiale *steady state periode* keine Gewichtseinlagerung aufwiesen und b) deren Gewichtsänderung im Versuchsverlauf nicht von in Kontrollexperimenten erhobenen Gewichtsänderungen abwich, es sei denn, dies ist im Text explizit angegeben. Der pulmonalarterielle Basisdruck (=normoxischer Vasotonus), gemessen vor dem ersten vasokonstriktorischen Stimulus, betrug  $5,0 \pm 0,1$  mmHg (MW  $\pm$  SEM,  $n=80$ ). Die rasche Auslösung einer hypoxischen Vasokonstriktion (hier angegeben für die 2. Hypoxie = Referenzhypoxie) mit 3%O<sub>2</sub> führte zuverlässig und schnell zu einer Steigerung des PAP um  $2,5 \pm 0,1$  (MW  $\pm$  SEM,  $n=48$ ), bei zu Beginn des Versuches unterbundener NO-Synthese durch 400  $\mu$ M L-NMMA zu einer Steigerung des PAP um  $7,0 \pm 0,5$  mmHg (MW  $\pm$  SEM,  $n=16$ ). Die Injektion von U46619 in den pulmonalarteriellen Katheter bewirkte einen Druckanstieg von  $2,7 \pm 0,3$  mmHg (MW  $\pm$  SEM,  $n=32$ ). Nach Applikation von L-NMMA führte das gleiche Manöver zu einem Druckanstieg von  $5,7 \pm 0,7$  mmHg (MW  $\pm$  SEM,  $n=16$ ).

### 4.1 Untersuchungen zur NADPH-Oxidase

Die Experimente hinsichtlich der Rolle der NADPH-Oxidase in der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion umfassten den Einsatz folgender Substanzen:

- den Hemmstoff von NADPH-Oxidase und Serinproteasen AEBSF
- die Serinproteasehemmer Aprotinin und PMSF

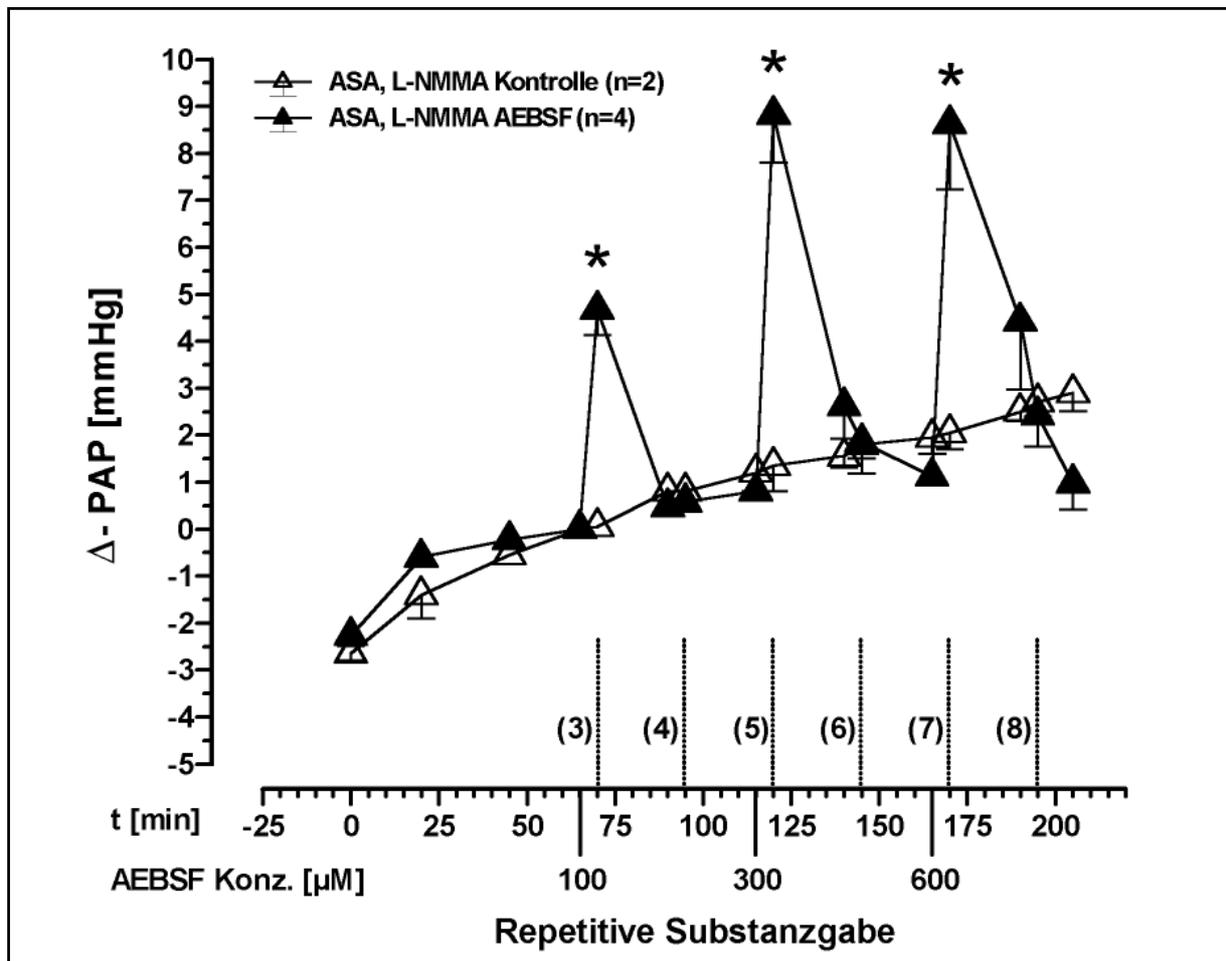
#### 4.1.1 AEBSF

Aufgrund der besonderen Wirkungsweise dieser Substanz werden der Einfluss auf den Basisdruck und auf die HPV getrennt dargestellt. Bei allen übrigen untersuchten Substanzen brachte diese separate Darstellung keinen Informationsgewinn, so dass darauf verzichtet werden konnte.

##### 4.1.1.1 Einfluss auf den normoxischen Vasotonus

Die Zugabe des NADPH-Hemmstoffes AEBSF während normoxischer Beatmung erhöhte temporär und dosisabhängig den pulmonalarteriellen Basisdruck. Im Rahmen der sogenannten Dosisfindungsversuche wurde der standardmäßige Versuchsablauf zunächst eingehalten: die erste Substanzzugabe erfolgte während normoxischer Beatmung jeweils fünf Minuten vor der Auslösung einer pulmonalen Vasokonstriktion entweder durch hypoxische Beatmung oder durch die Applikation von U46619. Diese Abfolge von Substanzzugabe (kumulative Konzentration von AEBSF: 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 600  $\mu$ M), konsekutiver rascher Erhöhung des PAP und zusätzlicher Erhöhung des PAP durch eine stimulierte Vasokonstriktion führten bei der erneuten Abfolge von Substanzzugabe und stimulierter Vasokonstriktion gemäß Standardversuchsprotokoll zu einer irreversiblen Schädigung der Lunge, erkennbar an einer unverhältnismäßig starken Massenzunahme und konsekutivem vorzeitigem Versuchsabbruch. Die Anwendung des modifizierten Versuchsprotokolls (siehe Kap. 3.3.1.1, S. 31), charakterisiert durch die Applikation von AEBSF in 50'-Abständen, hatte keine Schädigung der Lunge zur Folge. Dieses Versuchsprotokoll wurde zunächst für die Untersuchung der Wirkung von AEBSF auf den normoxischen Vasotonus benutzt. Unter den Bedingungen einer über den gesamten Versuchsablauf durchgehenden normoxischen Beatmung, einer inhibierten NO- und Prostazyklinsynthese durch 400  $\mu$ M L-NMMA und 1mM ASA erreichte der PAP-Anstieg bei Applikation von AEBSF in 50'-Abständen ein zeit- und dosisabhängiges Maximum von  $12,2 \pm 0,7$  mmHg nach  $13,1 \pm 0,3$  Min (100  $\mu$ M AEBSF),  $15,6 \pm 1,1$  mmHg nach  $5,4 \pm 0,9$  Min. (300  $\mu$ M), und  $15,6 \pm 1,5$  mmHg nach  $6,2 \pm 0,5$  Min. (600  $\mu$ M). Diese Druckerhöhung kehrte nach  $19,8 \pm 0,9$  Min. (100  $\mu$ M),  $28,1 \pm 3,8$  Min. (300  $\mu$ M) und  $28,2 \pm 3,8$  Min. (600  $\mu$ M) wieder auf Normalwerte zurück. Unter diesen Bedingungen kam es zu keiner

Ödembildung, resp. Massenzunahme der Lunge. Die Normalwerte wurden durch separate Kontrollexperimente gewonnen (siehe Abb. 6a).

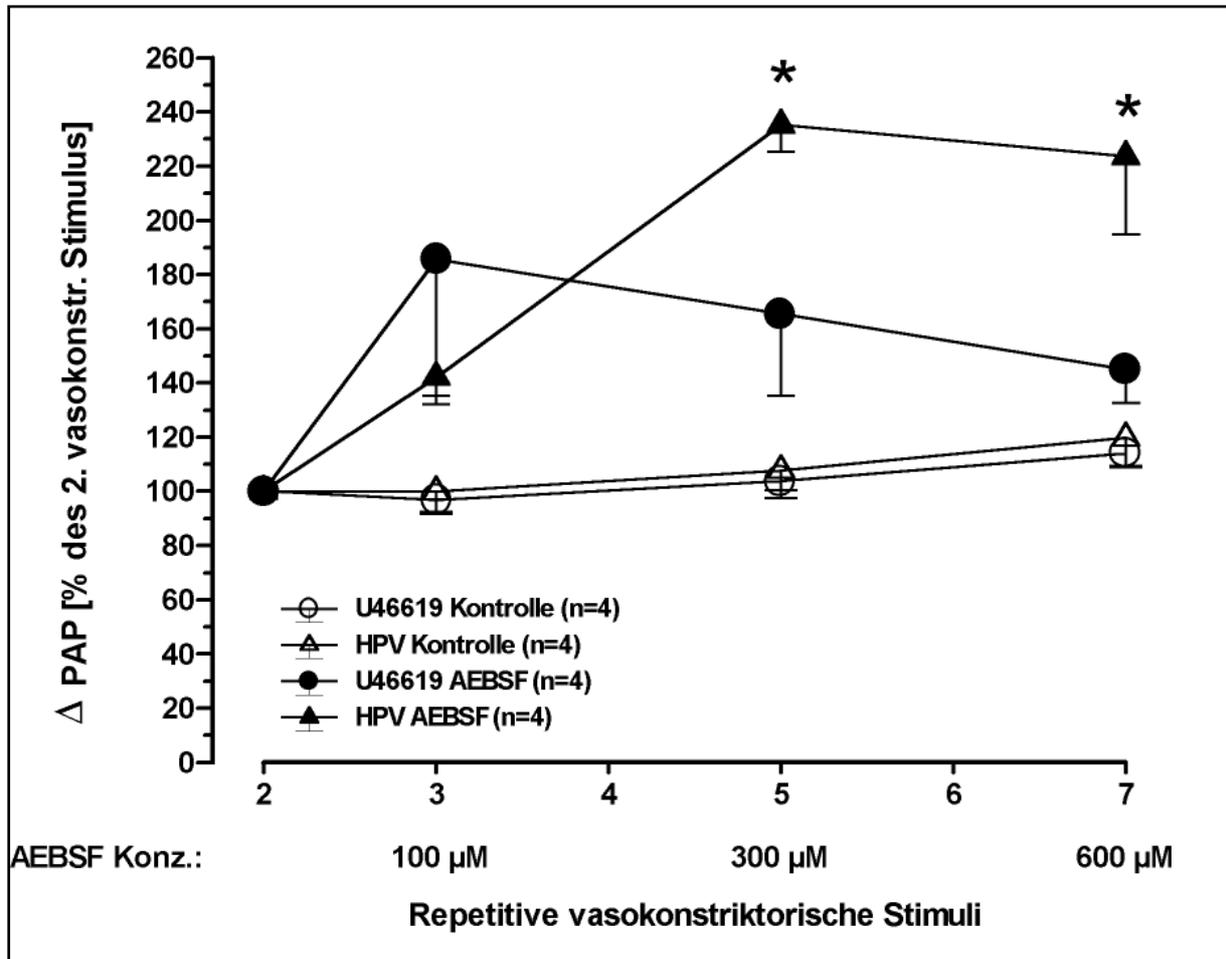


**Abb. 6a:** Verlauf des Basisdrucks bei durchgehend normoxischer Beatmung, unter Hemmung der NO-Synthese und der Zyklooxygenase mit (▲) und ohne (Δ) Zugabe von AEBSF. Die Abszisse zeigt die Versuchsdauer in Minuten und die kumulative Konzentration von AEBSF zum Zeitpunkt  $t=x$  an. Der Zeitpunkt  $t=0$  markiert die Zugabe von  $400 \mu\text{M}$  L-NMMA und  $1 \text{ mM}$  ASA. Zum Zeitpunkt der ersten AEBSF-Applikation ( $t=65'$ ) wurde der  $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  definiert. Die Ordinate zeigt die Auslenkungen des Basisdrucks ( $\Delta\text{-PAP}$ ) bezogen auf den  $\text{PAP}$ -Wert bei  $t=65'$  an. Die gestrichelten Linien und die ihnen zugeordneten Zahlen deuten die Zeitpunkte der in HPV- und U46619-Experimenten sukzessiv erfolgenden pulmonalarteriellen Vasokonstriktion an. Alle Werte, mit Ausnahme des Nullpunktes der Ordinate, sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollversuchen an ( $p \leq 0,05$ ). Die Applikation von AEBSF führt zu einer transienten Steigerung des normoxischen Vasotonus, welche bei Beginn der in HPV- und U46619-Experimenten stattfindenden Auslösung einer Vasokonstriktion vollständig abgeklungen ist. Definitionsbedingt ( $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  bei  $t=65'$ ) ergeben sich im Versuchsverlauf sowohl negative als auch positive  $\Delta\text{-PAP}$ -Werte. Der normoxische Vasotonus lag zum Zeitpunkt  $t=65'$  bei  $7,9 \pm 0,8 \text{ mmHg}$  (MW  $\pm$  SEM;  $n=6$ ).

#### 4.1.1.2 Einfluss auf die HPV

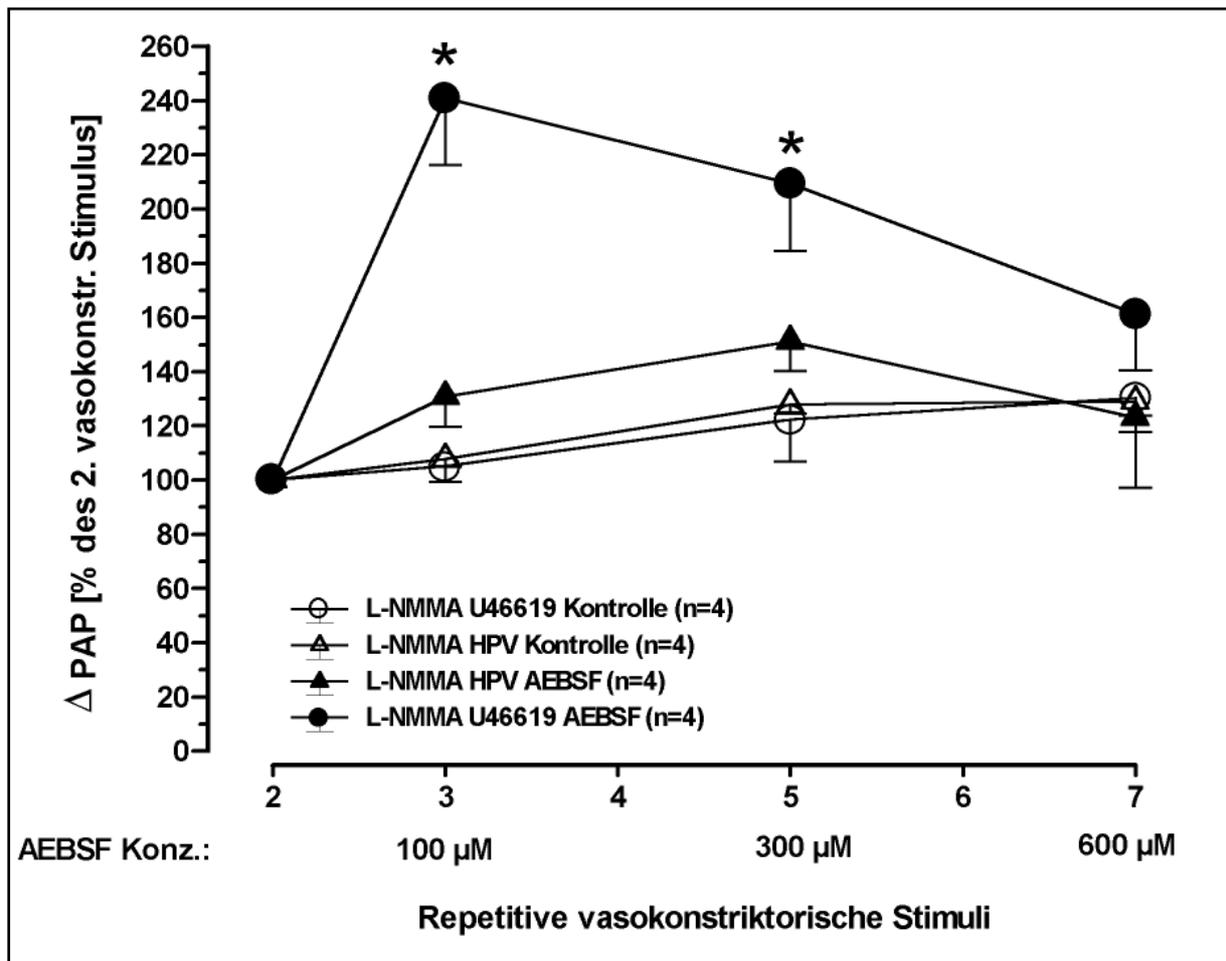
Für die Experimente mit AEBSF wurde der Standardmodus dahingehend geändert, dass die Zugabe von AEBSF zum Perfusat fünf Minuten vor der dritten, fünften und siebten Auslösung einer pulmonalarteriellen Vasokonstriktion erfolgte.

Die Durchführung einer durch hypoxische Beatmung induzierten pulmonalarteriellen Vasokonstriktion fünf Minuten nach der Applikation von AEBSF, d.h. in der Phase, in der ein erhöhter Basis-PAP bestand, resultierte in einer Verstärkung der HPV. Die vasokonstriktorische Reaktion als Antwort auf die Applikation von U46619 zeigte bei gleichen Bedingungen dagegen nur eine im Verhältnis geringe Steigerung des  $\Delta$ -PAP. Insgesamt ergab die statistische Untersuchung keine Unterschiede hinsichtlich des  $\Delta$ -PAP nach Applikation von 100  $\mu$ M AEBSF, eine statistisch signifikante Erhöhung des  $\Delta$ -PAP sowohl nach der Applikation von 300  $\mu$ M AEBSF als auch nach 600  $\mu$ M AEBSF (siehe Abb. 6b).



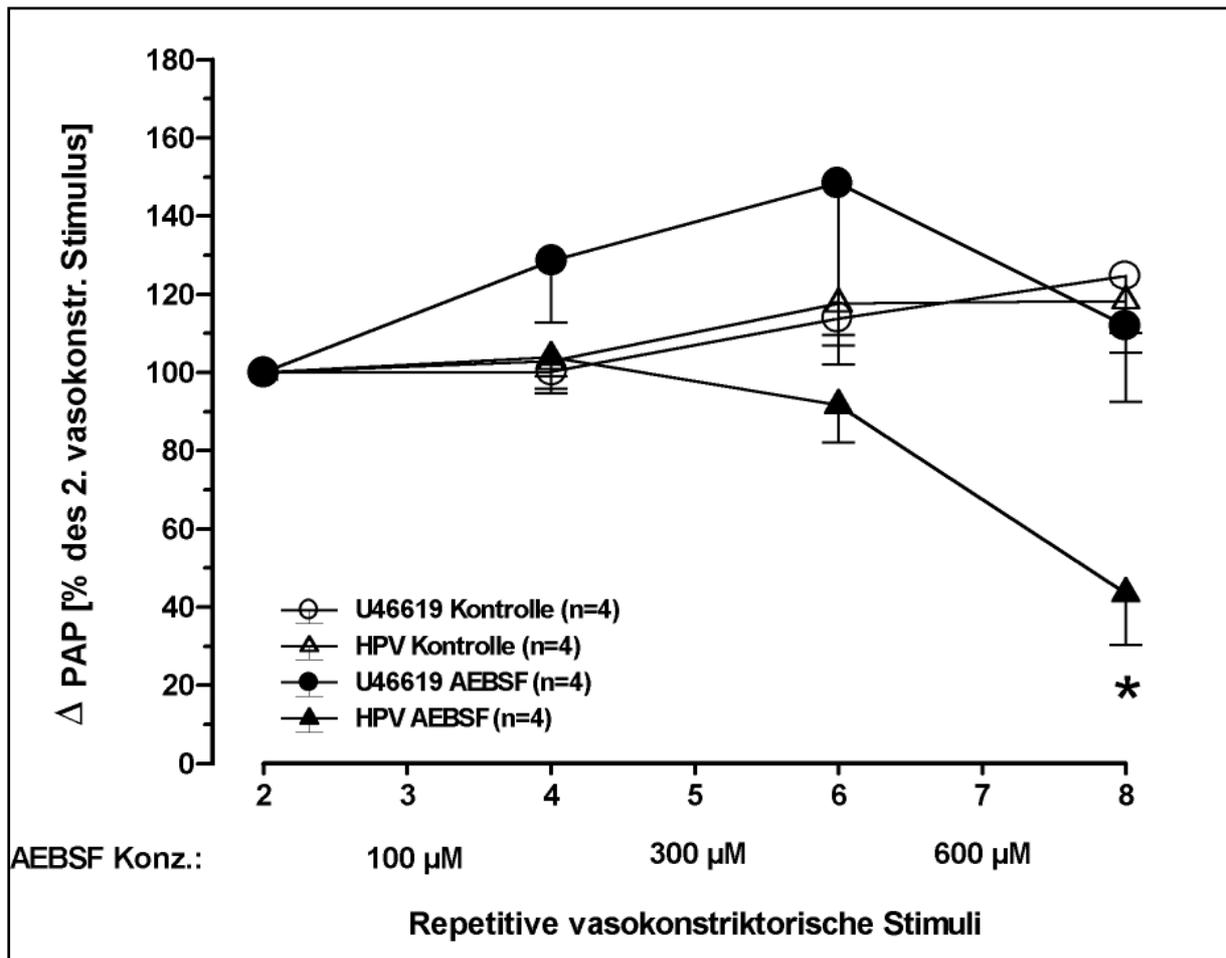
**Abb. 6b:** Vergleich des Einflusses von AEBSF auf repetitive hypoxische Vasokonstrictionen ( $\blacktriangle$ ) und U46619-induzierte Vasokonstrictionen ( $\bullet$ ) bei erhöhtem Basisdruckniveau. Die nicht ausgefüllten Symbole repräsentieren die Ergebnisse der korrespondierenden Kontrollexperimente ohne den Zusatz von AEBSF (siehe auch Legende der Abbildung). Auf der Abszisse sind sowohl die chronologisch geordneten Nummern der sukzessive erfolgten vasokonstriktorischen Stimuli (Nr. 2-7) angegeben, als auch die zum Ereignis vorhandene kumulative Konzentration von AEBSF (100-600  $\mu\text{M}$ ), die durch die Zugabe einer entsprechender Substanzmenge erreicht wurde. Die Ordinate skaliert die Stärke des Druckanstiegs ( $\Delta$ -PAP) in Prozent bezogen auf den (100%-) Referenzstimulus Nr. 2. (\*) HPV Nr. 5 und Nr. 7 wird durch AEBSF statistisch signifikant verstärkt sowohl im Vergleich zur HPV-Kontrolle als auch im Vergleich zu U46619-stimulierten Vasokonstrictionen unter AEBSF-Applikation ( $p \leq 0,05$ ). Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) der prozentualen PAP-Erhöhung der Einzelexperimente ( $n$ =Anzahl der Einzelexperimente). Die Verbindungslinien dienen der besseren Zuordnung einzelner Mittelwerte zu einer Versuchsreihe.

Das gleiche Versuchsschema wurde unter Inhibition der NO-Synthetase mittels L-NMMA-Applikation durchgeführt. Es zeigt eine spezifische Amplifikation der U46619-induzierten Vasokonstriktion bei 100 und 300  $\mu\text{M}$  gegenüber den Ergebnissen der U46619-Kontrollexperimente und den Ergebnissen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (siehe Abb. 6c).



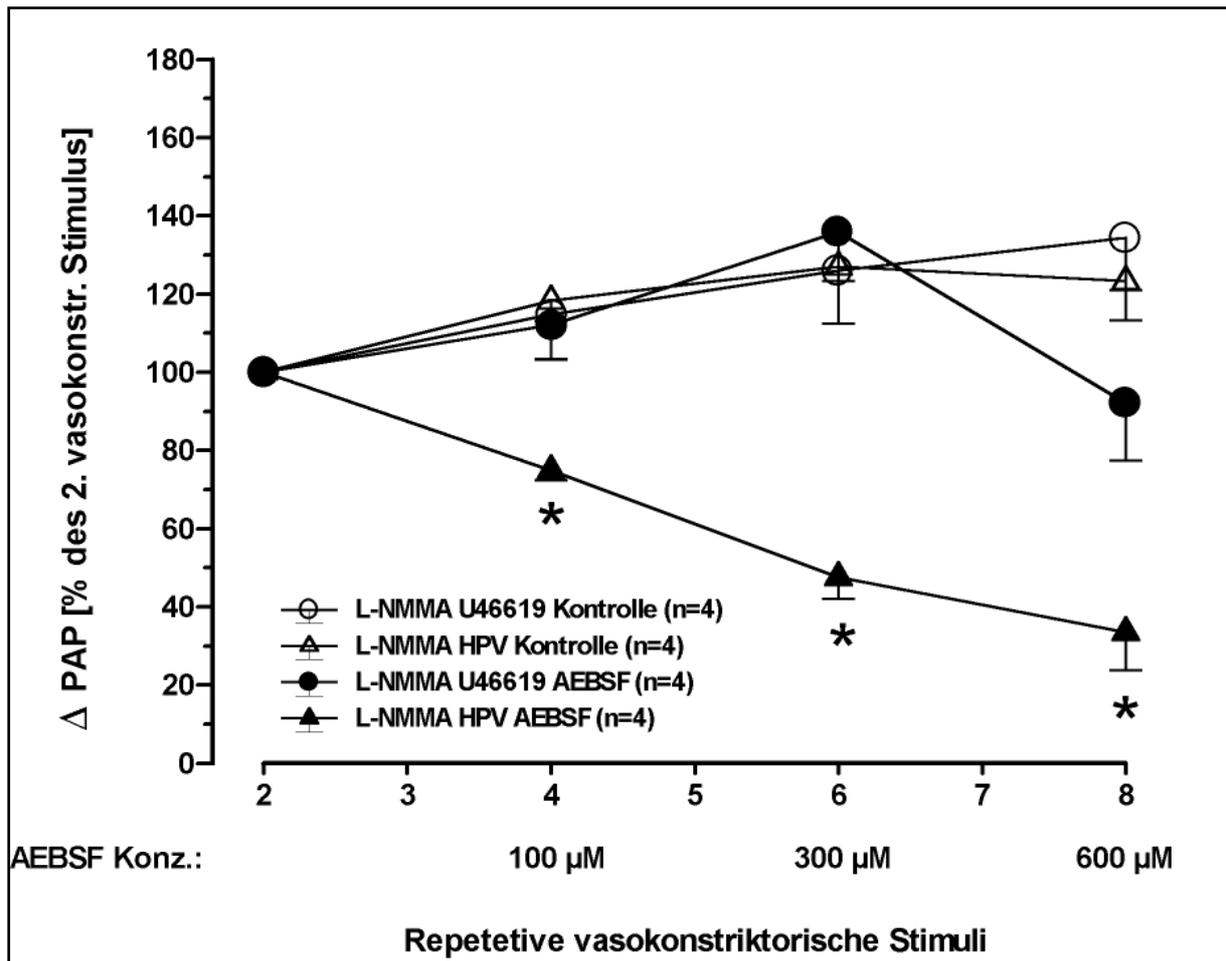
**Abb. 6c:** Vergleich des Einflusses von AEBSF auf repetitive hypoxische Vasokonstriktionen ( $\blacktriangle$ ) und U46619-induzierte Vasokonstriktionen ( $\bullet$ ) bei erhöhtem Basisdruckniveau unter Hemmung der NO-Synthese. (\*) Die U46619-induzierten Vasokonstriktionen Nr. 3 und Nr. 5 werden durch AEBSF statistisch signifikant verstärkt sowohl im Vergleich zur U46619-Kontrolle als auch im Vergleich zu hypoxisch induzierten Vasokonstriktionen unter AEBSF-Applikation ( $p \leq 0,05$ ).

Die Durchführung einer HPV nach der Rückkehr des Vasotonus auf Normalwerte resultierte in einer Hemmung der HPV, insbesondere der achten. Eine Hemmung der durch U46619-induzierten Vasokonstriktion fand sich zu keinem Zeitpunkt des Versuches, so dass, neben der oben beschriebenen Amplifikation, auch die Hemmung der HPV sich statistisch signifikant sowohl von den Ergebnissen der Kontrollexperimente ohne AEBSF-Applikation als auch von den Ergebnissen mit AEBSF und U46619 unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen unterschied (siehe Abb. 6d).



**Abb. 6d:** Vergleich des Einflusses von AEBSF auf repetitive hypoxische Vasokonstrictionen (▲) und U46619-induzierte Vasokonstrictionen (●) bei normalem Basisdruckniveau. Man erkennt, dass zwischen der Applikation von AEBSF und der hier betrachteten Auslösung einer Vasokonstriction durch Hypoxie, resp. U46619, eine Zeit von 30 Minuten liegt. Innerhalb dieser Zeit wurde gemäß dem weiter oben beschriebenen Standardversuchsprotokoll die Lunge für zehn Minuten hypoxisch beatmet, resp. U46619 zugeführt. (\*) HPV Nr. 8 wird durch AEBSF statistisch signifikant gehemmt sowohl im Vergleich zur HPV-Kontrolle als auch im Vergleich zu U46619-stimulierten Vasokonstrictionen unter AEBSF-Applikation ( $p \leq 0,05$ ).

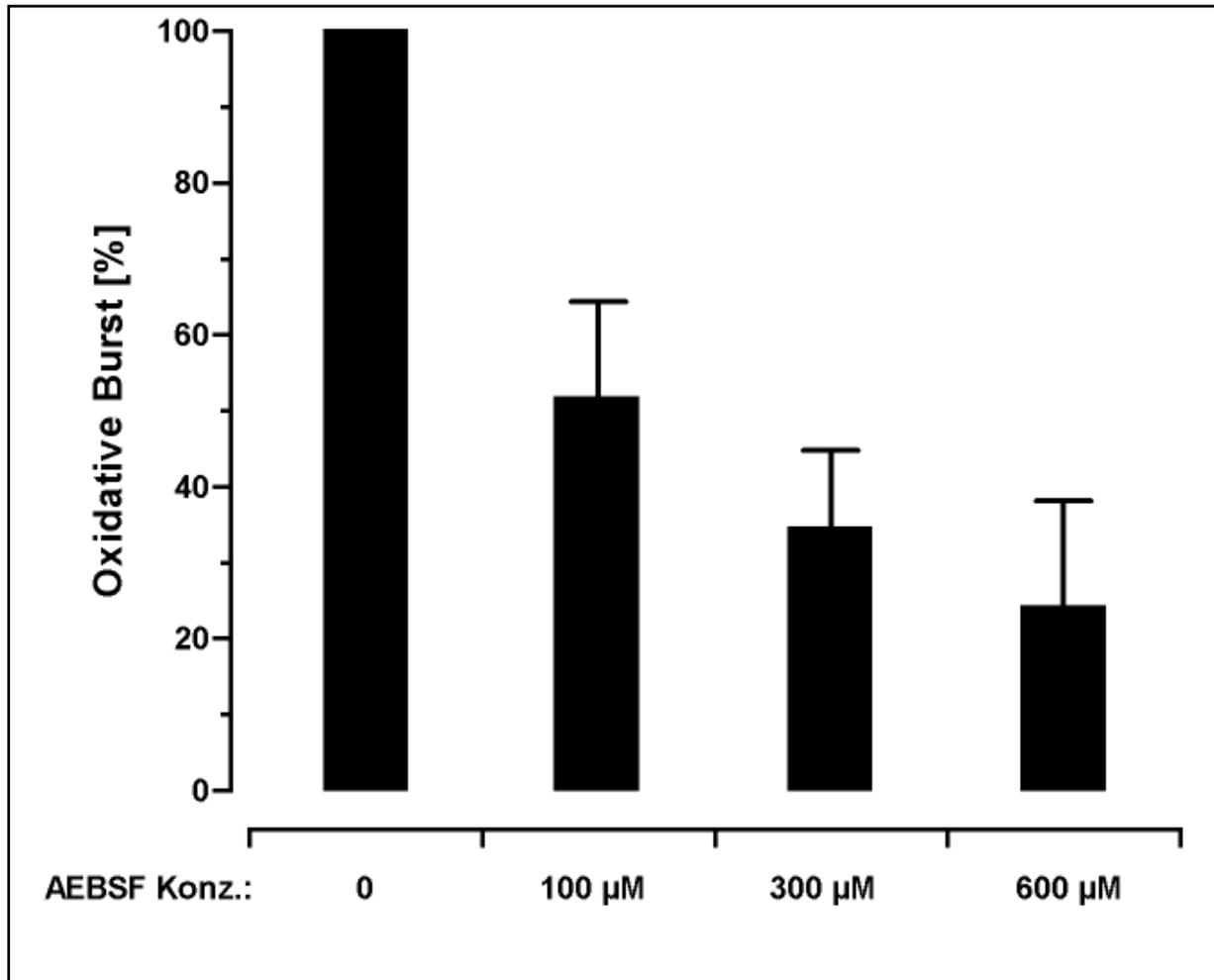
Der oben beschriebene spezifische inhibitorische Effekt des AEBSF wurde noch deutlicher in den Versuchen mit inhibierter NO-Synthese (siehe Abb. 6e).



**Abb. 6e:** Vergleich des Einflusses von AEBSF auf repetitive hypoxische Vasokonstrictionen ( $\blacktriangle$ ) und U46619-induzierte Vasokonstrictionen ( $\bullet$ ) bei normalem Basisdruckniveau und bei unterbundener NO-Synthese durch die Applikation des NO-Synthase-Hemmstoffes L-NMMA vor Beginn der steady-state-Phase. Man erkennt im Vergleich zu der Abbildung 6c, dass die HPV dosisabhängig durch 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M und 600  $\mu$ M AEBSF gehemmt wird. Die Ergebnisse für HPV unterscheiden sich statistisch signifikant von ihrem jeweiligen Ergebnis der Kontrollversuche sowie im Vergleich mit den Ergebnissen der Experimente mit U46619 unter ansonsten gleichen Bedingungen.

Die Ergebnisse belegen, dass AEBSF, nach einer transienten Verstärkung der hypoxisch induzierten Vasokonstriction, ein spezifischer Inhibitor der HPV ist.

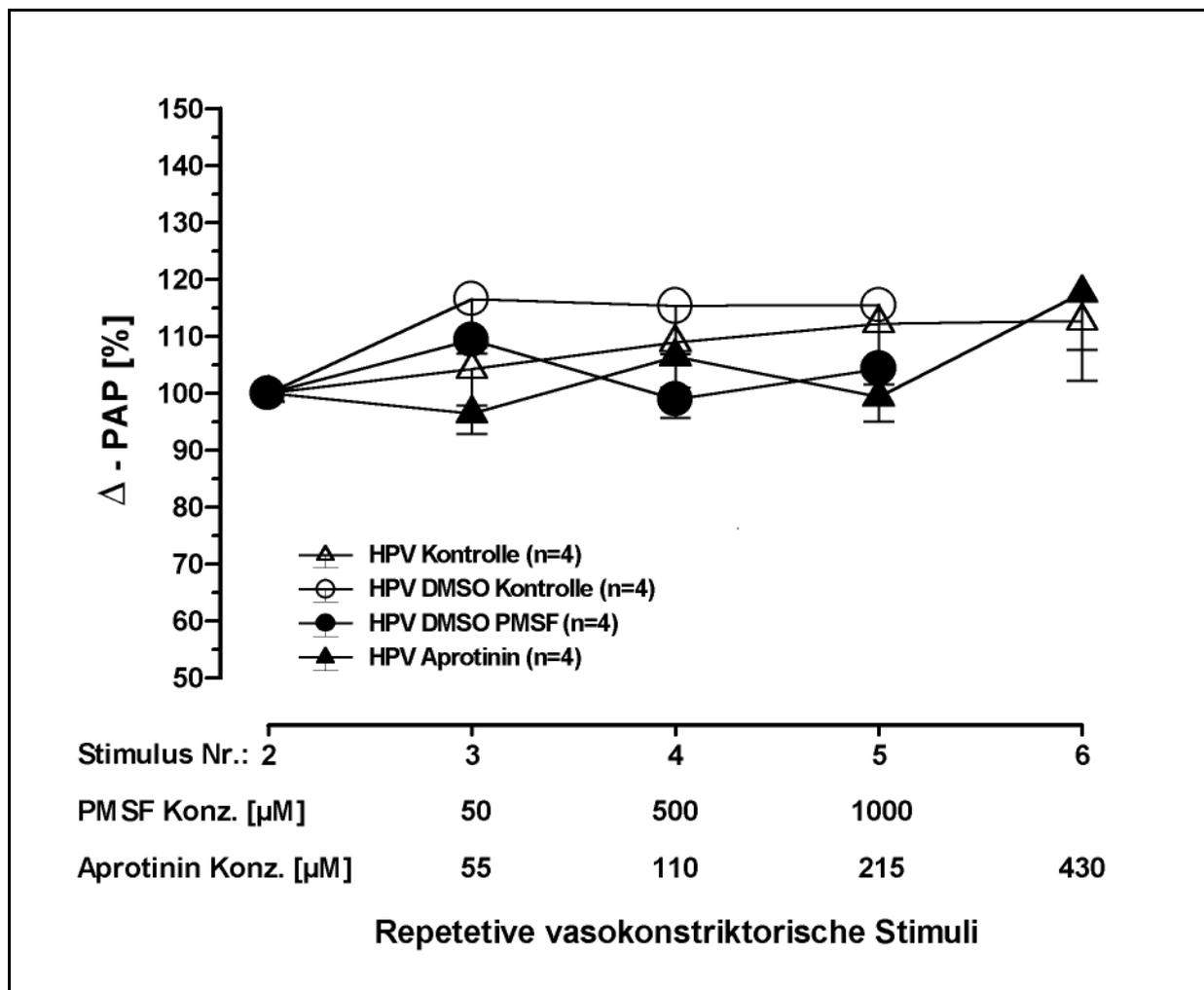
Um die inhibitorische Kapazität des AEBSF auf die NADPH-Oxidase im System der artifiziiell ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zu bestätigen, wurde der Effekt von AEBSF auf den *oxidative burst* in Alveolarmakrophagen untersucht. Der *oxidative burst* wurde durch PMA ausgelöst. Als Ergebnis dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass AEBSF den *oxidative burst* dosisabhängig schwächte (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Abgebildet ist die Provokation des *oxidative burst* von Alveolarmakrophagen durch die alleinige Zugabe von 2 µM PMA in Abwesenheit von AEBSF, sowie in Anwesenheit von AEBSF in steigender Konzentration. AEBSF wurde gemäß den Experimenten am Lungenmodell jeweils fünf Minuten vor der Stimulation durch PMA zugesetzt. Man erkennt eine dosisabhängige Hemmung des *oxidative burst* durch AEBSF (n=4).

#### 4.1.2 PMSF und Aprotinin

AEBSF besitzt neben seiner Eigenschaft, NADPH-Oxidase zu hemmen, ebenso die Fähigkeit, Serinproteasen wirksam in ihrer Aktivität zu hemmen. Um auszuschliessen, dass die beobachteten Effekte des AEBSF a) auf den Basisdruckverlauf und b) auf die hypoxisch oder pharmakologisch induzierte pulmonale Vasokonstriktion auf eine Hemmung der Serinproteasen zurückzuführen sind, wurden zwei verschiedene Serinproteaseinhibitoren, Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und Aprotinin, hinsichtlich ihres Einflusses auf die hypoxisch induzierte Vasokonstriktion untersucht (41). Diese Agenzien hatten bis zu den maximal eingesetzten Konzentration von 1 mM PMSF, resp. 6000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIU/ml Perfusat) Aprotinin keinen signifikanten Einfluss auf die HPV (s. Abb. 8).

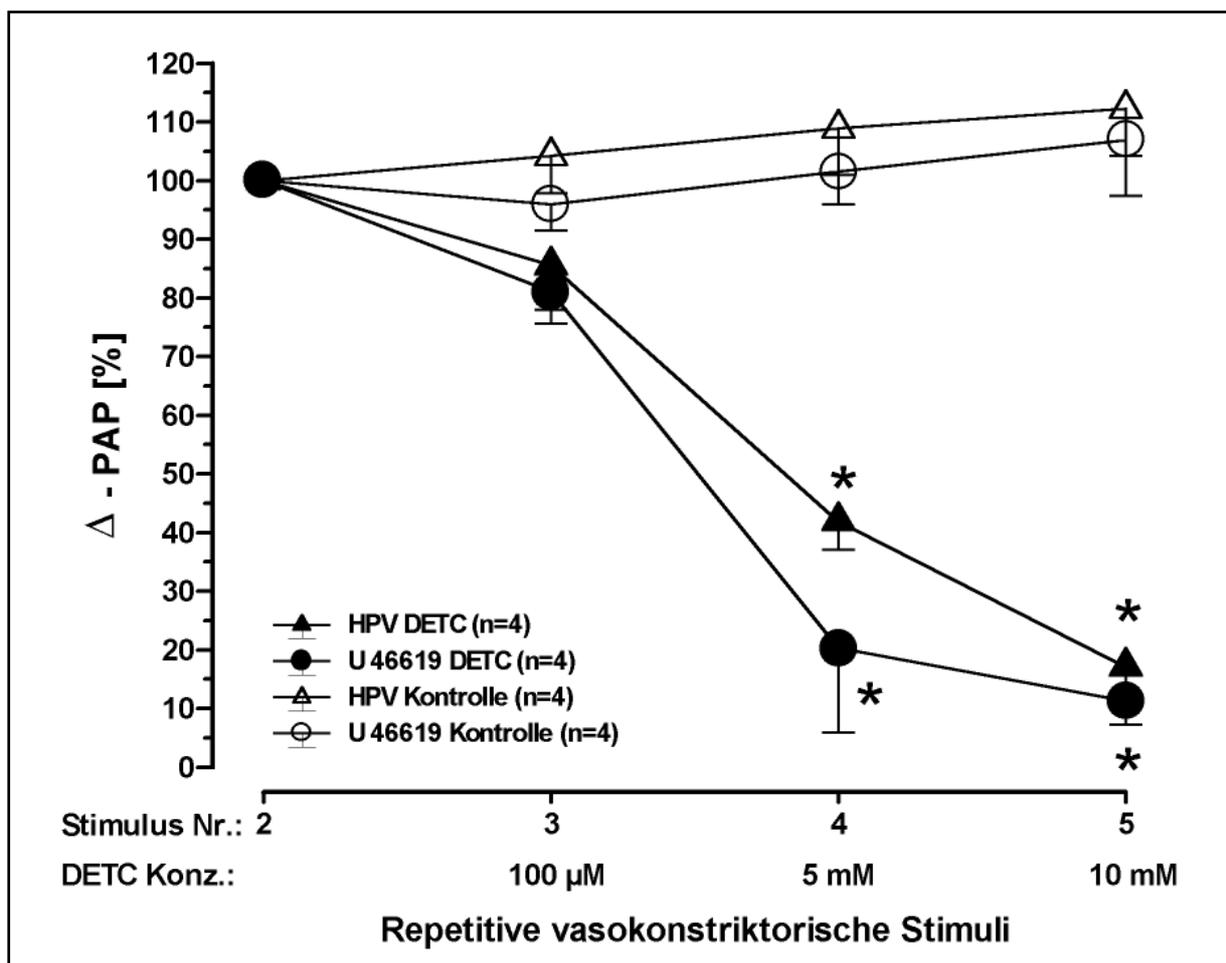


**Abb. 8:** Vergleich der Wirkungen von PMSF und Aprotinin auf die HPV. Die Lösung von PMSF erfolgte in DMSO, so dass Kontrollexperimente mit DMSO bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Man erkennt, dass die Serinproteasehemmstoffe Aprotinin und PMSF in den applizierten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die HPV ausüben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 4.2 Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

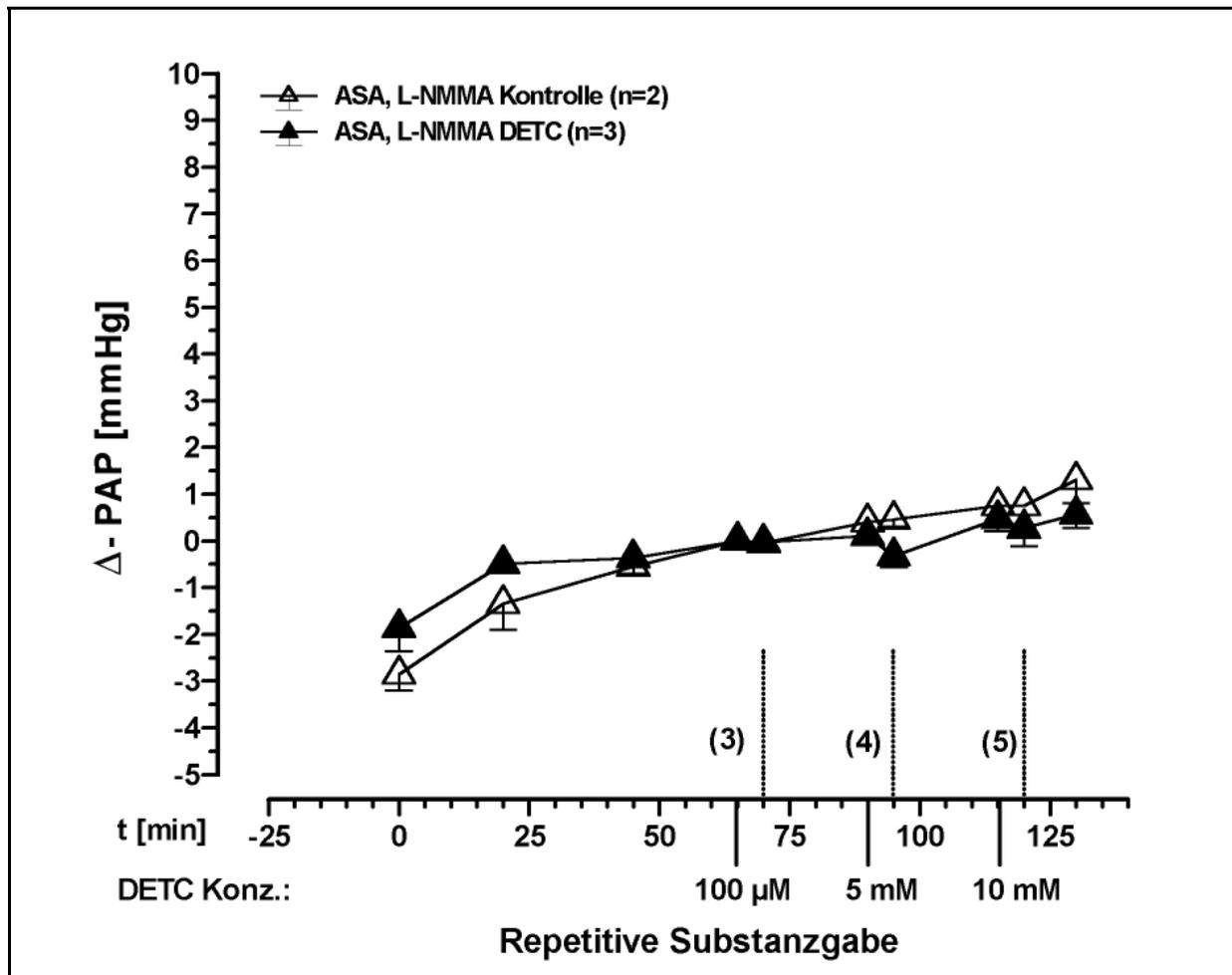
### 4.2.1 DETC

DETC hemmt im Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 10 mM dosisabhängig die HPV. Diese Eigenschaft als Inhibitor der HPV war nicht spezifisch, da auch die pharmakologisch induzierte pulmonale Vasokonstriktion, hervorgerufen durch die Applikation von U46619, durch DETC in vergleichbarem Ausmaß abgeschwächt wurde (siehe Abb. 9a).



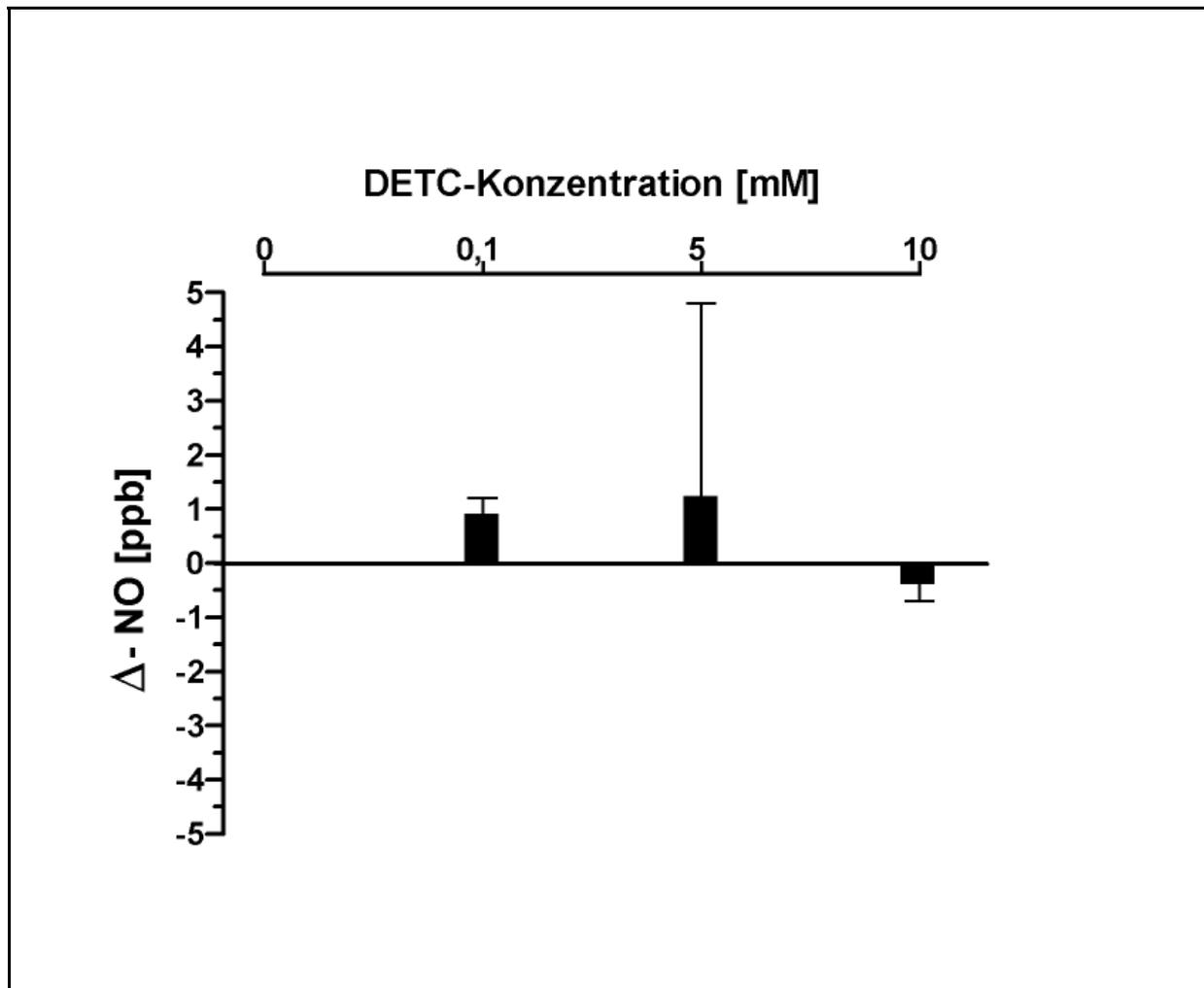
**Abb. 9a:** Abgebildet ist die Wirkung von DETC auf die HPV und die U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion. Man erkennt, dass sowohl die HPV als auch die pharmakologisch induzierte pulmonale Vasokonstriktion dosisabhängig durch DETC gehemmt wird. Die angegebenen Werte sind  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Kontrollexperimente und der Experimente mit DETC-Zugabe an ( $p \leq 0,05$ ). Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Versuche mit DETC.

Eine reale Hemmung der hypoxisch oder pharmakologisch induzierten pulmonalen Vasokonstriktion konnte von einer Imitation der HPV durch Anstieg des Basisdruckniveaus, ausgelöst durch die zu untersuchende Substanz, abgegrenzt werden. DETC hatte in den untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Basisdruckniveau (siehe Abb. 9b).



**Abb. 9b:** Dargestellt sind die Verläufe des Basisdrucks bei durchgehend normoxischer Beatmung der Lungen ohne die Zugabe ( $\Delta$ ) von DETC sowie mit Zugabe von DETC ( $\blacktriangle$ ). Der Zeitpunkt  $t=0$  markiert den Zeitpunkt der Zugabe von  $400 \mu\text{M}$  L-NMMA und  $1 \text{ mM}$  ASA. Zum Zeitpunkt der ersten AEBSF-Applikation ( $t=65'$ ) wurde der  $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  definiert. Die Ordinate zeigt die Auslenkungen des Basisdrucks ( $\Delta\text{-PAP}$ ) bezogen auf den  $\text{PAP}$ -Wert bei  $t=65'$  an. Die gestrichelten Linien und die ihnen zugeordneten Zahlen deuten die Zeitpunkte der in HPV- und U46619-Experimenten sukzessiv erfolgenden pulmonalarteriellen Vasokonstriktion an. Alle Werte, mit Ausnahme des Nullpunkts der Ordinate, sind als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  angegeben. Zu keinem Zeitpunkt besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Messpunkten im Versuchsverlauf ( $p \leq 0,05$ ). Definitionsbedingt ( $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  bei  $t=65'$ ) ergeben sich im Versuchsverlauf sowohl negative als auch positive  $\Delta\text{-PAP}$ -Werte.

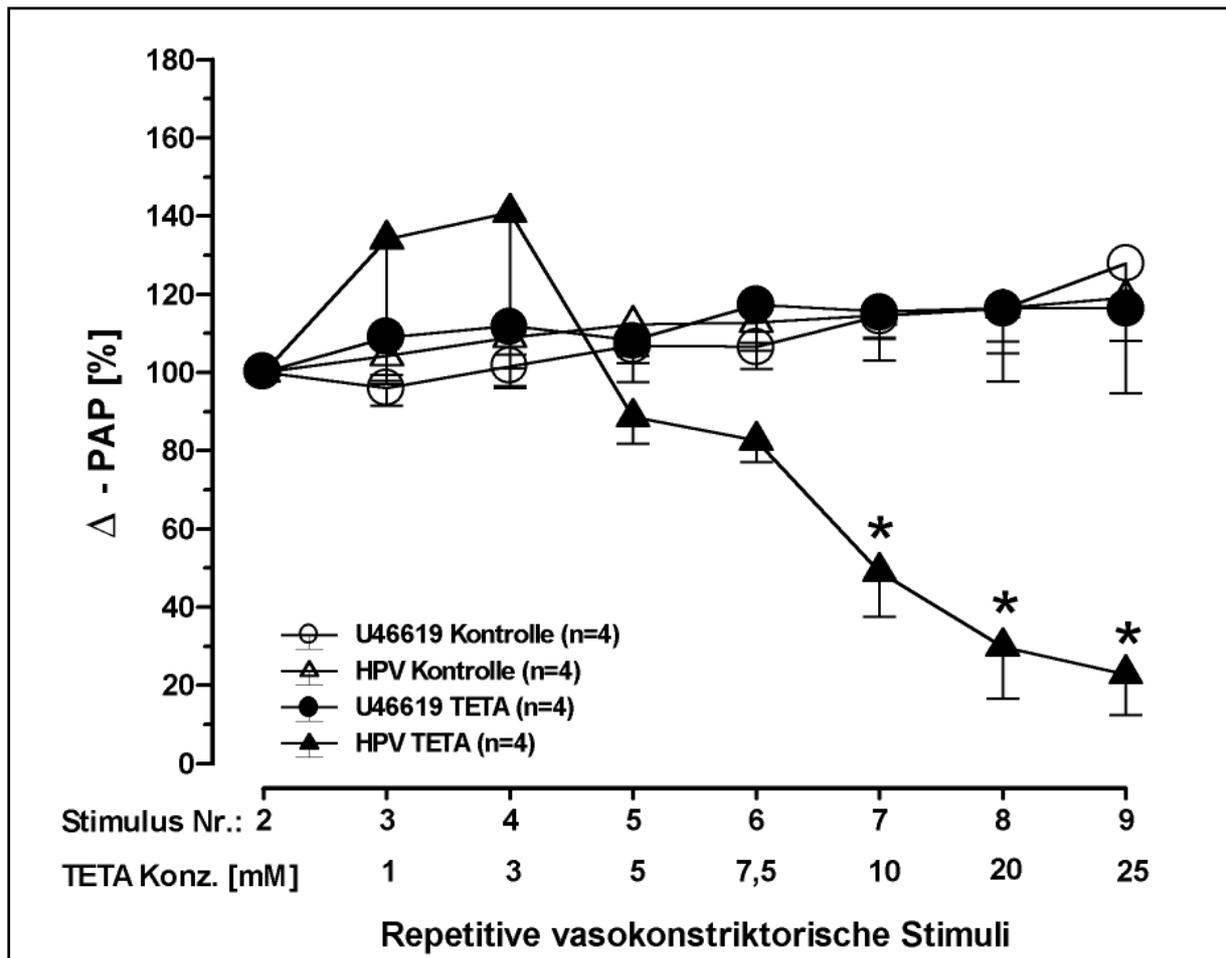
Die Messung der NO-Konzentration im exhalativen Schenkel des Beatmungssystems kurz vor und fünf Minuten nach Applikation von DETC zeigt keine Reduktion des NO (s. Abb. 9c). In Kontrollversuchen ohne Applikation von DETC bestand keinerlei Differenz zwischen den zu bestimmenden Werten  $x_2$  und  $x_1$  (siehe Kap. 3.5).



**Abb. 9c:** Abgebildet sind die Veränderungen der NO-Konzentrationen [ppb] im Exhalat fünf Minuten nach Substanzapplikation bezogen auf die jeweils erreichte kumulative Konzentration von DETC [mM] im Perfusat. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die NO-Konzentration im *steady state* (siehe Kap. 3.5.2, S. 37) betrug  $84,1 \pm 9,3$  ppb NO,  $n=7$ . Man erkennt, dass ohne Substanzapplikation (hier: „0 mM DETC“) keine Veränderung der exhalativen NO-Konzentration innerhalb des beobachteten 5-Minuten-Zeitraums stattfindet ( $\Delta$ -NO=0 ppb). Die Applikation von DETC führt in den angegebenen Konzentrationen zu einer inkonstanten Alteration der exhalativen NO-Konzentration innerhalb des jeweils beobachteten 5-Minuten-Zeitraums.

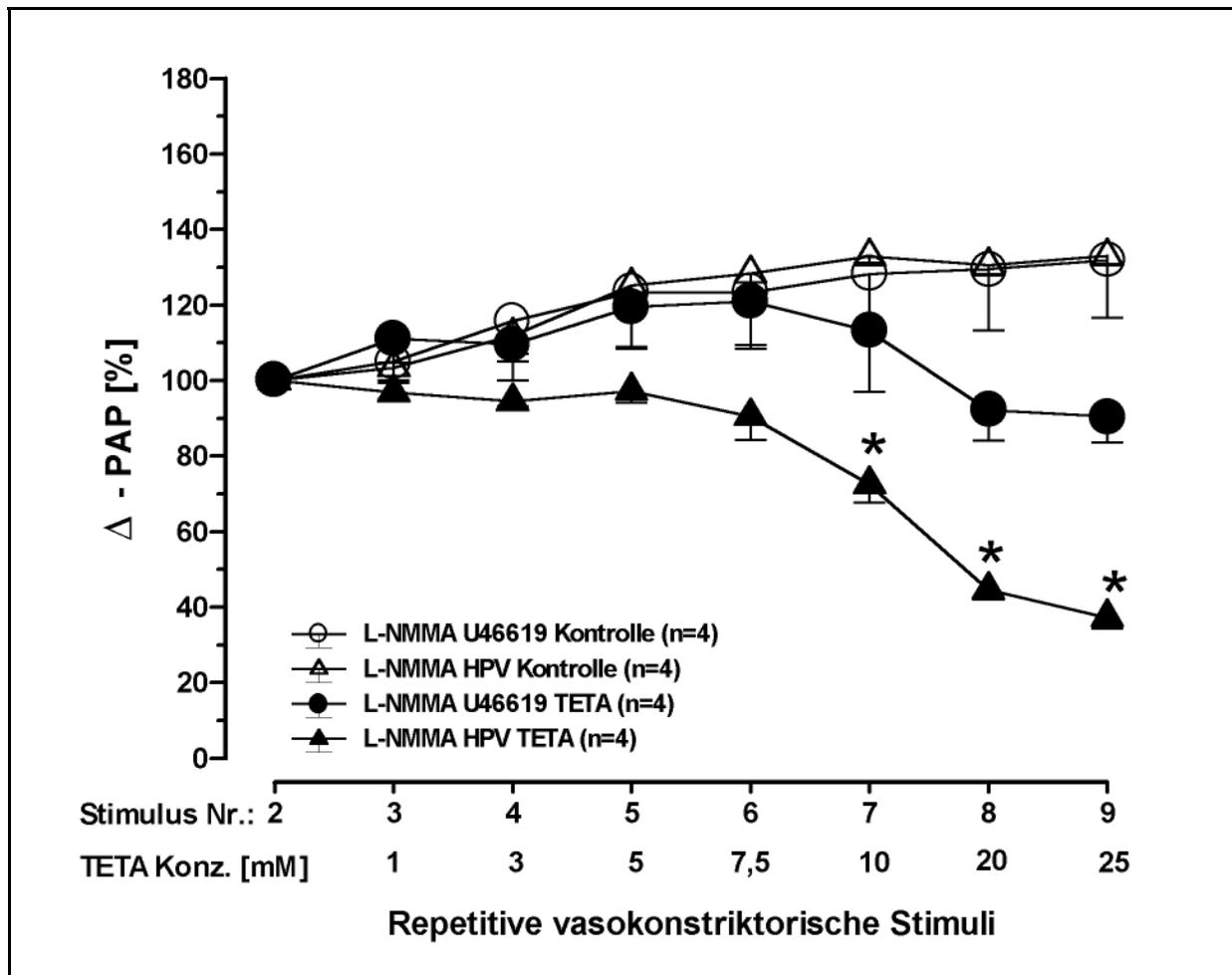
## 4.2.2 TETA

Die zweite in der vorliegenden Arbeit untersuchte Substanz mit SOD-inhibitorischer Kapazität hinsichtlich ihrer Wirkung auf die HPV, TETA, hemmte die HPV im Konzentrationsbereich zwischen 10 mM und 25 mM in dosisabhängiger Art und Weise. Die Druckantworten auf Zugabe von U46619 wurden durch die Applikation von TETA nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 10a).



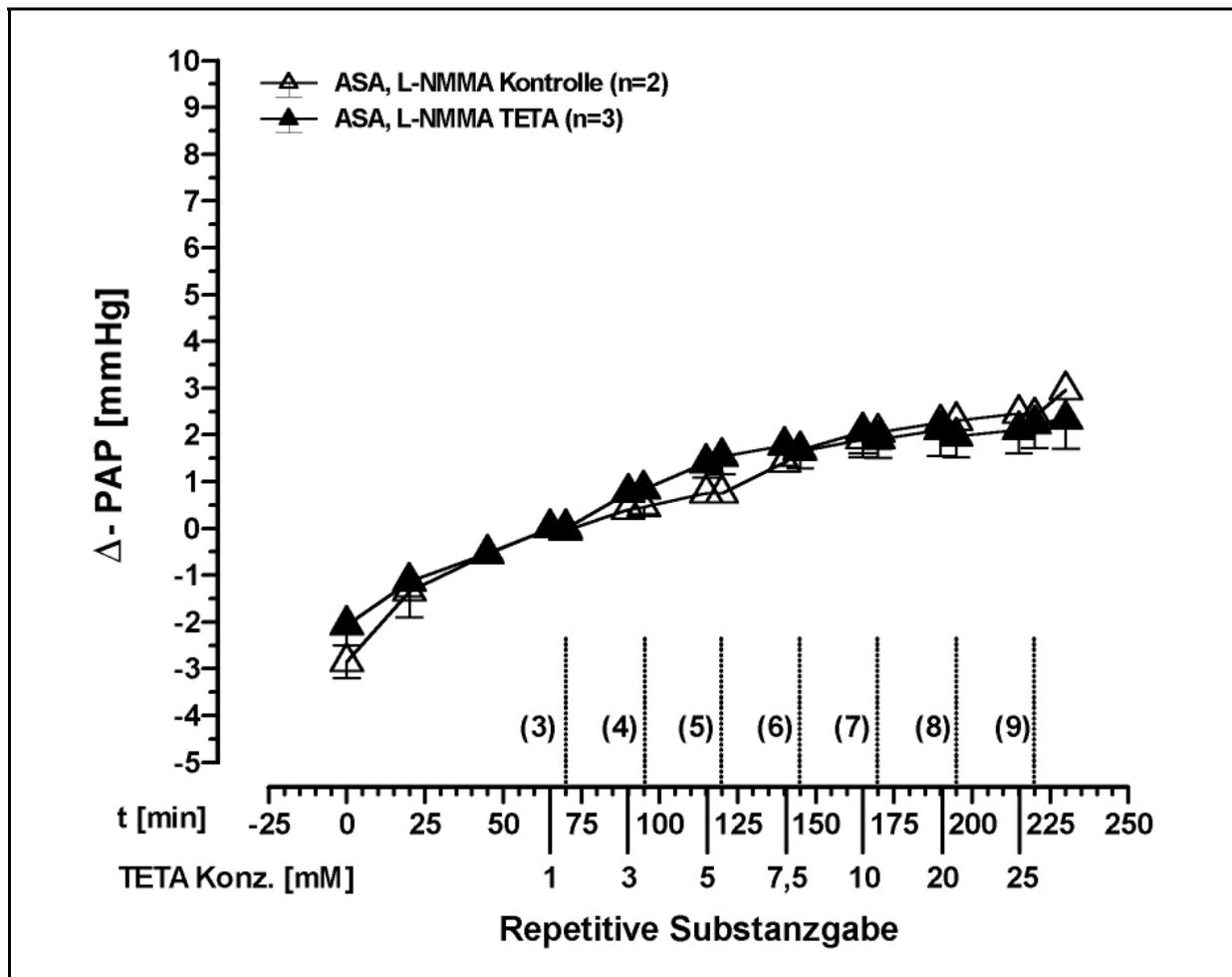
**Abb. 10a:** Abgebildet ist der Einfluss von TETA auf die HPV und die U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollversuchen ohne TETA-Zugabe. Man erkennt eine dosisabhängige Hemmung der HPV durch TETA. Die durch U46619 induzierte pulmonale Vasokonstriktion wird durch TETA nicht beeinflusst. (\*) zeigt den statistisch signifikanten Einfluss von TETA auf die HPV verglichen mit den HPV-Kontrollexperimenten und den Experimenten, in denen der Einfluss von TETA auf die durch U46619 induzierten pulmonalen Vasokonstriktionen untersucht wurde ( $p \leq 0,05$ ).

Nahezu das gleiche Ergebnis wurde in den Experimenten erzielt, in denen die NO-Bildung durch 400  $\mu$ M L-NMMA inhibiert wurde (siehe Abb. 10b).



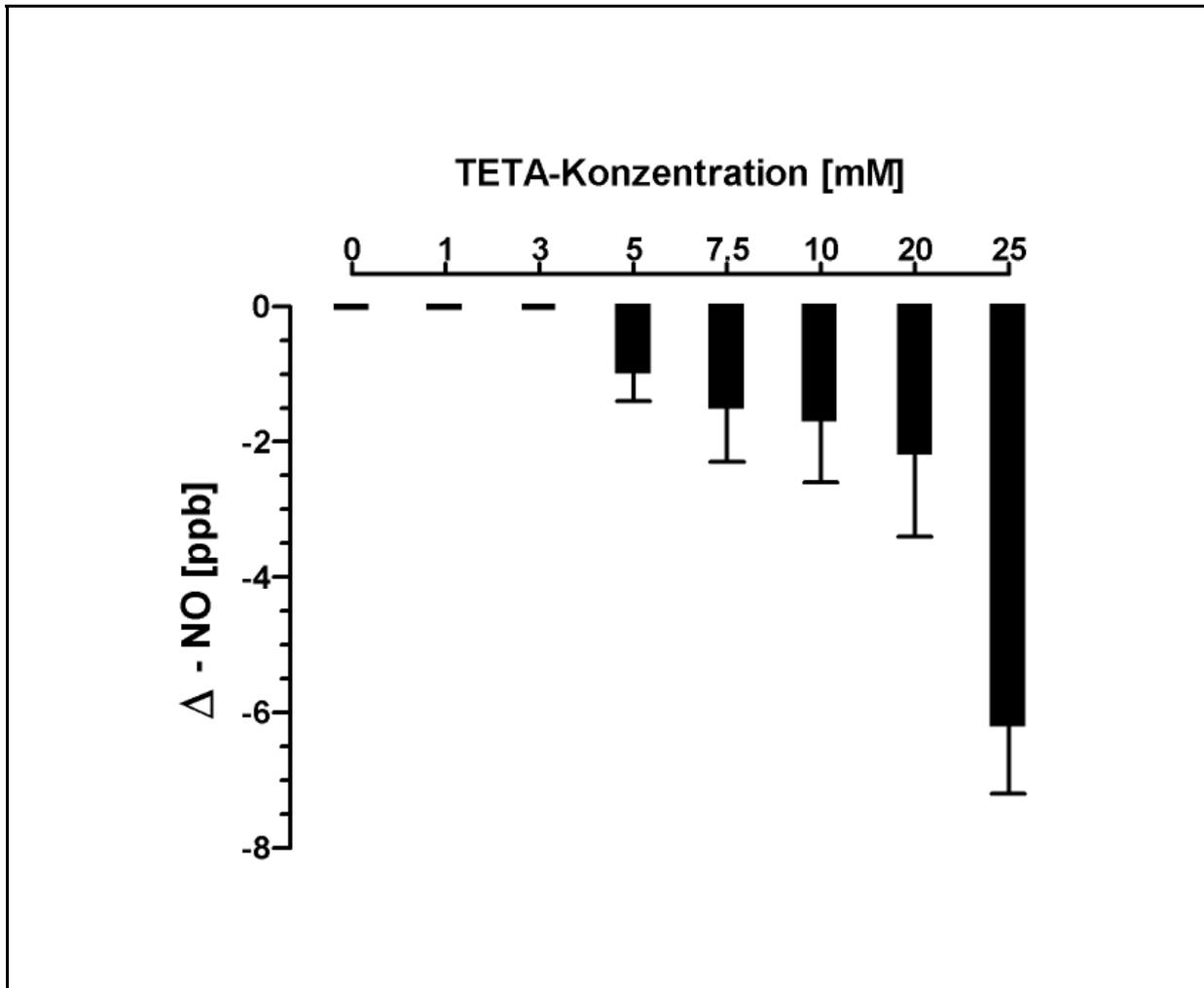
**Abb. 10b:** Abgebildet ist der Einfluss von TETA auf die HPV und die U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollversuchen ohne TETA-Zugabe bei unterbundener NO-Synthese. Man erkennt eine dosisabhängige Hemmung der HPV durch TETA. Die U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion wird durch TETA in den Konzentrationen 20 mM und 25 mM gehemmt. (\*) zeigt den statistisch signifikanten Einfluss von TETA auf die HPV verglichen mit den HPV-Kontrollexperimenten und den Experimenten, in denen der Einfluss von TETA auf die durch U46619 induzierten pulmonalen Vasokonstriktionen untersucht wurde ( $p \leq 0,05$ ).

Folglich war, nach AEBSF, auch TETA ein spezifischer Inhibitor der HPV. Die Frage nach einer möglichen Imitierung der HPV wurde, wie schon für AEBSF und DETC beschrieben, mit Basisdruck-Experimenten beantwortet. TETA hatte keinerlei statistisch signifikanten Einfluss auf den normoxischen Vasotonus (siehe Abb. 10c).



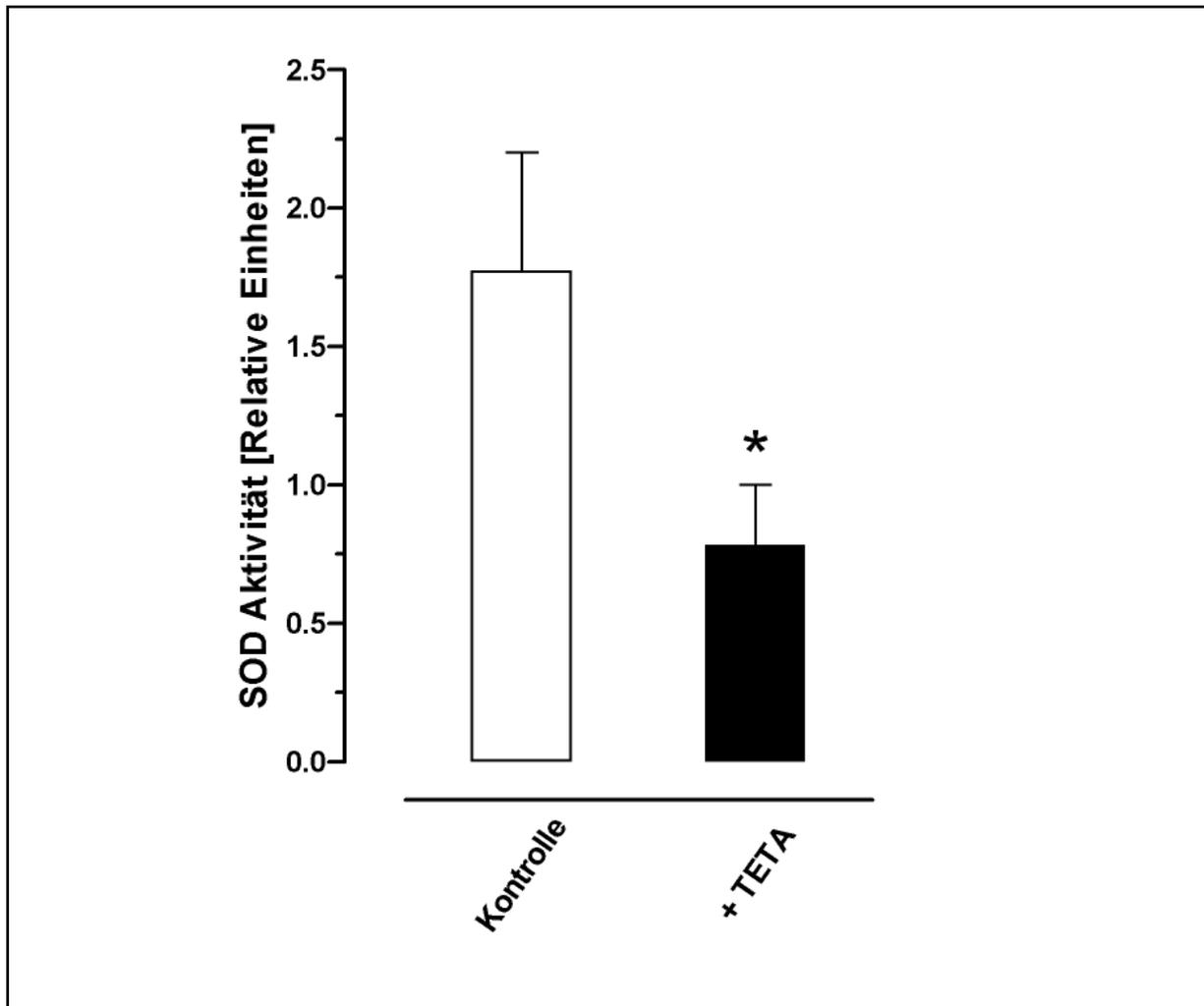
**Abb. 10c:** Dargestellt sind die Verläufe des Basisdrucks bei durchgehend normoxischer Beatmung der Lungen ohne die Zugabe ( $\Delta$ ) von TETA sowie mit Zugabe von TETA ( $\blacktriangle$ ). Der Zeitpunkt  $t=0$  markiert den Moment der Zugabe von  $400 \mu\text{M}$  L-NMMA und  $1 \text{ mM}$  ASA. Zum Zeitpunkt der ersten AEBSF-Applikation ( $t=65'$ ) wurde der  $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  definiert. Die Ordinate zeigt die Auslenkungen des Basisdrucks ( $\Delta\text{-PAP}$ ) bezogen auf den  $\text{PAP}$ -Wert bei  $t=65'$  an. Die gestrichelten Linien und die ihnen zugeordneten Zahlen deuten die Zeitpunkte der in HPV- und U46619-Experimenten sukzessiv erfolgenden pulmonalarteriellen Vasokonstriktion an. Alle Werte, mit Ausnahme des Nullpunkts der Ordinate, sind als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  angegeben. Zu keinem Zeitpunkt besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Messpunkten im Versuchsverlauf ( $p \leq 0,05$ ). Definitionsbedingt ( $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  bei  $t=65'$ ) ergeben sich im Versuchsverlauf sowohl negative als auch positive  $\Delta\text{-PAP}$ -Werte.

Die Messung der NO-Konzentration im exhalativen Schenkel des Beatmungssystems direkt vor und fünf Minuten nach Applikation von TETA zeigt eine dosisabhängige Reduktion des NO (siehe Abb. 10d). In Kontrollversuchen ohne Applikation von TETA bestand keinerlei Differenz zwischen den zu bestimmenden Werten  $x_2$  und  $x_1$  (siehe auch Kap. 3.5).



**Abb. 10d:** Abgebildet sind die Veränderungen der NO-Konzentrationen [ppb] im Exhalat fünf Minuten nach Substanzapplikation bezogen auf die jeweils erreichte kumulative Konzentration von TETA [mM] im Perfusat. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die NO-Konzentration im *steady state* (siehe Kap. 3.5.2, S. 37) betrug  $95,8 \pm 11,9$  ppb NO,  $n=6$ . Die Applikation von TETA führte dosisabhängig zu einer Verringerung der exhalativen NO-Freisetzung ( $\Delta$ -NO) in dem jeweils beobachteten 5-Minuten-Zeitraum.

Zur Bestätigung der SOD-inhibitorischen Kapazität von TETA wurde die SOD-Aktivität in homogenisierten Lungen anhand einer spektrophotometrischen Messung untersucht. Die SOD-Aktivität sank gegenüber Kontrollversuchen im Mittel auf 44% vom Ausgangswert (siehe Abb. 10e).

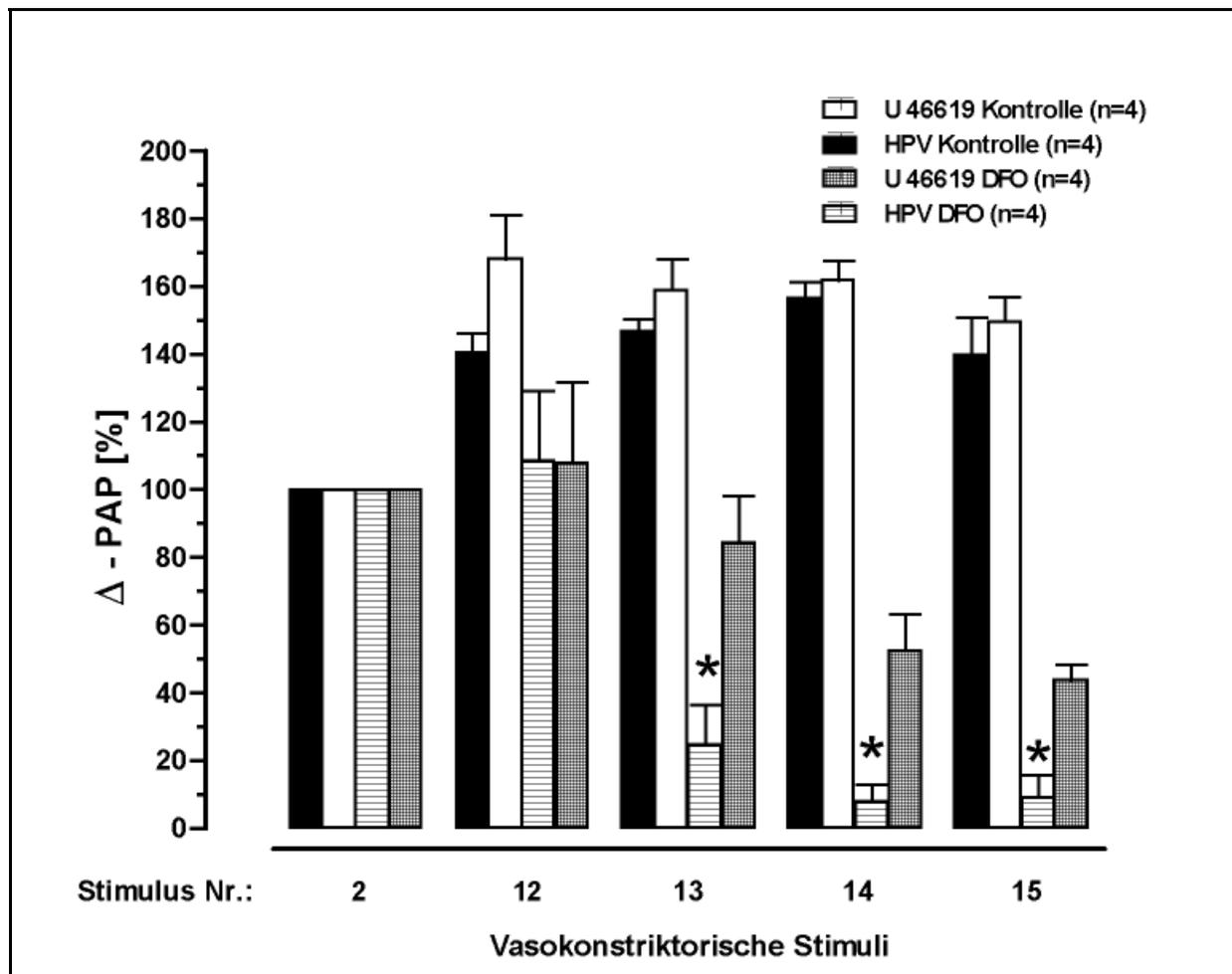


**Abb. 10e:** Vergleich zwischen der SOD-Aktivität in TETA-behandelten Lungen und Kontrollorganen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, jeweils n=4 Lungen. \* $=p \leq 0,05$ .

#### 4.2.3 DFO

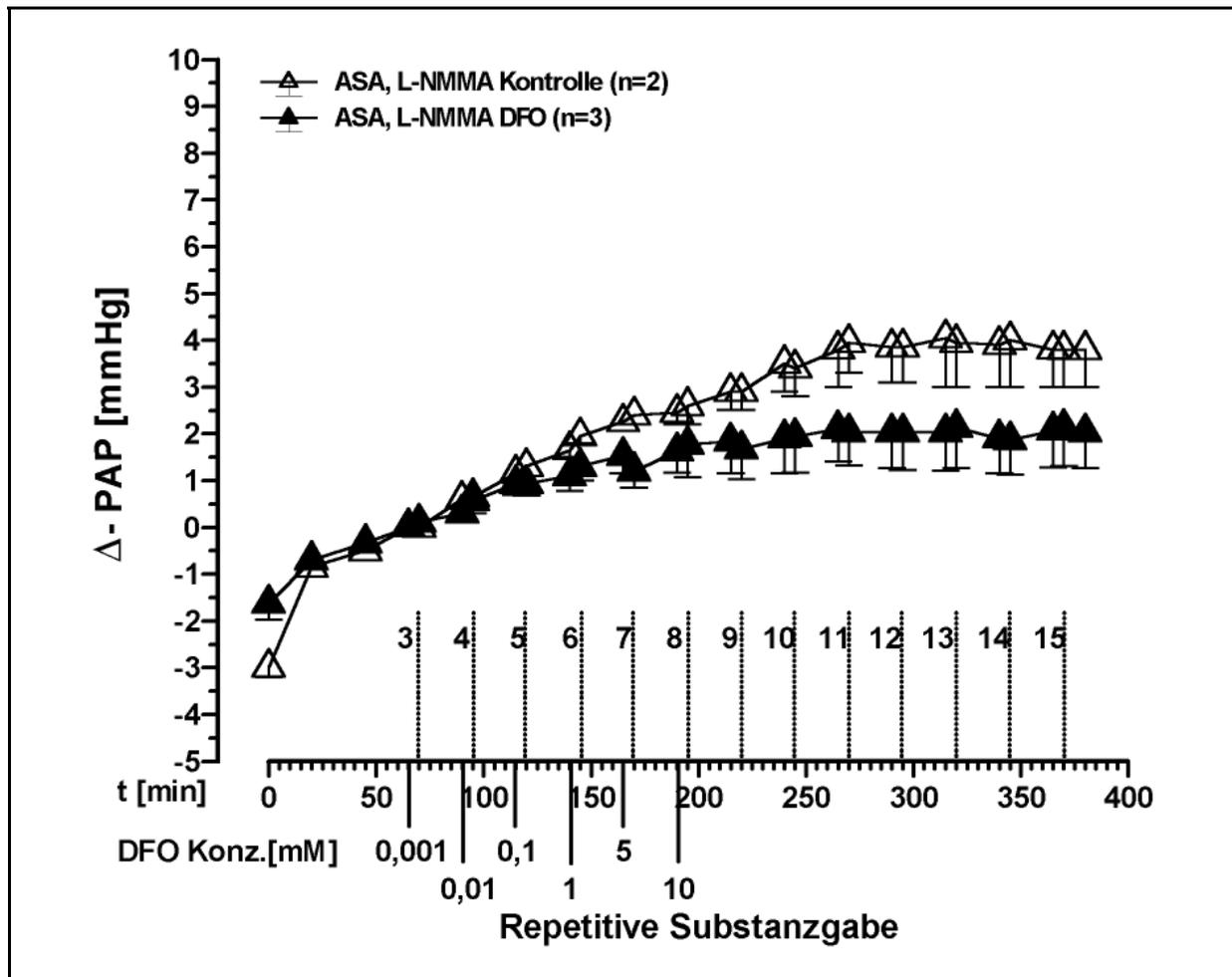
Die sechste in der vorliegenden Arbeit untersuchte Substanz hinsichtlich ihrer Wirkung auf die HPV, der  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelator Deferoxaminmesilat, zeigte eine besonders lange Wirklatenz. Das Standardprotokoll wurde bis zur 15. stimulierten Vasokonstriktion eingehalten. Die Zugabe von DFO erfolgte bis zur kumulativen Konzentration von 10 mM fünf Minuten vor der 8.

stimulierten Vasokonstriktion. Die im Versuchsverlauf sukzessiv gesteigerten Konzentrationen lagen bei 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 5 mM und schliesslich 10 mM 5' vor der 8. stimulierten Vasokonstriktion. Bis zur einschliesslich 12. stimulierten Vasokonstriktion wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 4 Versuchsverläufen (HPV-DFO, HPV-Kontrolle, U46619-DFO, U46619-Kontrolle) festgestellt. Die 13., 14. und 15. hypoxische Vasokonstriktion wurden statistisch signifikant von ihrer Kontrolle und von der Spezifitätskontrolle mit U46619 durch Hemmung unterschieden. Gleichzeitig wurde auch die 13., 14. und 15. U46619-induzierte Vasokonstriktion durch Hemmung von ihrer Kontrolle unterschieden (siehe Abb. 11a).



**Abb. 11a:** Dargestellt ist der Einfluss von DFO auf die HPV und die U46619-induzierte pulmonale Vasokonstriktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollversuchen ohne DFO-Zugabe. Die kumulative Konzentration von 10 mM DFO war fünf Minuten vor der achten stimulierten Vasokonstriktion erreicht. Man erkennt eine Hemmung der 13., 14. und 15. HPV durch DFO. Die durch U46619 induzierte pulmonale Vasokonstriktion wird durch DFO ebenfalls gehemmt. (\*) zeigt den statistisch signifikanten Einfluss von DFO auf die HPV ( $p \leq 0,05$ ). Die Darstellung als Balkendiagramms wurde hier dem zweidimensionalen Koordinatensystem vorgezogen, um die relevanten Ergebnisse besser zur Geltung kommen zu lassen.

Auch für die Substanz DFO, bei der ein spezifischer inhibitorischer Effekt auf die HPV festgestellt wurde, wurde mittels der Basisdruckexperimente geprüft, ob der beobachtete Effekt auf eine alleinige Hemmung der HPV oder aber auf einen amplifikatorischen Einfluss auf den Basisdruck mit HPV-Hemmung zurückzuführen war. Es zeigte sich, dass DFO tendenziell einen basisdrucksenkenden Effekt ausübte; statistische Signifikanz wurde zu keinem der untersuchten Zeitpunkte festgestellt (siehe Abb. 11b).



**Abb. 11b:** Dargestellt sind die Verläufe des Basisdrucks bei durchgehend normoxischer Beatmung der Lungen ohne die Zugabe ( $\Delta$ ) von DFO sowie mit Zugabe von DFO ( $\blacktriangle$ ). Der Zeitpunkt  $t=0$  markiert den Moment der Zugabe von  $400 \mu\text{M}$  L-NMMA und  $1 \text{ mM}$  ASA. Der Nullpunkt der Ordinate ist der standardisierte Bezugspunkt für alle intraexperimentell erhobenen Rohdaten zum Zeitpunkt  $t=65'$ . Die gestrichelten Linien und die ihnen zugeordneten Zahlen deuten die Zeitpunkte der in HPV- und U46619-Experimenten sukzessiv erfolgenden pulmonalarteriellen Vasokonstriktion an. Alle Werte, mit Ausnahme des Nullpunkts der Ordinate, sind als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  angegeben. Zu keinem Zeitpunkt besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kurvenverläufen ( $p \leq 0,05$ ). Definitionsbedingt ( $\text{PAP}=0 \text{ mmHg}$  bei  $t=65'$ ) ergeben sich im Versuchsverlauf sowohl negative als auch positive  $\Delta\text{-PAP}$ -Werte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Grundlagen

#### **Experimenteller Modus zur Erfassung spezifischer Wirkungen eingesetzter Agenzien auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion**

Um eine Aussage über die spezifischen Eigenschaften des Hypoxie-Sensors oder des Signaltransduktionsweges der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion machen zu können war es notwendig,

1. eine statistisch signifikante Inhibition oder Augmentation der HPV durch die eingesetzten Substanzen, die in bestimmte biochemische Regulationswege eingriffen, gegenüber Kontrollexperimenten zu erzeugen, und
2. eine statistisch signifikante Inhibition oder Augmentation der Vasokonstriktion durch Hypoxie gegenüber Vasokonstriktionen durch U46619-Druckstimuli zu zeigen.

Die Vergleichbarkeit der verschiedenen vasokonstriktorischen Stimuli Hypoxie und U46619 als stabiles Prostaglandin  $A_2$ -Analogon war die Voraussetzung für die Beurteilung der Ergebnisse. Dies wurde für diesen experimentellen Ansatz bereits demonstriert (37). Der Vasokonstriktor U46619 wirkt an Thromboxan  $A_2$ -Rezeptoren (42, 43) und ist nach einhelliger Meinung direkt an der glatten Muskelzelle lokalisiert (44). Intrazellulärer „second messenger“ ist Inositol-(1,4,5)-triphosphat ( $IP_3$ ), welches über  $Ca^{2+}$ -Liberation in den glatten Muskelzellen die Vasokonstriktion vermittelt (43, 45, 46).

Der eingesetzte experimentelle Modus diente der Differenzierung spezifischer Einflüsse der eingesetzten Agenzien auf die HPV von unspezifischen, allgemein glattmuskuläre Kontraktion manipulierenden Wirkungen. Generelle Einflussnahme auf glattmuskuläre Kontraktion läßt sich lediglich als eine Wirkung auf die Endstrecke der HPV interpretieren, nicht als selektive Beeinflussung des Sensor- oder Signaltransduktionsweges, und ist somit in dem verwendeten experimentellen System nicht geeignet, spezifische Mechanismen der HPV-Regulation aufzudecken.

## 5.2 Interpretation möglicher Ergebniskonstellationen

Eine analoge Beeinflussung sowohl hypoxischer als auch pharmakologisch induzierter Vasokonstriktionen durch potentielle Aktivatoren oder Inhibitoren der HPV kann theoretisch zur Ursache haben:

- Eine unspezifische Wirkung der Substanz im Sinne einer generellen Inhibition oder Amplifikation glattmuskulärer Kontraktion; „upstream“ der Endstrecke „Muskelkontraktion“ liegende regulatorische Prozesse werden dabei überdeckt oder nicht beeinflusst.
- Eine spezifische Beeinflussung des HPV-Mechanismus liegt vor, wird jedoch durch eine zweite unabhängige, in ihrem Endergebnis aber gleichgerichtete Wirkung der eingesetzten Substanz auf U46619-Stimuli verdeckt.
- Eine spezifische Beeinflussung der HPV ist nicht möglich, da der Mechanismus der HPV mit dem von U46619-Vasokonstriktionen identisch ist.

Der zuletzt genannte Punkt kann ausgeschlossen werden. Bereits durch dieser Arbeit vorausgegangene Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass

- a) der biochemische Mechanismus der HPV-Regulation ist von Lipoxy- und Cyclooxygenaseprodukten unabhängig, das Prostanoid U46619 ist also nicht involviert (28).
- b) Eine selektive Beeinflussung der Vasokonstriktion auf hypoxischen Reiz wurde schon gezeigt und wird auch in der vorliegenden Arbeit mehrmals beschrieben. Es ist somit zweifelsfrei möglich, mit Agenzien spezifisch in den biochemischen Mechanismus der HPV einzugreifen, ohne dabei den Mechanismus der durch U46619 ausgelösten Vasokonstriktion zu treffen.

Das experimentelle Verfahren der Selektion HPV-spezifischer Mechanismen durch Vergleichsstimuli mittels U46619 oder auch Angiotensin II ist in der wissenschaftlichen Literatur mehrfach bestätigt und anerkannt (47, 48, 49, 50).

Das Vorgehen bei unterschiedlichen Auswirkungen auf hypoxische und pharmakologische Reize wurde als standardisiertes Versuchsprotokoll unter Kap. 3.2.1.4 „Evaluierung der Effekte der applizierten Substanzen“ beschrieben.

### **5.3 Untersuchungen zur NADPH-Oxidase**

#### **5.3.1 AEBSF**

AEBSF ist in der Vergangenheit in seiner Funktion als NADPH-Oxidase-Inhibitor sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene charakterisiert worden. AEBSF inhibiert die Vereinigung der Untereinheiten der Oxidase und somit die Funktion des Multiproteinkomplexes als Oxidase (41). Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf seine Funktion als Hämligand zurückzuführen ist (51, 52). Die Applikation von AEBSF zum Perfusatmedium führte zu einem transienten Anstieg des normoxischen Vasotonus (=Basisdruck), der zum Zeitpunkt der gemäß Standardversuchsprotokoll fünf Minuten nach Applikation folgenden pharmakologisch oder hypoxisch ausgelösten Vasokonstriktion nicht abgeklungen war. Die Auslösung einer solchen Vasokonstriktion fünf Minuten nach erfolgter AEBSF-Applikation führte zu einer spezifischen Amplifikation der HPV. Mit dem Ziel, den Einfluss von AEBSF auf hypoxisch und pharmakologisch induzierte Vasokonstriktionen *nach* dem Abklingen der transienten Vasokonstriktion zu untersuchen, wurde das Standardversuchsprotokolls modifiziert. AEBSF wurde vor der dritten, fünften und siebten stimulierten Vasokonstriktion dem Perfusat hinzugefügt, die Abfolge der stimulierten Vasokonstriktionen wurde nicht verändert, so dass die vierte, sechste und achte stimulierte Vasokonstriktion eines jeden solchen Versuchs unter dem Einfluss des AEBSF nach 30 Minuten Latenzzeit in der jeweiligen kumulativen Konzentration standen. Die Applikation von AEBSF führte nach einer Latenzzeit von 30 Minuten zu einer Inhibition der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion bei einer kumulativen Konzentration von 600  $\mu\text{M}$ , ohne jedoch die durch U46619 induzierte Vasokonstriktion zu beeinflussen. Um einen möglichen vasoaktiven Überlagerungseffekt durch NO auszuschliessen, wurden zusätzliche Experimente unter kontinuierlicher Inhibition der NO-Synthetase durch L-NMMA durchgeführt (53). Hierunter ergab sich eine sehr ähnliche Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen AEBSF und Beeinflussung der HPV, resp. U46619-induzierten Vasokonstriktion: AEBSF inhibierte die HPV in den kumulativen Dosen 100, 300 und 600  $\mu\text{M}$ , ohne dass die durch U46619

stimulierten Vasokonstriktionen beeinflusst wurden. Dies zeigt, dass die spezifische Wirkung des AEBSF auf die HPV von der Wirkung des vasodilatierenden Faktors NO unabhängig ist. Zusätzlich wurde eine Imitation der HPV durch AEBSF mittels separater Experimente unter dauerhafter Inhibition der NO-Synthetase und der Zykllooxygenase durch L-NMMA und ASA bei durchgehend normoxischer Beatmung ausgeschlossen.

AEBSF hatte einen amplifikatorischen Effekt auf die fünf Minuten nach Substanzzugabe folgende HPV bei den kumulativen Konzentrationen 300  $\mu\text{M}$  und 600  $\mu\text{M}$ , ohne die entsprechenden U46619-stimulierten Vasokonstriktionen zu beeinflussen. Unter Hemmung der NO-Synthese konnte kein amplifikatorischer Effekt auf die HPV beobachtet werden. Die U46619-induzierten Vasokonstriktionen wurden in den kumulativen Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  AEBSF amplifiziert. Bei unterbundener NO-Synthese wurde eine ca. 2,8fache Steigerung des Druckanstieg für HPV beobachtet (7,0mmHg/2,5mmHg; siehe Kap. 4, S. 45), für U46619-induzierte Vasokonstriktionen eine ca. 2,1fache Steigerung. Diese, durch L-NMMA hervorgerufene, stärkere Amplifizierung der hypoxisch, im Vergleich mit der durch U46619 induzierten Vasokonstriktion wurde an einem identischen Versuchsmodell bereits beobachtet (53). Es ist denkbar, dass eine durch NO-Synthese-Hemmung – im Gegensatz zu U46619-induzierten Vasokonstriktionen – die bereits maximal amplifizierte HPV durch AEBSF nicht mehr gesteigert werden kann.

Die inhibitorische Kapazität von AEBSF auf die NADPH-Oxidase im Kaninchen-Lungen-System wurde bestätigt durch die Messung des *oxidative burst* bei Alveolar-Makrophagen aus Kaninchenlungen nach bronchoalveolärer Lavage. Der *oxidative burst* wurde in dosisabhängiger Art und Weise durch AEBSF inhibiert.

### **5.3.2 PMSF und Aprotinin**

AEBSF wurde ursprünglich als irreversibler Serinprotease-Hemmstoff entwickelt (54). Die Experimente der vorliegenden Arbeit mit dem irreversiblen Serinproteaseinhibitor PMSF (55, 56) und dem reversiblen Hemmstoff Aprotinin (57, 58, 59, 60) haben auch in hohen Konzentrationen keinen dem AEBSF entsprechenden Effekt auf die HPV. Beide Proteaseinhibitoren hatten in den untersuchten Konzentrationen weder einen inhibitorischen noch einen amplifikatorischen Effekt, so dass es derzeit keinerlei Hinweise dafür gibt, dass die durch AEBSF ausgelösten Veränderungen der HPV auf diese bisher einzige beschriebene zusätzliche Wirkung des AEBSF zurückzuführen sind.

### 5.3.3 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zur NADPH-Oxidase

Mit AEBSF konnte erstmalig ein NADPH-Oxidase-Inhibitor mit einem spezifischen inhibitorischen Effekt auf die HPV beschrieben werden, der vollständig unabhängig von Diphenyleneiodonium (DPI) ist. Diese Tatsache ist bedeutsam, da alle vorherigen Untersuchungen, die einen Einfluss der NADPH-Oxidase auf die HPV unterstützten, auf dem inhibitorischen Potential des DPI auf die HPV basierten (21, 22, 50, 61). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Experimente mit L-NMMA, dass der inhibitorische Effekt des AEBSF von NO unabhängig ist und widersprechen somit Untersuchungen, die einen zusätzlichen Einfluss von NO auf den Sauerstoffsensormechanismus favorisieren (18, 61).

Lahiri et al. analysierten den Effekt von AEBSF auf das Entladungsmuster des Chemorezeptors im Karotissinus der Ratte (52). Sie zeigten, dass eine initiale Erregungsperiode dem inhibierenden Effekt von AEBSF vorausging. Diese Beobachtung ist bedeutsam für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in denen AEBSF dem Perfusatmedium hinzugefügt wurde. Die Hinzugabe führte zunächst zu einer Steigerung des pulmonalvaskulären Drucks, die mit einer spezifischen Amplifikation der HPV einherging. Daraufhin wurde die hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion spezifisch gehemmt, ohne die U46619-induzierte vasokonstriktorische Reaktion zu beeinflussen. Hypothetisch besteht die Möglichkeit, dass der transiente Anstieg des pulmonalvaskulären Drucks und der HPV durch die Interaktion des AEBSF mit dem Eisenatom des Häm der NADPH-Oxidase während der initialen Bindungsschritte des AEBSF an die NADPH-Oxidase verursacht wird (51, 52). Die offensichtliche Ähnlichkeit zwischen dem Wirkprofil des AEBSF beim Chemorezeptor des Karotissinus und im intakten Lungengefäßbett unterstützt die Vorstellung, dass dem beobachteten Effekt dieser Substanz in der Kaninchenlunge auf seinen Einfluss auf den Sauerstoffsensor oder die nach Hypoxie erfolgende Signaltransduktion zurückzuführen ist.

Für die phagozytäre NADPH-Oxidase ist bekannt, dass zwei transmembranäre Untereinheiten, ein Glykoprotein mit dem Molekulargewicht von 91 kDa (=gp91<sup>phox</sup>; *phox* = phagocyte oxidase) und ein kleineres, nicht-glykosiliertes 22 kDa-Protein (p22<sup>phox</sup>) gemeinsam das Flavocytochrom *b*<sub>558</sub> oder *b*<sub>559</sub> bilden (62, 63, 64, 65, 66, 67). Da die NADPH-Oxidase als Elektronendonator für die Katalyse von O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> fungiert, bedarf es eines NADPH-bindenden Proteins in der Nähe von gp91<sup>phox</sup>. Einerseits haben gleich mehrere

überzeugende Untersuchungen ein 67-kDa-Protein (=p67<sup>phox</sup>) als NADPH-bindendes Protein gezeigt (68, 69, 70, 71), andererseits wird auch gp91<sup>phox</sup> selbst als NADPH-bindendes Protein vermutet (65, 66, 72, 73). p47<sup>phox</sup> ist unabdingbar für die Bildung von O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>: zunächst war es bei Patienten mit autosomal-rezessiv vererbter progressiv-septischer Granulomatose (=chronic granulomatous disease = CGD) als fehlendes Phosphoprotein identifiziert worden (74, 75). Später konnte gezeigt werden, dass sein Fehlen die Ursache für eine von drei Formen der autosomal-rezessiv vererbten CGD ist (76, 77, 78). Die tatsächliche Rolle von p47<sup>phox</sup> ist unbekannt. Cross und Curnutte (79) vermuteten, dass es für den Elektronentransfer von FAD zum Hämzentrum des Flavoproteins verantwortlich ist. Auch p40<sup>phox</sup> besitzt evtl. eine Bedeutung für die NADPH-Oxidase, auch wenn es in einem zellfreien Untersuchungssystem nicht unmittelbar für die Bildung von O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> notwendig zu sein scheint. Möglicherweise hat es nur eine stabilisierende Wirkung in einem cytosolischen 240-kDa-Protein-Komplex, in dem sowohl p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup> in ruhenden neutrophilen Granulozyten vereinigt sind, da gezeigt werden konnte, dass p40<sup>phox</sup> an p67<sup>phox</sup> und p47<sup>phox</sup> bindet und bei Aktivierung der Neutrophilen zur Zellmembran transloziert (80, 81, 82, 83, 84, 85). Des Weiteren gibt es Hinweise für eine Bedeutung der GTP-bindenden Proteine Rap1A und Rac für die Funktionalität der NADPH-Oxidase. So konnte gezeigt werden, dass mit Rap1A-Mutanten (N17 und 63E, bei denen die Bildung von cGMP durch unveränderbare GDP-, resp. GTP-Bindung blockiert wurde) transfizierte differenzierte HL-60-Zellen oder Epstein-Barr-Virus (=EBV) -transformierte B-Zellen zu keinem normalen *oxidative burst* in der Lage waren (86, 87). Rac ist ein 22-kDa-GTP-bindendes Protein (88), das zeitgleich von zwei Gruppen als NADPH-Oxidase-Kofaktor identifiziert wurde, der unabdingbar für die optimale Bildung von O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> in Neutrophilen ist (89, 90). Rac1 wurde in Neutrophilen des Meerschweinchens gefunden, Rac2, das zu 92% homolog zu Rac1 ist, in humanen Neutrophilen (91, 92). Vermutlich ist Rac2 das in humanen Neutrophilen bedeutende Protein. Hinweise dafür sind, a) dass Heyworth et al. zeigten, dass Rac2 im Zytoplasma humaner Neutrophiler aktiver ist als Rac1 (93), b) dass 96% aller gefundenen Rac-Proteine in humanen Neutrophilen Rac2 sind (94, 95). Rac scheint nicht die Vereinigung der Untereinheiten zu beeinflussen, sondern eher die Aktivität des vereinigten Enzymkomplexes (95, 96, 97). Es ist wahrscheinlich, dass Rac modulierend auf ein oder mehrere Proteine der NADPH-Oxidase einwirkt und somit die Aktivität des Enzyms steigert. Diese Vorstellung wird durch mehrere Berichte gestützt, die eine Interaktion von Rac1 und/oder Rac2 mit p67<sup>phox</sup> und wahrscheinlich p47<sup>phox</sup> zeigten (95, 98, 99, 100, 101).

In Untersuchungen, die nach dem Abschluss der Experimente der vorliegenden Arbeit erfolgten, ergaben sich widersprüchliche Befunde hinsichtlich der Beteiligung einer NADPH-Oxidase am Mechanismus der HPV. Archer et al. beobachteten kürzlich, dass die Fähigkeit des Sauerstoffsensoring bei der gp91<sup>phox</sup>-defizienten (*knock-out*-) Maus erhalten ist (102). Diese Entdeckung spricht gegen eine Beteiligung der *phagozytären* NADPH-Oxidase bei dem Mechanismus der HPV. Sie kann jedoch nicht die Beteiligung einer nicht-phagozytären (*low-output*) –NADPH-Oxidase (61, 103, 104, 105, 106, 107) an der die HPV mediiierenden Signaltransduktion ausschliessen. Isoformen von Untereinheiten einer nicht-phagozytären NADPH-Oxidase (108) sind in mehreren Zelltypen nachgewiesen. Solche Isoformen unterscheiden sich z.B. durch a) die Aminosäuresequenz der gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit, b) dem Polymorphismus des p22<sup>phox</sup>-Gens (109), und c) der Beteiligung von Rac1 oder Rac2 (110). Die Klonierung der Untereinheit der *low-output*-NADPH-Oxidase, Mox1/NOH-1L, welche für das Homolog der katalytischen Untereinheit gp91<sup>phox</sup> der phagozytären NADPH-Oxidase kodiert, wurde kürzlich beschrieben (103, 111). Weissmann et al. entdeckten Transkripte von Mox1/NOH-1L oder einer stark homologen Sequenz in Kaninchen-Lungengewebe und in glattmuskulären Zellen der Kaninchen-Pulmonalarterie und -Arteriolen (112). Höhler et al. konnten kürzlich immunohistochemisch den Nachweis für die Existenz von p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie des Schweins erbringen (113). Diese Untersuchungen unterstützen das Konzept einer NADPH-Oxidase, die eine Untereinheit enthält, die sich von der phagozytären gp91<sup>phox</sup> unterscheidet und ein potentieller Kandidat für einen sauerstoffempfindlichen Multiproteinkomplex ist.

## **5.4 Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

### **5.4.1 DETC**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) und Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) im Signaltransduktionsmechanismus der HPV in intakten Kaninchenlungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Inhibitoren der Superoxiddismutase, DETC und TETA, eingesetzt (114, 115, 116).

DETC inhibierte dosisabhängig die HPV, ohne diese zu imitieren, d.h. ohne eine Steigerung des Vasotonus unter normoxischen Bedingungen zu verursachen. Dies zeigten die separat durchgeführten Experimente unter Inhibition der Vasodilatoren NO und Prostazyklin bei

durchgehend normoxischer Beatmung. Die U46619-induzierte Vasokonstriktion wurde in ähnlicher Art und Weise wie die HPV durch DETC inhibiert. Somit konnte keine Spezifität der Wirkung von DETC auf die HPV gezeigt werden. Dieses Resultat steht in Einklang mit Publikationen, die berichten, dass DETC als spezifischer intrazellulärer Inhibitor von SOD ungeeignet ist, da es mit Hämoglobin interagiert,  $H_2O_2$  produziert, Glutathion depletiert und wichtige Thiolgruppen von Schlüsselenzymen der Zelle alkyliert (114, 116). In den eigenen Versuchen konnte beim Vergleich der NO-Konzentrationen im Exhalat von DETC-beeinflussten und Kontrollungen gezeigt werden, dass die Zugabe von DETC die Konzentration von NO inkonstant alteriert. Die äußerst große Variabilität der Alteration ließ keine Signifikanz weder in Sinne einer Senkung noch einer Steigerung des exhalativen NO aufkommen. Dieses Resultat steht dennoch in Einklang mit dem Konzept von DETC als SOD-inhibierender Substanz. Die SOD-Inhibition lässt eine reduzierte Superoxid-Metabolisation zu  $H_2O_2$  erwarten. Es ist denkbar, dass das vermehrt anfallende  $O_2^{\bullet-}$  unter erhöhtem Verbrauch mit NO zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) reagiert (117, 118), wobei jedoch die oben beschriebenen und möglicherweise auch andere, noch unbekannte, Begleitreaktionen zu einer Überlagerung der reinen SOD-Inhibition führen und somit die exhalative NO-Konzentration inkonstant alteriert wird.

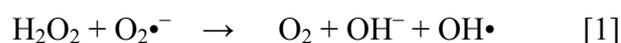
#### **5.4.2 TETA**

Die Applikation von TETA führte zu einer Hemmung der HPV in dosisabhängiger Art und Weise. In den Konzentrationen 10 mM, 20 mM und 25 mM TETA wurde die HPV signifikant inhibiert. Die durch U46619-induzierten Vasokonstriktionen wurden durch die Applikation von TETA nicht beeinflusst. Um auch hier eine Interaktion mit dem potenten Vasodilatator NO auszuschliessen, wurden entsprechende Experimente unter Zugabe von L-NMMA durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten ein nahezu identisches Wirkprofil von TETA auf die HPV, so dass eine Interferenz der TETA-Wirkung mit der pulmonalen NO-Synthese in Bezug auf die HPV-Regulation ausgeschlossen werden kann. Die beobachtete spezifische inhibitorische Wirkung von TETA beruht nicht auf eine Imitation der HPV, da separate Experimente entsprechend dem Standardversuchsprotokoll für Basisdruck-Untersuchungen eindeutig zeigten, dass TETA den normoxischen Vasotonus nicht beeinflusst.

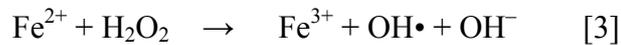
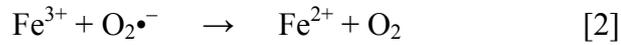
TETA konnte somit als eine Substanz charakterisiert werden, die in spezifischer Art und Weise den biochemischen Weg der Signaltransduktion der HPV beeinflusst, bzw. dessen Zielmolekül eine spezifische Rolle in der Signaltransduktion der HPV einnimmt. Diese Entdeckung widerspricht Untersuchungen an Pulmonalarterienringen des Meerschweinchens, in denen DETC und TETA die hypoxisch induzierte Vasokonstriktion a) amplifizierten und b) den normoxischen pulmonalarteriellen Basisdruck blande amplifizierten (114). Bei der Interpretation dieser divergierenden Resultate ist zu beachten, dass Abdalla et al. Ringe der Pulmonalarterie benutzten. Bereits die Untersuchungen von Staub et al. ergaben Hinweise dafür, dass die HPV in intakten Lungen im Bereich der kleinen präkapillären glatten Muskelzellen lokalisiert ist (13). Unterschiede zwischen diesen beiden Populationen glattmuskulärer Zellen sowohl konduktiver, als auch in Widerstandsgefäßen der Lunge wurden wiederholt beschrieben (22, 119, 120). Das Konzept von TETA als inhibitorisch auf die SOD wirkende Substanz wurde durch die Messung der SOD-Aktivität in homogenisiertem Lungengewebe, das nach Versuchsende gewonnen wurde, nachgewiesen: es konnte eine deutliche Reduktion der Aktivität durch TETA gezeigt werden. Auch die Bestimmung der exhalativen NO-Konzentration unterstützt die Annahme eines entscheidenden Einflusses der SOD und reaktiver Sauerstoffspezies auf die HPV. NO im Exhalat sank nach Zugabe von TETA dosisabhängig. Wie schon für DETC beschrieben, kann man eine durch SOD-Inhibition verminderte Umwandlung des Superoxids ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und konsekutiv eine erhöhte Metabolisation von NO zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) erwarten (117, 118). Für TETA sind jedoch – im Gegensatz zu DETC – keine bedeutsamen intrazellulären Begleitreaktion beschrieben, so dass die beobachtete Verringerung der exhalativen NO-Konzentration nicht gestört wurde.

### 5.4.3 DFO

1894 berichtete H. J. H. Fenton, dass das Eisenion die Oxidation der Apfelsäure durch Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) verstärkt (121). Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass die Kombination von  $H_2O_2$  und einem Eisensalz, *Fenton's Reagens*, ein effektives Oxidans für verschiedenste organische Substrate darstellt (121). 1934 vermuteten F. Haber und J. Weiss, dass das Hydroxylradikal das tatsächliche Oxidans solcher Systeme ist (122). Sie gingen dabei von einer Reaktion in mehreren Schritten aus, wobei die Reaktion



zwar thermodynamisch möglich ist (123), mehrere Versuche, sie zu demonstrieren, schlugen jedoch fehl (124, 125, 126), so dass schon längere Zeit allgemein akzeptiert wird, dass diese Reaktion nicht in bedeutenden Maße abläuft (127). Die Zugabe von Eisensalz katalysiert Reaktion [1] durch die Reaktionen



(127, 128, 129), wobei mit Gleichung [3] die klassische Fenton-Reaktion dargestellt ist. Diese eisenabhängige Produktion von Hydroxylradikalen (*eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion*) kann durch sogenannte Metallionen-Komplexbildner (=Chelatoren) gehemmt werden, z.B. durch Diethylenetriaminpentaacetat (DTPA) (127), Bathophenantrolinsulfonat (BPS) (130), Deferoxamin (DFO) (131). Untersuchungen des Sauerstoffsensor-Mechanismus an humanen Hepatomzellen (HepG2) (132, 133) zeigten, dass die nicht-enzymatische Degradation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bzw. die eisenabhängige Produktion von Hydroxylradikalen im Sinne der oben beschriebenen Fenton-Reaktion in der Signaltransduktion eines hypoxischen Reizes eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Experimenten mit DFO die Hypothese untersucht, dass eine eisenabhängige nicht-enzymatische Produktion von Hydroxylradikalen bedeutsam ist für den Mechanismus des Sauerstoffsensors oder der Signaltransduktion der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion.

DFO wurde schon früh als  $\text{Fe}^{3+}$ -komplexierendes Agens charakterisiert (134). Bei der Reaktion von  $\text{Fe}^{3+}$  mit DFO entsteht das stabile Ferrioxamin (134), wobei  $\text{Fe}^{3+}$  durch die Bildung eines Chelates dem Stoffwechselprozess entzogen wird. Als Desferal<sup>®</sup> hat DFO seine klinisch-therapeutischen Anwendungsgebiete bei Krankheiten, die mit einer chronischen Eisenüberladung des Körpers einhergehen, wie z.B. a) Transfusionshäm siderosen, insbesondere bei Thalassaemia major, chronischen Anämien, b) ideopathischer Hämochromatose und c) ggf. bei Porphyria cutanea tarda (135, 136). Zusätzlich kann Desferal<sup>®</sup> als diagnostisches Mittel zur Feststellung einer Eisenüberladung dienen (135, 136). In der vorliegenden Arbeit schliesslich inhibierte DFO die HPV signifikant stärker als U46619-induzierte Vasokonstriktionen. DFO beeinflusste den normoxischen Vasotonus in intakten Kaninchenlungen nicht, wie die separat durchgeführten Experimente unter Hemmung der NO- und Prostazyklin-Synthese bei durchgehend normoxischer Beatmung zeigten. Somit inhibiert DFO die HPV in der intakten Kaninchenlunge, aber imitiert diese nicht. Eine tatsächliche Verringerung der  $\text{OH}\cdot$ - und  $\text{OH}^-$ -Bildung vorausgesetzt, unterstützen die Experimente die Annahme, dass ein Anstieg von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und dem folgend ein Anstieg von Hydroxylradikalen und/oder Hydroxylionen als Auslöser der HPV während eines

Sauerstoffmangels fungiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass intrazelluläre Eisenatome für die Funktionalität vieler Stoffwechselprozesse steuernder Proteine essentiell sind, wie z. B. die Cytochrome *b* und *c* (Elektronentransport in der Atmungskette), die Cytochrome *a* und *a<sub>3</sub>* (O<sub>2</sub>-Reduktion unter Energiekonservierung), Cytochrom *P*-450 (Monooxygenasen), Katalasen und Peroxidasen (Oxidationen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Aconitase (Dehydrierung von Citrat zu Isocitrat im Zitronensäurezyklus), Succinatdehydrogenase (Oxidation von Succinat zu Fumarat im Zitronensäurezyklus) (137, 138) und seine Reaktion mit Deferoxamin Stoffwechselprozesse stören kann (139, 140), für die mögliche Interaktionen mit der hier untersuchten hypoxisch induzierten Vasokonstriktion in ihrem Ausmaß noch nicht untersucht sind.

#### **5.4.4 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zu reaktiven Sauerstoffspezies**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass Änderungen der Superoxidanion-, der Hydrogenperoxid- und konsekutiv der Hydroxylradikal-Bildung ursächlich für die Mechanismen des Sauerstoffsensing und der Signaltransduktion sind. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen vorangehender Untersuchungen. Aktivierte NAD(P)H-Oxidasen produzieren Superoxid, welches rasch, katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD), zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt wird (141). Untersuchungen mit Diphenyleneiodonium (DPI) und Nitroblautetrazolium (NBT), ein die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung blockierender „Superoxid scavenger“, an Kaninchen- (21) und Rattenlungen (142) lenkten den Verdacht auf eine superoxid-generierende NAD(P)H-Oxidase als zentrales Element in der HPV-Regulation. Schliesslich zeigten Mohazzhab und Wolin die Beteiligung einer mikrosomalen NADH-Cytochrom *b*<sub>558</sub>-Oxidoreduktase an der Vasokonstriktion auf hypoxischen Reiz an Pulmonalarterienringen des Kalbes (106).

Paky et al. konnten die Superoxid- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in der Lunge beweisen (143). Untersuchungen hinsichtlich der Fragestellung, ob eine erhöhte oder erniedrigte Superoxid- und Hydrogenperoxid-Bildung im Transduktionsmechanismus der HPV ursächlich für die Vasokonstriktion sind, sind bisher widersprüchlich. Zwei verschiedene Konzepte der Superoxid-Anionen-vermittelten HPV-Regulation sind aufgrund der eigenen und der Daten der Literatur zu diskutieren:

1. Die hypoxische Ventilation führt zu einer *Zunahme* der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in für die HPV-Regulation spezifischen Zellkompartimenten und mündet in der Vasokonstriktion.
2. Die hypoxische Ventilation führt zu einer *Abnahme* der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (Superoxid-Anion,  $H_2O_2$ ) und löst die Vasokonstriktion aus (Konzept der tonischen, normoxischen, cGMP-abhängigen Vasodilatation).

Zu 1.:

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte  $H_2O_2$ -Konzentration möglicherweise der Auslöser für die HPV ist. Diese Vermutung basiert auf der Tatsache, dass sowohl DPI als auch NBT die HPV in blutfrei perfundierten Kaninchenlungen inhibierten, aber nicht imitierten (21, 142). Eine erhöhte Superoxid-Bildung wurde von Marshall et al. bei glattmuskulären Arteriolen der pulmonalen Gefäßstrombahn des Kalbes (22) und von Chandel et al. für Hepatom-Zellen (Hep3B) *in vitro* (19) beschrieben. Die Ergebnisse der angeführten Versuchsansätze weisen auf eine, von der sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ )-gesteuerten NO-Synthese unabhängige,  $pO_2$ -regulierte NADPH-Oxidase-Aktivität hin.

Zu 2.:

Basierend auf der Beobachtung reduzierter  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung der Lunge unter Hypoxie (106, 143) wurde das Konzept der tonischen, normoxischen Vasodilatation vorgeschlagen: im Lungengewebe produzierte Superoxidradikale werden durch SOD zu Wasserstoffperoxid metabolisiert. Zwei Moleküle  $H_2O_2$  reagieren demnach, katalysiert durch Katalase, weiter zu  $H_2O$  und  $O_2$ . Durch Anlagerung eines Moleküles  $H_2O_2$  an Katalase sei die Bildung eines intermediären *Katalase-Compound-I*-Komplexes möglich, welcher eine NO-unabhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit konsekutiver vasodilatierend wirkender cGMP-Bildung bewirken kann (18). Die hypoxische Ventilation soll demnach zunächst einen Abfall der Superoxid-/ $H_2O_2$ -Bildung bewirken, dann die verminderte Bildung von *Katalase-Compound-I*, was zu einer reduzierten cGMP-Bildung führt und somit zum Verlust der tonischen Vasodilatation, also zum Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (18, 144). Die  $pO_2$ -abhängige NO-Synthese unterstützt demnach die cGMP-Abnahme bei Hypoxie gleichsinnig.

Zu 1. und 2.:

Im Gegensatz zu der von Burke-Wolin und Wolin (144) formulierten Hypothese des hypoxisch induzierten Superoxid- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationsabfalls lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und unter Beachtung kürzlich erschienener Arbeiten das folgende Konzept entwickeln:

Die hypoxische Ventilation mit nachfolgender Senkung des  $\text{pO}_2$  führt

a) zur Aktivierung einer nicht-phagozytären-NADPH-Oxidase, welche daraufhin in spezialisierten Kompartimenten der Zelle die Menge an Superoxid-Anion erhöht. Dies ist schlüssig, da eine pharmakologische Reduktion der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Menge (z. B. durch AEBSF) nach diesem Konzept zu einer Reduktion der HPV führt, nicht jedoch zu einem Anstieg des Basisdrucks unter normoxischer Beatmung, was die Imitation einer HPV bedeuten würde. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch Untersuchungen von Marshall et al., die eine NADPH-Oxidase-abhängige Superoxid-Generierung in glatten Muskelzellen kleiner boviner Pulmonalarterien nachweisen konnten (22), sowie durch die Arbeit von Höhler et al. (145), die den Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies unter Hypoxie in Phäochromozytomzellen nachweisen konnte.

b) Die durch Hypoxie erhöhte Menge an Superoxid-Anionen wird durch SOD zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt. So führt die Inhibition der SOD, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu einer spezifischen Hemmung der HPV, nicht aber zu einer Imitation dieser. Auch dies ist schlüssig, da eine pharmakologisch so induzierte Reduktion der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (z. B. durch TETA) nach diesem Konzept zwar zu einer Reduktion der HPV führt jedoch nicht zu einem Anstieg des Basisdrucks unter normoxischer Beatmung, wie es für das Modell der tonischen Vasodilatation gefordert ist.

c) Die erhöht anfallende Menge von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zerfällt unter Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{OH}^-$  und  $\text{OH}^\bullet$ ; unter erneuter Oxidation eines  $\text{Fe}^{2+}$  wird  $\text{OH}^\bullet$  zu  $\text{OH}^-$  reduziert. Unterstützt wird diese Hypothese durch Arbeiten an Hepatomzellen (HepG2), in denen gezeigt werden konnte, dass DFO die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige Fluoreszenz von Dihydrorhodamin 123 reduziert (133). Dihydrorhodamin 123 wird in der zitierten Arbeit als intrazellulärer Hydroxylradikal-*scavenger* und -marker benutzt. Die Untersuchungen lassen vermuten, dass Hydroxylradikale,

generiert durch eine Fenton-Typ-Reaktion aus Hydrogenperoxid, als Mediatoren des Hypoxiesignals dienen (146).

Chandel et al. stellen kürzlich das Modell einer mitochondrialen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als das zentrale Ereignis des Hypoxie-Sensing-Mechanismus vor (19). Diese Untersuchungen gehen von einer ROS-Produktion durch die mitochondriale Atmungskette aus. Diese Experimente wurden an der Hepatomzelllinie Hep3B durchgeführt. Sie postulieren einen NAD(P)H-Oxidase-unabhängigen Mechanismus von gesteigerter ROS-Bildung bei verminderter Sauerstoffspannung und der davon abhängigen Transkriptionsregulation. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse widersprechen diesem Konzept nicht, wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine mitochondriale „NADPH-Oxidase-ähnliche Aktivität“ zugänglich für die Inhibition durch sowohl DPI als auch AEBSF ist. Bisher ist eine solche inhibitorische Wirkung von AEBSF jedoch nicht nachgewiesen.

#### *Endstrecke der Signaltransduktion der HPV*

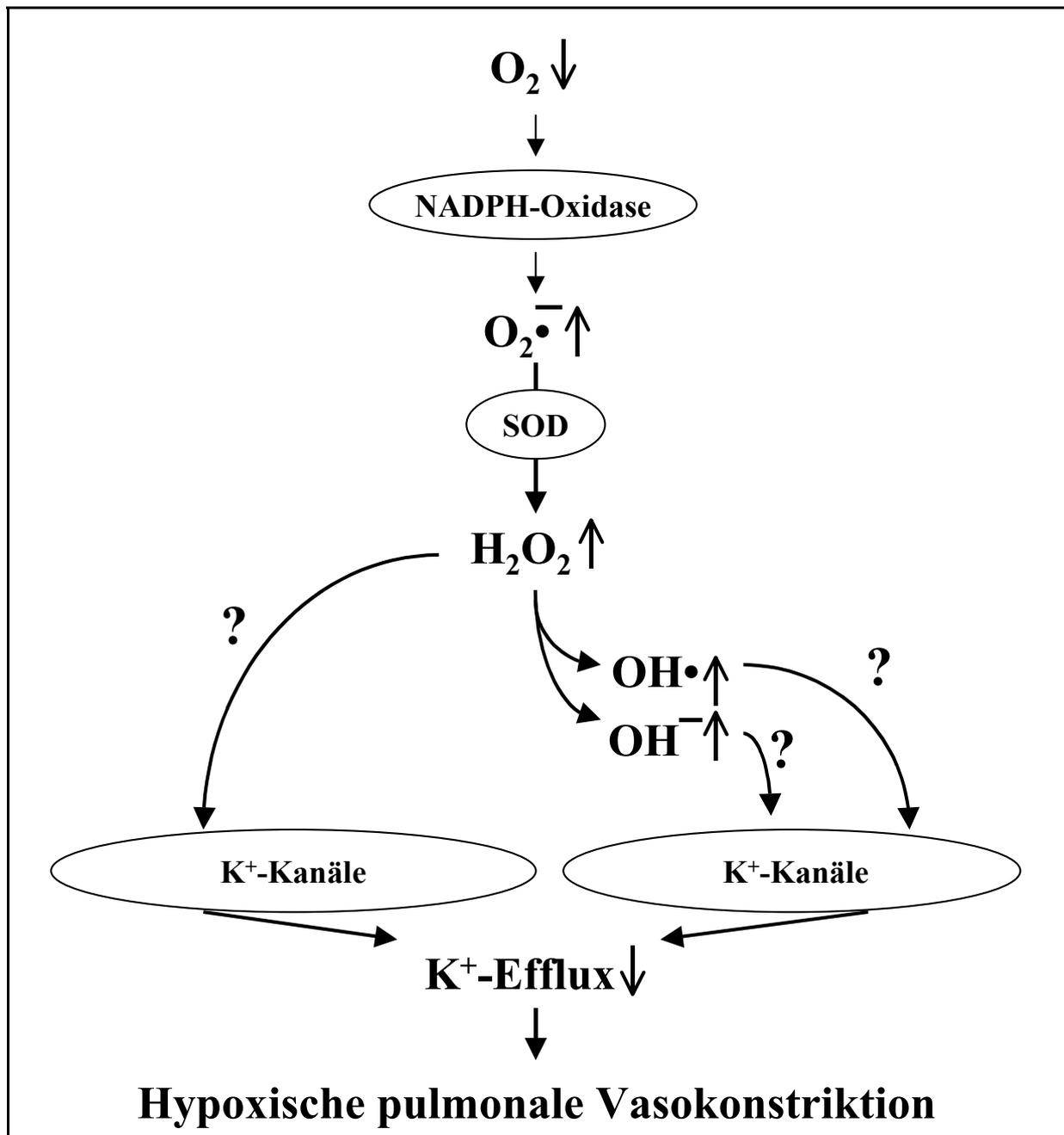
In der Signaltransduktion der HPV ist der glattmuskulären Kontraktion eine Membrandepolarisation und einem Kalziumsignal vorgeschaltet (26). Ein schlüssiges Konzept geht davon aus, dass diese sauerstoffabhängige Membrandepolarisation durch K<sup>+</sup>-Kanäle eingeleitet wird (147, 148), deren hypoxisch vermittelte verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit in einem verringerten K<sup>+</sup>-Efflux resultiert; dies führt zur Depolarisation der Zellmembran und Aktivierung von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, wodurch die intrazelluläre Konzentration von Ca<sup>2+</sup> [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> steigt und so die Kontraktion der glatten Muskelzelle auslöst (26). Bisher ist der Weg der Signaltransduktion von einem hypoxischen Reiz zu einer verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der K<sup>+</sup>-Kanäle nicht bekannt. In der näheren Vergangenheit wurden hauptsächlich diskutiert, ob eine hypoxisch induzierte Veränderung des Redoxstatus elektronenübertragender Systeme (NADH/NAD<sup>+</sup>, GSH/GSSG) (149, 150) zu einer verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der K<sup>+</sup>-Kanäle führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Experimenten mit den Substanzen AEBSF, TETA und DFO weisen darauf hin, dass ein *Anstieg* reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bedeutsam ist bei der Signaltransduktion der HPV. Dieser postulierte hypoxie-induzierte Anstieg von ROS hätte durch die Reduktion des Anteils reduktiver Elemente eine Verschiebung des Redoxpotentials zu einem insgesamt oxidativen Gesamtstatus zur Folge. Beispiele betroffener Redoxpaare sind das Tripeptid Glutathion (GSH→GS-SG), das Coenzym Nicotinamiddinucleotid (NADH→NAD<sup>+</sup>), Flavinadenindinucleotid (FADH

→FAD<sup>+</sup>). Dieses Ergebnis und seine Schlussfolgerung widersprechen somit Untersuchungen, die einen reduzierten intrazellulären Redoxstatus während der HPV beobachteten (151), und Untersuchungen, in denen Hypoxieeffekte auf K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch reduziertes Glutathion (GSH) imitiert wurden (152). Dieser Widerspruch muss zunächst ungeklärt bleiben, schliesslich können aufgrund der vielen möglichen Interaktionen, insbesondere des Hydroxylradikals, durchaus noch weitere Reaktionsschritte involviert sein (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/ONOO<sup>-</sup>).

Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration *vor* der Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der K<sup>+</sup>-Kanäle. Es ist auch denkbar, dass eine direkte Beeinflussung der für die Depolarisation der Zellmembran verantwortlichen K<sup>+</sup>-Kanäle durch OH<sup>-</sup> und/oder OH<sup>•</sup> stattfindet. Hinweise für die Möglichkeit einer unmittelbar an K<sup>+</sup>-Kanäle gekoppelten NADPH-Oxidase, die über eine hypoxisch veränderte strukturelle Konformation oder über ein hypoxisch verändertes Aktivitätsniveau direkt die Öffnungswahrscheinlichkeit der für die Depolarisation der Zellmembran verantwortlichen K<sup>+</sup>-Kanäle vermindert, fehlen, sind aber auch nicht auszuschliessen.

Zusammenfassend kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit präsentierten und diskutierten Ergebnisse folgender Mechanismus für Sauerstoffsensor und Signaltransduktion der hypoxisch induzierten Vasokonstriktion formuliert werden (siehe Abb. 12).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des Konzeptes der Regulation der hypoxischen Vasokonstriktion auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Ein Abfall des alveolären  $PO_2$  führt demnach auf bisher unbekannte Weise 1) zur Steigerung der Superoxid-Anion-Konzentration durch eine membranständige NADPH-Oxidase (z. B. durch Konformationsänderung des Flavocytochrom  $b_{558}$  mit konsekutiver Aktivitätssteigerung). Superoxid-Anionen, das durch SOD katalysierte  $H_2O_2$ , Hydroxylionen oder Hydrodxylylradikale bewirken durch einen ebenfalls noch im Dunkeln liegenden Mechanismus die glattmuskuläre Kontraktion, z. B. über die Modulation membranständiger  $K^+$ -Kanäle. Der direkte oder indirekte (z. B. ein verändertes Redoxpotential elektronentransportierender Systeme) Einfluss der ROS bewirkt eine Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit der  $K^+$ -Kanäle, damit einen sinkenden  $K^+$ -Efflux aus der glatten Muskelzelle, Depolarisation der Zellmembran mit nachfolgender Kontraktion der Zelle.

## 6 Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) dient der Anpassung der Perfusions- an die Ventilationsbedingungen in der Lunge und sorgt für die Optimierung der arteriellen Oxygenierung und Minimierung des pulmonalen Shuntflusses. Durch lokale Vasokonstriktionen in hypoxischen Arealen wird die Perfusion dieser Areale gedrosselt und der Blutfluss somit in gut ventilierte Areale der Lunge umgeleitet. Trotz der bereits 1946 erfolgten Beschreibung dieses essentiellen Mechanismus durch von Euler und Liljestrand ist bis heute die Natur des Sauerstoffsensors und des Signaltransduktionsmechanismus, der letztendlich zur pulmonalen Vasokonstriktion führt, nur zu geringen Teilen geklärt. Reaktive Sauerstoffspezies stehen in Verdacht, eine ursächliche Rolle in der Signaltransduktion zu spielen.

Zur Untersuchung des Sauerstoffsensor- und Transduktionsmechanismus der HPV diente das etablierte Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und artifiziell ventilierten Kaninchenlunge. Mit diesem von zentralnervösen, humoralen und metabolischen Faktoren des Tierkörpers unabhängigen experimentellen System konnten physiologische Organreaktionen anhand der Parameter „pulmonalarterieller Druck“, „pulmonalvenöser Druck“, „Ventilationsdruck“, „Lungenmasse“ und anhand geeigneter Versuchsmodi untersucht werden.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war:

- I. Die Evaluierung der Bedeutung einer NADPH-Oxidase für die Regulation der HPV in intakten Kaninchenlungen. Vorausgehende Untersuchungen zu dieser Fragestellung ergaben positive Befunde, basierten jedoch nur auf den Ergebnissen zu einem einzigen Hemmstoff einer NADPH-Oxidase, Diphenyleneiodonium (DPI).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein strukturell von DPI unabhängiger Hemmstoff einer NAD(P)H-Oxidase hinsichtlich seiner Wirkung auf die HPV mit Erfolg am Lungenmodell erprobt. AEBSF hemmte die HPV an der isolierten Kaninchenlunge spezifisch im Vergleich zu nicht-hypoxie-induzierten Vasokonstriktionen, ausgelöst durch das Thromboxan-Mimetikum U46619. Es konnte also das Konzept einer NADPH-Oxidase als zentrales Element im Sauerstoffsensor- oder Signaltransduktions-mechanismus unterstützt werden.

- II. Die Evaluierung der Funktion reaktiver Sauerstoffspezies für die Regulation der HPV im intakten Organ. Die Ergebnisse der auf dem Feld der Sauerstoffsensoren und O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation tätigen Arbeitsgruppen brachten bisher im wesentlichen zwei sich widersprechende Konzepte der Regulation der HPV durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervor.

Das erste Konzept der ROS-abhängigen tonischen normoxischen Vasodilatation basiert auf einer dauerhaften H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten cGMP-Bildung unter normoxischen Bedingungen. Dieser Theorie folgend nimmt unter Hypoxie die ROS-Produktion ab, konsekutiv sinken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und vasodilatatorisch wirkende cGMP-Konzentrationen und es kommt zur Vasokonstriktion.

Das zweite Konzept postuliert einen gegensinnigen Verlauf von alveolärer Sauerstoffkonzentration und ROS-Konzentration. Eine Hypoxie führt demnach zum Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies in für die HPV-Regulation wichtigen Zellkompartimenten. Diese Sauerstoffradikale führen durch einen noch nicht verstandenen Mechanismus zur hypoxischen Vasokonstriktion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen das zweite Konzept. Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mit Triethyltetraamin (TETA), ein Hemmstoff der SOD, gelang es, spezifisch und dosisabhängig die HPV in der intakten Kaninchenlunge zu inhibieren. TETA verursachte jedoch keine Vasokonstriktion unter normoxischen Bedingungen. Dies steht ebenfalls in Einklang mit dem Konzept des Anstiegs von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Hypoxie als Stimulus für die HPV, denn bei gesteigerter Radikal- und konsekutiver H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung unter Hypoxie als Stimulus der HPV sollte eine Erniedrigung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge durch Inhibition der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung (durch den SOD-Hemmstoff TETA) eine HPV verhindern, jedoch nicht zu einer HPV-Imitation führen.

Zusammenfassend kann aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit postuliert werden, dass eine NADPH-Oxidase in den Mechanismus des Sauerstoffsensoring oder in der Signaltransduktion der HPV involviert ist. Die Ergebnisse stützen weiterhin die Hypothese eines hypoxisch induzierten O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- und konsekutiven H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anstiegs in für die HPV

essentiellen Zellkompartimenten als wesentlichen Schritt in der Signaltransduktion der hypoxisch induzierten Vasokonstriktion der Lunge.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- 1 Von Euler, U.S., and G. Liljestrand (1946). Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 12: 301-320.
- 2 Cutaia, M., and Rounds (1990). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 97: 706-718.
- 3 Bartels, H., P. Dejours, H. Kellog, and J. Mead (1973). Glossary on respiration and gas exchange. *J. Appl. Physiol.* 34: 549-558.
- 4 Voelkel, N. F. (1986). Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 1186-1194.
- 5 Crystal, R. G., and J. B. West (eds.) (1991). *The Lung*. Raven Press, New York.
- 6 Fishman, A. P. (ed.) (1998). *Pulmonary diseases and disorders*. Second edition. McGraw-Hill Book-Company.
- 7 Jolin, A., and L. Bjertnæs (1991). Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the adult respiratory distress syndrom. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35 (Suppl.): 40-54.
- 8 Marshall, B. E. (1990). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 94 (Suppl.): 37-41.
- 9 Emergy, C.J. (1994). Vascular remodelling in the lung. *Eur. Respir. J.* 7: 217-219.
- 10 Riede, U.-N., H.-E. Schäfer (Hrsg.) (1993). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- 11 Scherrer, U., L. Vollenweider, A. Delabays, M. Savcic, U. Eichenberger, G. R. Kleger, A. Fikrle, P. E. Ballmer, P. Nicod, and P. Bäertsch (1996). Inhaled nitric oxid for highaltitude pulmonary edema. *N. Engl. J. Med.* 334: 624-629.

- 
- 12 Oelz, O., M. Maggiorini, M. Ritter, C. Noti, U. Waber, P. Vock, and P. Bärtzsch (1992). Pathophysiologie, Prophylaxe und Therapie des Höhenlungenödems. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 122: 1151-1158.
  - 13 Staub, N.C. (1985). Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 88 (Suppl.): 240S-245S.
  - 14 Sylvester, J. T., J. E. Gottlieb, P. Rock, and R. C. Wetzel (1986). Acute hypoxic responses. In: Bergofsky, E. H. (ed.). *Abnormal pulmonary circulation*: 127-165. Churchill, Livingstone.
  - 15 Weibel, E.R., and C. R. Taylor (1988). Design and structure of the human lung. In: Fishman, A. P. (ed.). *Pulmonary diseases and disorders*: 11-60. Second edition. McGraw-Hill Book Company, New York.
  - 16 Acker, H. E., E. Dufau, J. Huber, and D. Sylvester (1989). Indications to an NADPH oxidase as a possible PO<sub>2</sub> sensor in the rat carotid body. *FEBS Lett.* 256: 75-78.
  - 17 Priestersbach, R., F. Grimminger, N. Weissmann, D. Walmrath, and W. Seeger (1995). On line measurement of nitric oxide generation in buffer-perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 78: 1502-1508.
  - 18 Monaco, J. A., and T. Burke-Wolin (1995). NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mechanisms of guanylate cyclase activation in oxygen-dependent responses of rat pulmonary circulation. *Am. J. Physiol.* 268: L546-L550.
  - 19 Chandel, N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon, and P. T. Schumacker (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11715-11720.
  - 20 Kozłowski, R. Z. (1995). Ion channels, oxygen sensation and signal transduction in pulmonary arterial smooth muscle. *Cardiovasc. Res.* 30: 318-325.

- 
- 21 Grimminger, F., N. Weissmann, R. Spriestersbach, E. Becker, S. Rousseau, and W. Seeger (1995). Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Am. J. Physiol.* 268: L747-L752.
  - 22 Marshall, C., A. J. Mamary, A. J. Verhoven, and B. E. Marshall (1996). Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 15: 633-644.
  - 23 Tamayo, L., J. R. Lopez-Lopez, J. Castaneda, and C. Gonzales (1997). Carbon monoxide inhibits pulmonary vasoconstriction in rats by a cGMP-independent mechanism. *Pflugers Arch.* 434: 698-704.
  - 24 Janssens, S. P., K. D. Bloch, Z. Nong, R. D. Gerard, P. Zoldhelyi, and D. Collen (1996). Adenoviral-mediated transfer of the human endothelial nitric oxide synthase gene reduces acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *J. Clin. Invest.* 98: 317-324.
  - 25 Kashimura, O., and A. Sakai (1995). Lung cyclic nucleotids in exercise trained rats attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Lung* 173: 363-372.
  - 26 Weir, E. K., and S. L. Archer (1995). The mechanisms of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: two tale of two channels. *FASEB J.* 9: 183-189.
  - 27 Park, M. K., S. H. Lee, W. K. Ho, and Y. E. Earm (1995). Redox agents as a link between hypoxia and the responses of ionic channels in rabbit pulmonary vascular smooth muscle. *Exp. Physiol.* 80: 835-542.
  - 28 Weissmann, N., W. Seeger, J. Conzen, L. Kiss, and F. Grimminger (1998). Effects of arachidonic acid metabolism on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Eur. J. Pharmacol.* 356: 231-237.
  - 29 Fishman, A. P. (1976). Hypoxia on the pulmonary circulation. *Circ. Res.* 38: 221-231.

- 
- 30 Zhang, F., R. C. Carson, H. Zhang, G. Gibson, and H. M. Thomas 3<sup>rd</sup> (1997). Pulmonary arterial smooth muscle cell  $[Ca^{2+}]_i$  and contraction: responses to diphenyleneiodonium and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 273: L603-L611.
- 31 Kantrow, S.P., Y. C. Huang, A. R. Whorton, E. N. Grayck, J. M. Knight, D. S. Millington, and C. A. Piantadosi (1997). Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am. J. Physiol.* 272: L1167-L1173.
- 32 Seeger, W., D. Walmrath, F. Grimminger, S. Rousseau, H. Schütte, H. J. Krämer, L. Ermert, and L. Kiss (1994). Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 233: 549-584.
- 33 Gregory, T. J., M. L. Ellsworth, and J. C. Newell (1984). Hypoxic pulmonary vasoconstriction during steady and pulsatile flow in ferrets. *J. Appl. Physiol.* 57: 205-212.
- 34 Tucker, A. and J. T. Reeves (1975). Nonsustained pulmonary vasoconstriction during acute hypoxia in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 228: 756-761.
- 35 McMurtry, I. F., B. W. Hookway, and S. D. Roos (1978). Red blood cells but not platelets prolong vascular reactivity of isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 234: H186-H191.
- 36 Unger, M., M. Atkins, W. A. Briscoe, and T. K. C. King (1977). Potentiation of pulmonary vasoconstrictor response with repeated intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 43: 662-667.
- 37 Weissmann, N., F. Grimminger, D. Walmrath, and W. Seeger (1995). Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir. Physiol.* 100: 159-169.
- 38 Cohen, H. J., and M. E. Chovaniec (1978). Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea-pig granulocytes. *J. Clin. Invest.* 61: 1081-1087.
- 39 Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-59.

- 
- 40 Beyer, W., J. Imlay, and I. Fridovich (1991). Superoxide Dismutases. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40: 221-253.
- 41 Diatchuk, V., O. Lotan, V. Koshkin, P. Wikstroem, and E. Pick (1997). Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J. Biol. Chem.* 272: 13292-13301.
- 42 Crichton, C. A., A. G. B. Templeton, J. C. McGrath, and G. L. Smith (1993). Thromboxane A2 analogue, U-46619, potentiates calcium-activated force in human umbilical artery. *Am. J. Physiol.* 264: H1878-1883.
- 43 Crichton, C. A., A. G. B. Templeton, J. C. McGrath, and G. L. Smith (1992). The effect of a stable thromboxane analogue, U46619, on calcium-activated force in  $\alpha$ -toxin-permeabilized human umbilical artery. *J. Physiol. (Lond.)* 446: 491P.
- 44 Bergofsky, E. H. (1974). Mechanisms underlying vasomotor regulation of regional pulmonary blood flow in normal and disease states. *Am. J. Med.* 57: 378-394.
- 45 Kreye, V. A. W., F. P. Gerstheimer, and R. Rittinghausen (1989). Regulation of vascular smooth muscle function. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
- 46 Repke, H. und C. Liebermann (1987). Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. VCH, Weinheim.
- 47 Gottschall, E. B., S. Fernyak, G. Wuertemberger, and N. F. Voelkel (1992). Almitrine mimics hypoxic vasoconstriction in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 263: H383-H391.
- 48 Mazmanian, G. M., B. Baudet, C. Brink, J. Cerrina, S. Kirkiacharian, and M. Weiss (1989). Methylene blue potentiates vascular reactivity in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 66: 1040-1045.
- 49 McCormack, D. G., and N. A. M. Paterson (1989). The contrasting influence of two lipoxygenase inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction in anaesthetized pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 100-105.

- 
- 50 Thomas<sup>3rd</sup>, H. M., R. C. Carson, E. D. Fried, and R. S. Novitch (1991). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by diphenyleneiodonium. *Biochem. Pharmacol.* 42: R9-R12.
- 51 Edwards, S. L., and T. L. Poulos (1990). Ligand binding and structural perturbations in cytochrome *c* peroxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 2588-2595.
- 52 Lahiri, S., W. Ehleben, and H. Acker (1999). Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the carotid body: role of heme ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9427-9432.
- 53 Grimminger, F., R. Spriestersbach, N. Weissmann, D. Walmrath, and W. Seeger (1995). Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 78: 1509-1515.
- 54 Megyeri, P., Pabst, K. M., and Pabst, M. J. (1995). Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* 86: 629-635.
- 55 Gold, A. M., and D. Fahrney (1964). Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. formation and reactions of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin. *Biochemistry* 3: 783-91.
- 56 Turini, P., S. Kurooka, M. Steer, A. N. Corbascio, and T. P. Singer (1969). The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 167: 98-104.
- 57 Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, and E. Werle (1968). Chemistry and biochemistry of proteinase inhibitors from mammalian tissues. *Ann. N Y Acad. Sci.* 146: 400-413.
- 58 Werle, E., I. Trautschold, H. Haendle, and H. Fritz (1968). Physiologic, pharmacologic, and clinical aspects of proteinase inhibitors. *Ann. N Y Acad. Sci.* 146: 464-478.
- 59 Trautschold, I., E. Werle, G. Zickgraf-Rudel (1966). Über den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor. *Arzneimittelforschung* 16: 1507-1515.

- 
- 60 Fritz, H., I. Trautschold, and E. Werle (1966). Bestimmung der Molekulargewichte von neuen Trypsin-Inhibitoren mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 342: 253-263.
- 61 Mohazzab, K. M., R. P. Fayngersh, P. M. Kaminski, and M. S. Wolin (1995). Potential role of NADPH oxidoreductase-derived reactive O<sub>2</sub> species in calf pulmonary arterial PO<sub>2</sub>-elicited responses. *Am. J. Physiol.* 269: L637-L644.
- 62 Segal, A. W., and O. T. G. Jones (1978). Novel cytochrome *b* system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276: 515-517.
- 63 Parkos, C. A., R. A. Allen, C. G. Cochrane, and A. J. Jesaitis (1987). Purified cytochrome *b* from human granulocyte plasma membrane is composed of two polypeptides with relative molecular weights of 91.000 and 22.000. *J. Clin. Invest.* 80: 732-742.
- 64 Parkos, C. A., R. A. Allen, C. G. Cochrane, and A. J. Jesaitis (1988). The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. *Biophys. Acta* 932: 71-83.
- 65 Segal, A. W., I. West, F. Wientjes, J. H. A. Nugent, A. J. Chavan, B. Haley, R. C. Garcia, H. Rosen, and G. Scarce (1992). Cytochrome *b*<sub>245</sub> is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* 284: 781-788.
- 66 Rotrosen, D., C. L. Yeung, T. L. Leto, H. L. Malech, and C. H. Kwong (1992). Cytochrome *b*<sub>558</sub>. The flavin-binding component of the phagocyte NADPH-oxidase. *Science* 256: 1459-1462.
- 67 Jesaitis, A. J. (1995). Structure of human phagocyte cytochrome *b* and its relationship to microbicidal superoxide production. *J. Immunol.* 155: 3286-3288.
- 68 Umei, T., K. Takeshige, and S. Minakami (1986). NADPH binding component of neutrophil superoxide-generating oxidase. *J. Biol. Chem.* 261: 5229-5232.

- 
- 69 Umei, T., K. Takeshige, and S. Minakami (1987). NADPH binding component of the superoxide-generating oxidase in unstimulated neutrophils and neutrophils from the patients with chronic granulomatous disease. *Biochem. J.* 243: 467-472.
- 70 Smith, R. M., J. T. Curnutte, and B. M. Babior (1989). Affinity labelling of the cytosolic and membrane components of the respiratory burst oxidase by the 2,3-dialdehyde derivative of NADPH. Evidence for a cytosolic location of the nucleotide-binding site in the resting cell. *J. Biol. Chem.* 264: 1958-1962.
- 71 Smith, R. M., J. A. Connor, L. M. Chen, and B. M. Babior (1996). The cytosolic subunit p67<sup>phox</sup> contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leucocyte NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 98: 977-983.
- 72 Taylor, W. R., D. T. Jones, and A. W. Segal (1993). A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome *b*<sub>245</sub> b-chain. *Protein Science* 2: 1675-1685.
- 73 Doussiere, J., G. Brandolin, V. Derrien, P. V. Vignais (1993). Critical assessment of the presence of an NADPH binding site on neutrophil cytochrome *b*<sub>558</sub> by photoaffinity and immunochemical labeling. *Biochemistry* 32: 8880-8887.
- 74 Segal, A. W., P. G. Heyworth, S. Cockcroft, and M. M. Borrowman (1985). Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* 316: 547-549.
- 75 Hayakawa, T., K. Suzuki, S. Suzuki, P. C. Andrews, and B. M. Babior (1986). A possible role for protein phosphorylation in the activation of the respiratory burst in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 261: 9109-9115.
- 76 Volpp, B. D., W. M. Nauseef, and R. A. Clark (1988). Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242: 1295-1297.

- 
- 77 Nunoi, H., D. Rotrosen, J. I. Gallin, and H. L. Malech (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosolic factors. *Science* 242: 1298-1301.
- 78 Lomax, K. J., T. L. Leto, H. Nunoi, J. I. Gallin, and H. L. Malech (1989). Recombinant 47-kilodalton cytosolic factors restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 245: 409-412.
- 79 Cross, A. R., and J. T. Curnutte (1995). The cytosolic activating factors p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 270: 6543-6548.
- 80 Wientjes, F. B., J. J. Hsuan, N. F. Totty, and A. W. Segal (1993). p40<sup>phox</sup>, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain *src* homology 3 domains. *Biochem. J.* 296: 557-561.
- 81 Wientjes, F. B., G. Panayotou, E. Reeves, and A. W. Segal (1996). Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40<sup>phox</sup> interacts with both p67<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>. *Biochem. J.* 317: 919-924.
- 82 Fuchs, A., M.-C. Dagher, and P. V. Vignais (1995). Mapping the domains of interaction of p40<sup>phox</sup> with both p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 270: 5695-5697.
- 83 Fuchs, A., M.-C. Dagher, M. C. Fauré, and P. V. Vignais (1996). Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase. Pinpointing the sites of interaction between p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup> using the two-hybrid system. *Biochim. Biophys. Acta* 1312: 39-47.
- 84 Ito, T., R. Nakamura, H. Sumimoto, K. Takeshige, and Y. Sakaki (1996). An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>. *FEBS Lett.* 385: 229-232.

- 
- 85 Someya, A., I. Nagaoka, and T. Yamashita (1993). Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS Lett.* 330: 215-218.
- 86 Maly, F.-E., L. A. Quilliam, O. Dorseuil, C. J. Der, and G. M. Bokoch (1995). Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 18743-18746.
- 87 Gabig, T. G., C. D. Crean, P. L. Mantel, and R. Rosli (1995). Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood* 85: 804-811.
- 88 Didsbury, J. R., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans, and R. Snyderman (1989). Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264: 16378-16382.
- 89 Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C. G. Teahan, and A. W. Segal (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21<sup>rac1</sup>. *Nature* 353: 668-670.
- 90 Abo, A., and E. Pick (1991). Purification and characterization of a third cytosolic component of the superoxide-generating NADPH oxidase of macrophages. *J. Biol. Chem.* 266: 23577-23585.
- 91 Knaus, U. G., P. G. Heyworth, T. Evans, J. T. Curnutte, and G. M. Bokoch (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* 254: 1512-1515.
- 92 Knaus, U. G., P. G. Heyworth, B. T. Kinsella, J. T. Curnutte, and G. M. Bokoch (1992). Purification and characterization of Rac2: A cytosolic GTP-binding protein that regulates human neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 267: 23575-23582.

- 
- 93 Heyworth, P. G., U. G. Knaus, X. Xu, D. J. Uhlinger, L. Conroy, G. M. Bokoch, and J. T. Curnutte (1993). Requirement for posttranslational processing of Rac GTP-binding protein for activation of human neutrophil NADPH oxidase. *Mol. Biol. Cell* 4: 261-296.
- 94 Quinn, M. T., T. Evans, L. R. Loetterle, A. J. Jesaitis, and G. M. Bokoch (1993). Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation: Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J. Biol. Chem.* 268: 20983-20987.
- 95 Heyworth, P. G., B. P. Bohl, G. M. Bokoch, and J. T. Curnutte (1994). Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup>. Evidence for its interaction with flavocytochrome b<sub>558</sub>. *J. Biol. Chem.* 269: 30749-30752.
- 96 Dorseuil, O., M. T. Quinn, and G. M. Bokoch (1995). Dissociation of Rac translocation from p47-phox/p67-phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J. Leukoc. Biol.* 58: 108-113.
- 97 Kleinberg, M. E., H. L. Malech, D. A. Mital, and T. L. Leto (1994). p21rac does not participate in the early interaction between p47-phox and cytochrome b<sub>558</sub> that leads to phagocyte NADPH oxidase activation in vitro. *Biochemistry* 33: 2490-2495.
- 98 El Benna, J., J. M. Ruedi, and B. M. Babior (1994). Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 269: 6729-6734.
- 99 Dusi, S., M. Donini, and F. Rossi (1995). Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67<sup>phox</sup> is required for the translocation of rac1 but not of rac2 from cytosol to the membranes. *Biochem. J.* 308: 991-994.
- 100 Dorseuil, O., L. Reibel, G. M. Bokoch, J. Camonis, and G. Gacon (1996). The Rac target NADPH oxidase p67<sup>phox</sup> interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. *J. Biol. Chem.* 271: 83-88.

- 
- 101 Dusi, S., M. Donini, and F. Rossi (1996). Mechanisms of NADPH oxidase activation: Translocation of p40<sup>phox</sup>, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47<sup>phox</sup> or p67<sup>phox</sup>. *Biochem. J.* 314: 409-412.
- 102 Archer, S. L., H. L. Reeve, E. Michelakis, L. Puttagunta, R. Waite, D. P. Nelson, M. C. Dinauer, and E. K. Weir (1999). O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7944-7949.
- 103 Banfi, B., A. Manturana, S. Jaconi, S. Arnaudeau, T. Laforge, B. Sinha, E. Ligeti, N. Demaurex, and K. H. Krause (2000). A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287: 138-142.
- 104 Jones, S. A., J. T. Hancock, O. T. Jones, A. Neibauer, N. Topley (1995). The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *Am. J. Soc. Nephrol.* 5: 1483-1491.
- 105 Meier, B., A. J. Jesaitis, A. Emmendorffer, J. Roesler, and M. T. Quinn (1993). The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochem. J.* 289: 481-486.
- 106 Mohazzab, K. M., and M. S. Wolin (1994). Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADPH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO<sub>2</sub> sensor. *Am. J. Physiol.* 267: L823-L831.
- 107 Moulton, P. J., M. B. Goldring, and J. T. Hancock. NADPH oxidase of chondrocytes contain an isoform of the gp91<sup>phox</sup> subunit. *Biochem. J.* 329: 449-451.
- 108 Bastian, N. R., and J. B. Hibbs, Jr. (1994). Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 131-139.

- 
- 109 Inoue, N., S. Kawashima, K. Kanawaza, S. Yamada, S. Akita, and M. Yokoyama (1998). Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 97: 135-137.
- 110 Cool, R. H., E. Merten, Ch. Theiss, and H. Acker (1998). Rac1, and not Rac2, is involved in the regulation of the intracellular hydrogen peroxide level in HepG2 cells. *Biochem. J.* 332: 5-8.
- 111 Suh, Y.-A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griending, and J. D. Lambeth (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401: 79-82.
- 112 Weissmann, N., A. Tadić, J. Hänze, F. Rose, S. Winterhalder, M. Nollen, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger (2000). Hypoxic vasoconstriction in intact lungs - a role of NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.* 279: L683-L690.
- 113 Höhler, B., B. Holzapfel, and W. Kummer (2000). NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem. Cell. Biol.* 114: 29-37.
- 114 Abdalla, S., and J. A. Will (1995). Potentiation of the hypoxic concentration of guinea-pig isolated pulmonary arteries by two inhibitors of superoxide dismutase. *Gen. Pharmacol.* 26: 785-792.
- 115 Heikkila, R. E., F. S. Cabbat, and G. Cohen (1976). In vivo inhibition of superoxids dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* 251: 2182-2185.
- 116 Kelner, M. J., R. Bagnell, B. Hale, and N. M. Alexander (1989). Inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation. *Free Radic. Biol. Med.* 6: 355-360.
- 117 Pryor, W. A., and G. L. Squadrito (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268: L699-L722.

- 
- 118 Squadrito, G. L., and W. A. Pryor (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the role of superoxide, peroxynitrate, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 392-403.
- 119 Shirai, M., A. Shimouchi, A. T. Kawagushi, K. Sunagawa, and I. Ninomiya (1996). Inhaled nitric oxide: diameter response patterns in feline small pulmonary arteries and veins. *Am. J. Physiol.* 270: H974-H980.
- 120 Zhang, F., P. A. Woodmansey, and A. H. Morice (1995). Acute hypoxic vasoconstriction in isolated rat small and large pulmonary arteries. *Physiol. Res.* 44: 7-18.
- 121 Walling, C. (1975). Fenton's Reagent Revisited. *Accounts Chem. Res.* 8: 125-132.
- 122 Haber, F., and J. Weiss (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* 147: 332-351.
- 123 Koppenol, W. H., and J. Butler (1977). Mechanism of reaction involving singlet oxygen and the superoxide anion. *FEBS Lett.* 83: 1-6.
- 124 McClune, G. J., and J. A. Fee (1976). Stopped flow spectrophotometric observation of superoxide dismutation in aqueous solution. *FEBS Lett.* 67: 294-298.
- 125 Halliwell, B. (1976). An attempt to demonstrate a reaction between superoxide and hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 72: 8-10.
- 126 Rigo, A., R. Stevanato, A. Finazzi-Agro, and G. Rotilio (1977). An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. *FEBS Lett.* 80: 130-132.
- 127 Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. *FEBS Lett.* 92: 321-326.
- 128 McCord, J. M., and E. D. Day (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* 86: 139-142.

- 
- 129 Buettner, G. R., L. W. Oberley, and S. W. H. C. Leuthauser (1978). The effect of iron on the distribution of superoxide and hydroxyl radicals as seen by spin trapping and on the superoxide dismutase assay. *Photochem. Photobiol.*: 693-695.
- 130 Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 96: 238-242.
- 131 Gutteridge, M. C., R. Richmond, and B. Halliwell (1979). Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J.* 184: 469-472.
- 132 Ehleben, W., T. Porwohl, J. Fandrey, W. Kummer, and H. Acker (1997). Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells. *Kidney Int.* 51: 483-491.
- 133 Fandrey, J., S. Frede, W. Ehleben, T. Porwohl, H. Acker, W. Jelkmann (1997). Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoetin production by reactive oxygen species. *Kidney Int.* 51: 492-496.
- 134 Bickel, H., E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein, und H. Zähler (1960). Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. *Experientia* 16: 129-133.
- 135 Rote Liste<sup>®</sup> (2001). Editio Cantor, Aulendorf/Württ.
- 136 Fachinformation 0551-R721 -- Desferal-- (Stand März 1999). Novartis Pharma GmbH. <http://www.pharma.de.novartis.com>
- 137 Karlson, P., D. Doenecke, und J. Koolman (1994.). In: Karlson, P. (Hrsg.). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- 138 Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox (1994). In: H. Tscheche (Hrsg., dt. Übersetzg.). *Prinzipien der Biochemie*. 2. Auflage. Spektrum, Heidelberg.

- 
- 139 Oexle, H., E. Gnaiger, and G. Weiss (1999). Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1413: 99-107.
- 140 Kiyose, M., L. Chang-Lee, and E. Okabe (1999). Inhibition of skeletal sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity by deferoxamine nitroxide free radical. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 137-143.
- 141 Klug, D., J. Rabani, and I. Fridovich (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 247: 4839-4842.
- 142 Weissmann, N., F. Grimminger, R. Voswinckel, J. Conzen, and W. Seeger (1998). Nitro blue tetrazolium inhibits but does not mimic hypoxic vasoconstriction in isolated rabbit lungs. *Am. J. Physiol.* 274: L721-727.
- 143 Paky, A., J. R. Michael, T. M. Burke-Wolin, M. S. Wolin, and G. H. Gurtner (1993). Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J. Appl. Physiol.* 74: 2868-2874.
- 144 Burke-Wolin, T., and M. S. Wolin (1989).  $\text{H}_2\text{O}_2$  and cGMP may function as an  $\text{O}_2$  sensor in the pulmonary artery. *J. Appl. Physiol.* 66: 167-170.
- 145 Höhler, B., B. Lange, B. Holzapfel, A. Goldenberg, J. Hänze, A. Sell, H. Testan, W. Möller, and W. Kummer (1999). Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells. *FEBS Lett.* 457: 53-56.
- 146 Ehleben, W., B. Bölling, E. Merten, T. Porwohl, A. R. Strohmaier, and H. Acker (1998). Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway. *Respir. Physiol.* 114: 25-36.

- 
- 147 Post, J. M., J. R. Hume, S. L. Archer, and E. K. Weir (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 262: C882-890.
- 148 Yuan, X. J., W. F. Goldman, M. L. Tod, L. J. Rubin, and M. P. Blaustein (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* 264: L116-123.
- 149 Archer, S. L., J. Huang, T. Henry, D. Peterson, and E. K. Weir (1993). A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ. Res.* 73: 1100-1112.
- 150 Yuan, X. J., M. L. Tod, L. J. Rubin, and M. P. Blaustein (1994). Deoxyglucose and reduced glutathione mimic effects of hypoxia on K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-conductances in pulmonary artery cells. *Am. J. Physiol.* 267: L52-63.
- 151 White, C. W., J. H. Jackson, I. F. McMurtry, and J. E. Repine (1988). Hypoxia increases glutathione redox cycle and protects rat lungs against oxidants. *J. Appl. Physiol.* 65: 2607-2616.
- 152 Yuan, X. J., M. L. Tod, L. J. Rubin, and M. P. Blaustein (1994). Deoxyglucose and reduced glutathione mimic effects of hypoxie on K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-conductances in pulmonary artery cells. *Am. J. Physiol.* 267: L52-63.

## 8 Publikationsverzeichnis

### 8.1 Originalarbeiten

1. N. Weissmann, A. Tadić, J. Hänze, F. Rose, S. Winterhalder, M. Nollen, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger (2000). Hypoxic vasoconstriction in intact lungs - a role of NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.* 279: L683-690.
2. N. Weissmann, R. Voswinckel, A. Tadić, T. Hardebusch, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, W. Seeger, and F. Grimminger (2000). NO-dependent, but not NO-independent guanylate cyclase activation attenuates hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol. Biol.* 23: 222-227.

### 8.2 Abstracts und veröffentlichte Vorträge

1. N. Weissmann, A. Tadić, F. Rose, S. Winterhalder, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger (2000). Hypoxic vasoconstriction is specifically suppressed by the NADPH oxidase inhibitor 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride (AEBSF) in intact lungs. *Eur. Respir. J.* 16, Suppl. 31: 267s.
2. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, W. Seeger, und F. Grimminger (2000). Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. *Atemw.-Lungenkrankheiten* 26: 483-486. [Erratum: *Atemw.-Lungenkrankheiten* 26: 556]
3. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, F. Rose, R.T. Schermuly, H.A. Ghofrani, W. Seeger, und F. Grimminger (2000). Regulation der hypoxischen Vasokonstriktion durch eine NADPH-Oxidase. *Pneumologie Sonderheft I*: S41.
4. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, R. Schermuly, H.A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger (1999). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by superoxide dismutase inhibitors in isolated rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: A569.

5. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, W. Seeger, und F. Grimminger (1999). Superoxiddismutase-Inhibitoren hemmen die hypoxische Vasokonstriktion. *Pneumologie Sonderheft I*: S32.
6. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, R. Schermuly, H.A. Ghofrani, W. Seeger, und F. Grimminger (1999). Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion. *Pneumologie II*: 575.
7. N. Weissmann, A. Tadić, S. Winterhalder, R. Schermuly, H.A. Ghofrani, W. Seeger, and F. Grimminger (1999). Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is attenuated by superoxide dismutase inhibitors. ISAC Konferenz „Oxygen sensing: molecule to man“, Philadelphia, PA, USA 24.-28.6.1999.

## 9 Lebenslauf

24.11.1973 Geburt in Hannover als erster Sohn der Eheleute Mihovio und Edith Tadić, geb. Pons

### **Schulausbildung**

1980-1984 Waldweg-Grundschule, Celle  
1984-1986 Orientierungsstufe Westercelle, Celle  
1986-1990 Hölty-Gymnasium, Celle  
1990-1993 Gymnasium Ernestinum, Celle

### **Akademische Ausbildung**

1994-2000 Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, und Université Henri Warembourg, Lille/F mit Studienaufenthalten an den Universitäten in Zagreb/CRO, Wien/A und London/GB.

1996 Physikum  
1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1997 Beginn der hier vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. W. Seeger und Prof. Dr. Dr. F. Grimminger in der Klinischen Forschergruppe *Respiratorische Insuffizienz* am Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen

### **Berufliche Weiterbildung**

2001 Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

## 10 Danksagung

Mein Dank richtet sich an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Werner Seeger, und den Leiter der Klinischen Forschergruppe der Medizinischen Klinik II, Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger. Beiden danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und für die Möglichkeiten, die mir ihre Forschergruppe für wissenschaftliche Tätigkeit eröffnete. Ihre fachliche und insbesondere menschliche Kompetenz sind mir ein Vorbild.

Mein herzlicher und ganz besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Norbert Weißmann. Seine menschlichen Qualitäten, seine Professionalität und sein stetiges Engagement haben ihn für mich zu einem unschätzbaren Ratgeber und Vorbild werden lassen.

Ebenso herzlich danke ich auch meiner Lebensgefährtin Monica für ihre Geduld und ihre stete Unterstützung zu jeder Zeit und in allen Bereichen, sowie meinen lieben Eltern, ohne deren Hilfe ein Studium und die vorliegende Arbeit nur unter erschwerten Bedingungen möglich gewesen wäre.